

Neue Einblicke in die Rolle des Membranproteins TatA bei der Tat-abhängigen Proteintranslokation

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) – Universitätsbereich

genehmigte

DISSERTATION

von

Dipl.-Chem. Eva Ruth Stockwald

aus

Karlsruhe

Dekan:	Prof. Dr. Peter Roesky
Referent:	Prof. Dr. Anne S. Ulrich
Korreferent:	Prof. Dr. Wolfgang Wenzel
Tag der mündlichen Prüfung:	23.10.2015

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von April 2012 bis September 2015 am Lehrstuhl der Biochemie, am Karlsruher Institut für Technologie (KIT). Sie wurde unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Anne S. Ulrich in der KIT-Nachwuchsgruppe von Herrn Dr. Torsten Walther angefertigt.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertation eigenständig und ohne unzulässige fremde Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen wurden, sind durch Quellen im Literaturverzeichnis vollständig angegeben. Die Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungskommission zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Ort, Datum

Eva Stockwald

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank an alle richten, die am Zustandekommen der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Frau Prof. Dr. Anne S. Ulrich möchte ich recht herzlich für die freundliche Aufnahme in ihren Arbeitskreis und die herzliche Arbeitsatmosphäre danken. Sie ermöglichte mir die Erarbeitung dieser Dissertationsarbeit durch exzellente Arbeitsbedingungen und zur Verfügung gestellte Ressourcen. Zudem bot sie mir immerwährende Unterstützung und wertvolle Ratschläge, um mich in meiner Forschung voran zu bringen.

Mein besonderer Dank gilt auch meinem Projektleiter Herrn Dr. Torsten Walther für die hervorragende Betreuung. Er beriet mich nicht nur strategisch in der Organisation und Durchführung meiner Experimente, sondern war auch stets interessiert an meinen Ideen und gerne bereit, mich in der Verfeinerung dieser zu unterstützen.

Großer Dank gilt auch meinen beiden Teamkolleginnen Frau Dr. Christina Gottselig und Frau M. Sc. Biol. Lena Steger für die rege Zusammenarbeit und tatkräftige Hilfsbereitschaft. Frau Dr. Christina Gottselig verhalf mir zu einem schnellen Einstieg in das TatA-Projekt und gemeinsame projektbezogene Diskussionen unterstützten das immerwährende Fortschreiten meiner Forschung. Frau M. Sc. Biol. Lena Steger bekräftigte meine Forschungsergebnisse durch aussagekräftige Zirkulardichroismus-Daten, welche sie mir für die vorliegende Arbeit zur Verfügung stellte.

Im Rahmen des TatA-Projekts gebührt auch mein Dank Frau Dr. Julia Setzler, Herrn Dr. Moritz Wolf und Herrn Prof. Dr. Wolfgang Wenzel für die stetige Kooperation und die Durchführung themenbezogener Molekulardynamik-Simulationen.

Herrn Dr. Robyn Eijlander (Universität Groningen) danke ich für die Bereitstellung der TatA-Konstrukte und Herrn Dr. Jörg Müller (Universität Jena) für den TatA-Antikörper.

Ebenso danke ich Frau Stefanie Vollmer für die Bereitstellung aller Plasmid-Konstrukte, sowie Frau Bianca Posselt, Herrn Sigmar Roth und Herrn Dr. Jochen Bürck für die Hilfe bei den Zirkulardichroismus-Messungen.

Zudem gilt mein Dank auch Herrn Dr. Stephan Grage für die Hilfsbereitschaft bei den NMR-Messungen, Herrn Dr. Sergii Afonin für die Durchführung der Massenspektrometrie-Messungen und Herrn Dr. Vitali Vogel (Universität Frankfurt) für die Durchführung der Sedimentationsexperimente.

Herrn Dr. Dirk Windisch, Herrn Dr. Colin Ziegler sowie Frau Dr. Tamta Turdzeladze danke ich ebenfalls für die fortwährende Hilfsbereitschaft bei jeglicher Art von Problemen und Fragestellungen.

Auch ein Dank an alle weiteren Kollegen des Arbeitskreises. Sie zeigten stets ein offenes sowie freundliches Entgegenkommen und boten mir fortwährend ein ausgezeichnetes Arbeitsklima.

Ein ganz herzlicher Dank geht auch an meinen engsten Bekanntenkreis Herrn Mathias Eckert, Herrn Marcel Meinzer und Herrn Michael Becker sowie Frau Simone Manderla und Herrn Daniel Kammerer. Sie alle hatten in schweren Zeiten immer ein offenes Ohr und das einzigartige Talent, meine Lebensfreude stetig aufrecht zu erhalten.

Abschließend danke ich meinen Eltern Maritta und Helmut Stockwald sowie meinem Bruder Florian Stockwald von ganzem Herzen! Ihnen ist auch die vorliegende Arbeit gewidmet! Sie gaben mir durch ihren unaufhaltsamen Zuspruch, ihr Interesse und ihre immerwährende Unterstützung die nötige Kraft und Ausdauer während meiner Studienzzeit. Ohne sie wäre dieses Ziel niemals erreichbar gewesen!

Inhaltsverzeichnis

1. Biologischer Hintergrund	1
1.1 „Twin-Arginine“-Translokationssystem (Tat-System)	3
1.2 Signalpeptid der Tat-abhängigen Substrate	5
1.3 Komponenten des Tat-Systems	7
1.3.1 Struktur der Komponenten des Tat-Systems	8
1.3.1.1 Struktur des Proteins TatA.....	9
1.3.1.2 Struktur des Proteins TatB.....	10
1.3.1.3 Struktur des Proteins TatC.....	10
1.3.2 Funktion der Komponenten des Tat-Systems	11
1.4 Mechanismus der Tat-abhängigen Proteintranslokation.....	14
1.4.1 Energetisierung der Tat-abhängigen Proteintranslokation.....	14
1.4.2 Bildung des Translokationspore	15
1.4.3 Interaktion zwischen TatA und TatC	19
2. Aufgabenstellung und Zielsetzung	23
3. Ergebnisse	24
3.1 Darstellung der TatA-Konstrukte	24
3.1.1 Proteinexpression der TatA-Konstrukte.....	25
3.1.2 Aufreinigung der TatA-Konstrukte.....	27
3.1.3 Charakterisierung der TatA-Konstrukte.....	28
3.2 Charakterisierung der löslichen Form von TatA	30
3.2.1 Bestimmung des Löslichkeitsverhalten von TatA ₂₋₇₀	30
3.2.2 Bestimmung der Größe der löslichen TatA ₂₋₇₀ -Oligomere unter denaturierenden Bedingungen.....	31
3.2.3 Bestimmung der Größe der löslichen TatA ₂₋₇₀ -Oligomere unter nicht-denaturierenden Bedingungen	33
3.3 Bestimmung der Orientierung von membrangebundenem TatA.....	36
3.3.1 Festkörper-NMR-Messungen an TatA ₂₋₇₀ und TatA ₂₋₄₅	37
3.3.2 Einfluss der Membrandicke	41
3.3.3 Einfluss des pH-Wertes.....	45
3.3.4 Einfluss der Temperatur.....	48

3.3.5	Einfluss der Membranbeschaffenheit.....	49
3.3.5.1	Orientierung von TatA ₂₋₄₅ in Phytanoylmembranen	50
3.3.5.2	Einfluss der Phytanoyllipid-Polymorphie.....	54
3.3.6	Einfluss der strukturellen Merkmale von TatA.....	55
3.3.6.1	Einfluss einer Erhöhung der N-terminalen Ladungsdichte.....	57
3.3.6.2	Einfluss einer TMH-Verlängerung	60
3.3.6.3	Einfluss einer TMH-Verkürzung	64
4.	Diskussion	70
4.1	Die lösliche Form von <i>B. subtilis</i> TatA _d	70
4.2	Die membrangebundene Form von <i>B. subtilis</i> TatA _d	73
4.3	Bedeutung der Studie für den neuen Translokationsmechanismus	77
5.	Zusammenfassung	83
6.	Methoden	84
6.1	Mikrobiologische und proteinbiochemische Methoden	84
6.1.1	Steriltechnik	84
6.1.2	Herstellung der Agarplatten	84
6.1.3	Hitzetransformation	84
6.1.4	Herstellung der Vor- und Glycerolkultur.....	85
6.1.5	Testexpression.....	85
6.1.6	Proteinexpression und Zellernte.....	85
6.1.7	Zellaufschluss	86
6.1.8	Nickelchelat-Affinitätschromatographie.....	86
6.1.9	Dialyse	88
6.1.10	Bromcyan-Spaltung	88
6.2	Analytische Methoden	88
6.2.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	88
6.2.2	Coomassie- und Silberfärbung.....	90
6.2.3	Western Blot-Verfahren und Immunodetektion	90
6.2.4	Proteinlöslichkeitstests.....	92
6.2.5	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	92
6.2.6	Größenausschluss-Chromatographie	93
6.2.7	Dynamische Lichtstreuung	94

6.2.8 Analytische Ultrazentrifugation	96
6.2.9 Synchrotron-Zirkulardichroismus-Spektroskopie.....	97
6.2.10 Orientierte Synchrotron-Zirkulardichroismus-Spektroskopie	100
6.2.11 Festkörper-Kernspinresonanz-Spektroskopie	101
6.2.11.1 Rekonstitutionsmethoden.....	104
6.2.11.2 Festkörper-NMR-Messungen	105
Literatur- und Quellenverzeichnis	109
Anhang.....	I
Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen	I
Geräte, Materialien und Chemikalien	VII
Abbildungsverzeichnis.....	XI
Tabellenverzeichnis	XIII
Abkürzungsverzeichnis.....	XIII
Publikationen	XVI

1. Biologischer Hintergrund

Zellen sind die kleinsten lebenden Einheiten aller Organismen und stellen eigenständige, sich selbst erhaltende Systeme dar. Um ihren Stoffwechsel aufrecht zu erhalten, besitzen sie eine Vielzahl an Proteinen, die bei nahezu allen physiologischen Prozessen beteiligt sind^[1,2]. Proteine sind Makromoleküle, die aus Aminosäuren aufgebaut sind und sich über physikalische Wechselwirkungen zu dreidimensionalen Strukturen falten^[3]. In diesem biologisch aktiven Zustand übernehmen sie essentielle Aufgaben, wie beispielsweise die Katalyse, die Signaltransduktion oder die Speicherung und den Transport von Molekülen^[1,2]. Im Speziellen der Stofftransport umfasst Prozesse wie die Nährstoffaufnahme, die Abfallentsorgung oder die Überführung von weiteren Proteinen an ihren Wirkungsort. Bei diesen Transportvorgängen müssen oftmals Biomembranen überquert werden, welche die Zellen umschließen und in intrazelluläre Reaktionsräume unterteilen. Diese hydrophoben Lipiddoppelschichten dienen als selektive Permeabilitätsbarrieren, die den Stoffaustausch mit der Umgebung und innerhalb der Zelle kontrollieren^[2]. Während kleine hydrophobe Stoffe ungehindert durch die Membranen diffundieren können, benötigen größere oder hydrophile Moleküle die Hilfe von membrangebundenen Proteinen. Diese Membranproteine gehen unter anderem ihrer Funktion als Transporter, Kanalprotein oder Ionenpumpe nach und erzeugen eine regulierte Membranöffnung^[4]. Transporter binden beispielsweise die Moleküle und entlassen sie nach einer Konformationsänderung auf der anderen Seite der Membran. Kanalproteine bilden hingegen eine Pore, durch die Ionen oder organische Moleküle entlang des Konzentrationsgradienten die Membran passieren können. Der Transport durch Ionenpumpen erfolgt über einen „aktiven“ energiegetriebenen Prozess entgegen eines Konzentrationsgradienten. Als Energiequelle wird bei diesem Transport meistens die Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) oder die Protonenmotorische Kraft (*proton motiv force*; PMF) genutzt^[2]. Für den Transport von Proteinen (Proteintranslokation) sind noch komplexere Transportsysteme in Form von Multiproteinkomplexen erforderlich. Die Komponentenzahl dieser sogenannten Translokasen variiert stark je nach Organismus und Gattung^[5]. Um von den Translokasen erkannt zu werden, besitzen die Proteine (Substrate) ein fusioniertes Signalpeptid, welches bei der Biosynthese mittranslatiert wird und nach dem Transport durch eine Signalpeptidase abgespalten wird^[6-8]. Diese meist N-terminal gebundene kleine Aminosäuresequenz legt die Transporteffizienz, die Transportroute und den Zielort des Substrates fest^[5,6,9,10]. Die Proteintranslokation über die Zytoplasmamembran erfolgt in Bakterien, Archaeen sowie

Pflanzenzellen überwiegend über den Sec-abhängigen^[11–13] und den Tat-abhängigen Transport (*twin-arginine translocation*; Tat)^[14]. Die markantesten Unterschiede dieser beiden Transportsysteme bestehen im Faltungszustand des Substrates und in der genutzten Energiequelle (siehe Abbildung 1). Über den Sec-abhängigen Transport werden ungefaltete Substrate durch die Triebkraft der ATP-Hydrolyse transportiert. Nach der Biosynthese des Substrates verhindert das Chaperon SecB dessen Faltung und führt es zum membranengebundenen Enzym SecA. Dieses fädelt die unstrukturierte Polypeptidkette unter Verbrauch von ATP in die SecYEG-Pore ein, welche aus mehreren Membranproteinen besteht. Nach erfolgreicher Translokation erfolgt die Faltung des Substrates anschließend im Periplasma. Über den Tat-abhängigen Transport werden hingegen nativ gefaltete Substrate nur durch die Triebkraft der PMF transportiert^[11–15]. Hierbei wird der Protonengradient aufrecht erhalten, während Substrate mit einem Durchmesser von bis zu 70 Å transportiert werden können^[16]. Durch diese beiden Transportsysteme wird es der Zelle ermöglicht, ein sehr breites Spektrum an verschiedenen Substraten zu exportieren^[12,13]. Gram-negative Bakterien besitzen darüber hinaus noch weitere spezielle Translokasen (Sekretionssystem Typ I–V), die den Substrattransport über die Außenmembran vermitteln^[17].

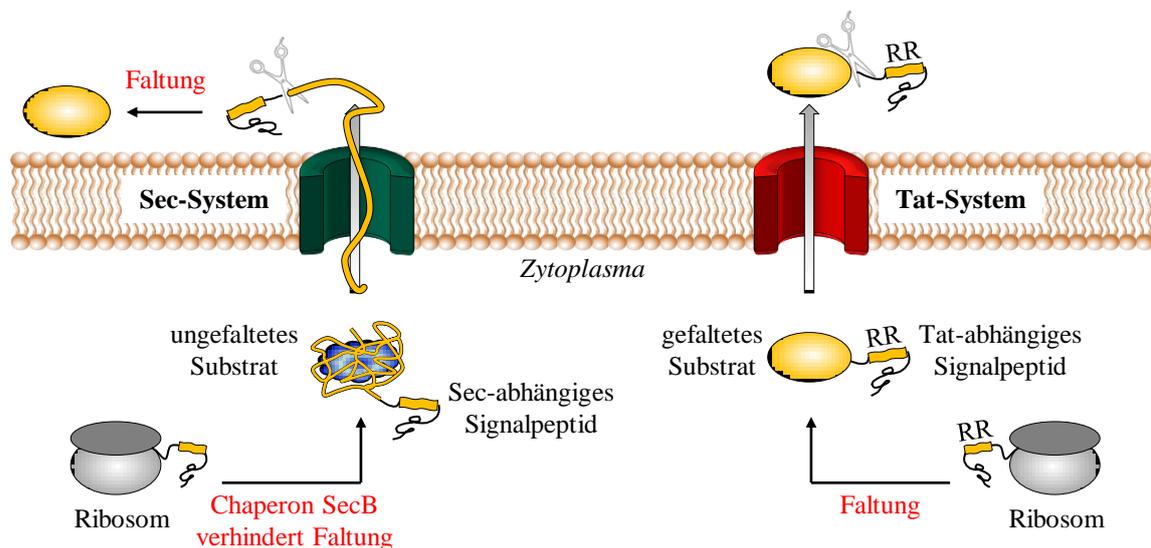


Abbildung 1 Proteintranslokation über das Sec-abhängige und Tat-abhängige Transportsystem

Über das Sec-abhängige (grün) und das Tat-abhängige (rot) Transportsystem werden Substrate (orange) über die Zytoplasmamembran transloziert. Um von diesen membrangebundenen Multiproteinkomplexen erkannt zu werden, besitzen die Substrate ein Signalpeptid, welches nach dem Transport von einer Signalpeptidase (Schere) abgespalten wird. Das Sec-abhängige Transportsystem exportiert Substrate in Form einer unstrukturierten Polypeptidkette, wobei die zytoplasmatische Faltung der Substrate durch das Chaperon SecB (blau) verhindert wird. Das Tat-abhängige Transportsystem exportiert hingegen zytoplasmatisch gefaltete Substrate. Abbildung verändert übernommen aus^[18].

1.1 „Twin-Arginine“-Translokationssystem (Tat-System)

Das Tat-System wurde im Jahr 1991 erstmals von Mould *et al.* in der Chloroplasten-Thylakoidmembran von Mais entdeckt ^[19]. Ausgehend von dieser Entdeckung nahm seine Erforschung einen rasanten Lauf, wodurch es auch in vielen Bakterien und Archaeen identifiziert werden konnte ^[6,11,20–22]. Kürzlich wurde die größte Untereinheit des Multiproteinkomplexes auch erstmalig in einem tierischen Eukaryoten, dem Hornkieselchwamm nachgewiesen ^[23]. Seine Namensgebung beruht auf einem charakteristischen hochkonservierten Doppel-Arginin-Sequenzmotiv (*twin-arginine*; RR), welches alle Tat-abhängigen Substrate auf ihrem Signalpeptid tragen ^[21,24]. Bekannt wurde es durch seine einzigartige Fähigkeit, Substrate im nativ gefalteten Zustand nur durch die Triebkraft der PMF zu transportieren ^[11–15,19,25]. Zudem besitzt es eine Qualitätskontrolle der Proteinfaltung, wodurch jegliche Fehlfaltungen erkannt werden und die Translokation gegebenenfalls unterbunden wird ^[26–30].

Da Tat-abhängige Substrate an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt sind, stellt der Tat-abhängige Transport einen essentiellen Vorgang der Zellen dar ^[12]. Hierzu zählen beispielsweise die Zellatmung ^[31,32], die symbiotische Stickstofffixierung ^[33,34] oder die Photosynthese ^[35,36]. Es sind auch Substrate bekannt, die an der Zellteilung ^[37], der Zellmotilität ^[38,39] und der Zellwandsynthese ^[40–42] beteiligt sind. Virulenzfaktoren von einigen pathogenen Bakterien werden ebenfalls Tat-abhängig transportiert. Daher besitzt das Transportsystem beispielsweise auch eine bedeutende Rolle bei der Sekretion der Exotoxine oder der Phospholipase C ^[43,44]. Die Substratanzahl, die Tat-abhängig exportiert wird, variiert stark je nach Gattung und Organismus ^[13,45–47]. In manchen Gram-positiven Bakterien wie *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) oder *Staphylococcus aureus* verläuft der Transport weitgehend substratspezifisch ^[48]. In anderen Gram-positiven Bakterien wurden hingegen schon mehr als 100 Substrate verifiziert, wie beispielsweise in Bakterien der Gattung *Streptomyces* ^[49,50]. In Gram-negativen Bakterien variiert die Anzahl zwischen 10 und 90 Substraten, und in einigen halophilen Archaeen werden mehr als 50 % aller Substrate Tat-abhängig exportiert ^[47].

Die Bedeutsamkeit des Tat-Systems zeigt sich auch durch die Vorteile, die durch eine zytoplasmatische Substratfaltung entstehen ^[12] (siehe Abbildung 2). In vielen halophilen Archaeen ist beispielsweise der extrazelluläre Salzgehalt so hoch, dass sich die Substrate nicht korrekt falten und unspezifisch aggregieren ^[47,51,52]. Manche Substrate, wie zum Beispiel das monomere SufI-Substrat des Bakteriums *Escherichia coli* (*E. coli*) ^[53], weisen

zudem eine so schnelle Faltungskinetik auf, dass sie für den Sec-abhängigen Transport inkompatibel sind^[12–14]. Im Hinblick auf Kofaktor-haltige Substrate umgeht die zytoplasmatische Faltung darüber hinaus den zusätzlichen getrennten Export des Kofaktors und unterbindet im Speziellen die Konkurrenz periplasmatischer Metallionen^[54–56] (siehe Abbildung 2 A und 2 B). Für einige Kofaktor-haltige Substrate wurden auch substratspezifische zytoplasmatische Chaperone entdeckt, die einen Transport des „unreifen“ Substrates vor der Insertion des Kofaktors verhindern^[57]. Bekannte Beispiele sind die Chaperone TorD und DmsD, die den Transport der *E. coli* Substrate Trimethylamin-N-oxid- und Dimethylsulfoxid-Reduktase kontrollieren^[58–62].

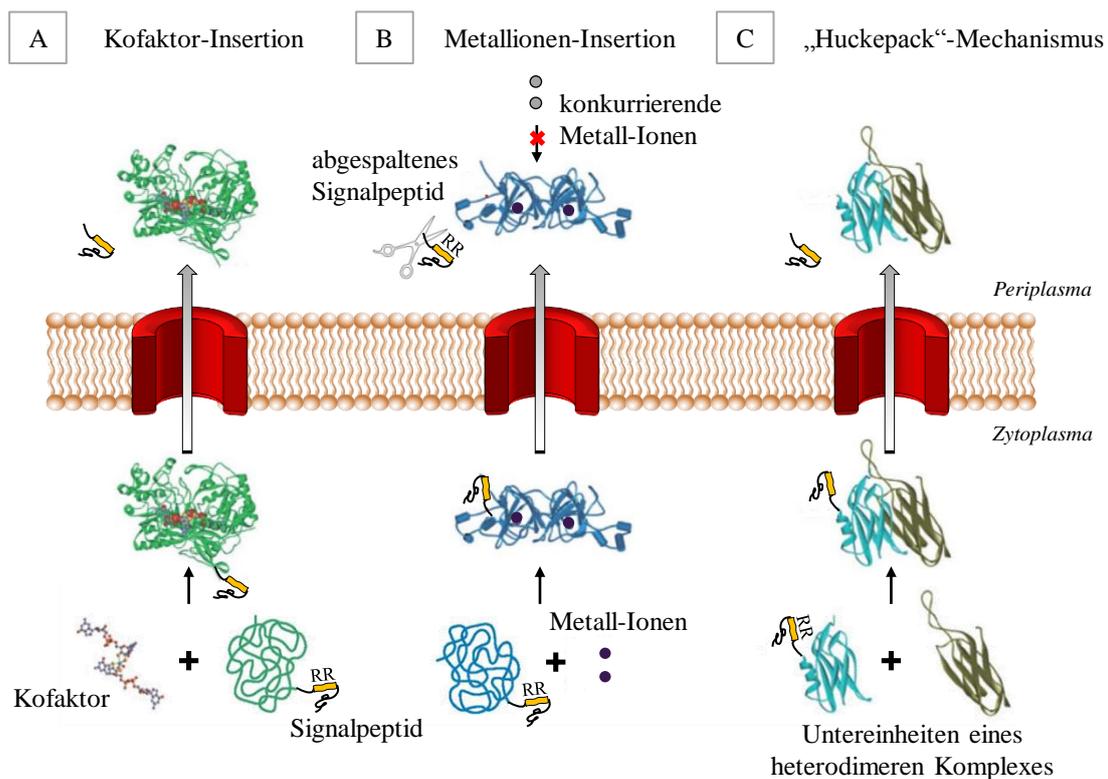


Abbildung 2 Vorteile einer zytoplasmatischen Faltung der Tat-abhängigen Substrate

A: Die zytoplasmatische Insertion des Kofaktors umgeht einen separaten Export des Kofaktors und eine periplasmatische Insertion des Kofaktors. **B:** Die spezifische zytoplasmatische Insertion der Metallionen unterbindet die Konkurrenz periplasmatischer Metallionen. **C:** Der „Huckepack“-Mechanismus ermöglicht den Transport von Substratuntereinheiten, die kein Tat-abhängiges Signalpeptid besitzen. Abbildung verändert übernommen aus^[45].

Des Weiteren bietet auch der sogenannte „Huckepack“-Mechanismus (*hitchhiking*) heterooligomerer Komplexe einen weiteren Vorteil^[21,29] (siehe Abbildung 2 C). Durch eine zytoplasmatische Assemblierung können Substratuntereinheiten mittransportiert werden, die kein Tat-abhängiges Signalpeptid besitzen. Bekannte Beispiele hierfür sind die große Untereinheit der *E. coli* Dimethylsulfoxid-Reduktase^[63] oder der *E. coli* Nickel-Eisen-Hydrogenase 2^[64]. Diese assoziieren zytoplasmatisch mit ihren kleinen Unterein-

heiten, welche das erforderliche Signalpeptid besitzen, und können so über das Tat-System exportiert werden. Für einige heterooligomere Komplexe wurden auch zytoplasmatische Chaperone entdeckt, welche den alleinigen Export der kleinen Untereinheit verhindern und die Assemblierung der Substratuntereinheiten begünstigen ^[62,65].

Das Tat-System ist aufgrund seiner besonderen Eigenschaften auch aus biotechnologischer Sicht ein vielversprechendes Werkzeug der sekretorischen Proteingewinnung. Speziell Gram-positive Bakterien besitzen keine Außenmembran, wodurch Substrate direkt ins Kulturmedium sekretiert und mit geringem Aufwand gewonnen werden können ^[66,67]. Im Vordergrund steht bei einer solchen Proteinexpression grundsätzlich die Erhaltung der biologischen Proteinaktivität, welche durch die Qualitätskontrollfunktion des Tat-Systems durch eine korrekte Proteinfaltung gegeben ist ^[9,14,45]. So konnten auch schon viele biotechnologisch relevante Proteine mit Hilfe des Tat-abhängigen Transportsystems erfolgreich sekretiert und gewonnen werden ^[66–69].

Da das Tat-System in vielen humanen Pathogenen als Virulenzfaktor angesehen wird, ist es zudem ein erfolgsversprechendes Angriffsziel bei der Entwicklung antimikrobieller Wirkstoffe ^[14,43,48,70,71]. Daher besitzt es bei der Entwicklung von Medikamenten, Antibiotika und Pflanzenschutzmitteln auch einen industriellen sowie pharmazeutischen Nutzen ^[9,38,43,72].

1.2 Signalpeptid der Tat-abhängigen Substrate

Wie bereits einführend erwähnt, besitzen alle Substrate ein fusioniertes Signalpeptid, welches als Erkennungssequenz für die Translokasen dient ^[5,6,9,10]. Tat-abhängige und Sec-abhängige Signalpeptide besitzen eine globale Strukturanalogie und können in eine kationische N-terminale Region (N-Region), eine hydrophobe Region (H-Region) und eine polare C-terminale Region (C-Region) unterteilt werden (siehe Abbildung 3). Diese drei Regionen unterscheiden sich in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften. Hierdurch besitzen sie spezifische Funktionen, welche die Substraterkennung, die Transporteffizienz und die Transportroute betreffen ^[10,73–75].

Die N-Region besitzt eine α -helikale Faltung und eine bedeutende Rolle bei der Interaktion mit der Membran ^[36,76–78] sowie dem Rezeptor der Translokase ^[6,79]. Beim Vergleich von Sec- und Tat-abhängigen Signalpeptiden existieren in dieser Region einige grundlegende Unterschiede. Die N-Region Tat-abhängiger Signalpeptide besitzt eine höhere Anzahl an kationischen Aminosäuren und ist um einiges länger als die N-Region Sec-abhängiger Signalpeptide ^[6,56]. Zudem trägt sie die charakteristische Erkennungssequenz SRRxFLK an

der Grenze zur H-Region ^[41,56,80]. Hierbei ist das Doppel-Arginin-Sequenzmotiv hochkonserviert, während die restlichen Aminosäuren mit einer Häufigkeitswahrscheinlichkeit von über 50 % auftreten ^[14]. Durch Mutationsstudien konnte außerdem gezeigt werden, dass das Doppel-Arginin-Sequenzmotiv eine essentielle Bedeutung für einen funktionsfähigen Tat-abhängigen Transport besitzt. Substitutionen der Arginine führen zu einer Verringerung der Transporteffizienz bis hin zum kompletten Erliegen des Systems ^[41,80,81]. Vor den Argininen existiert meist eine der beiden polaren Aminosäuren Threonin oder Serin und dahinter folgt eine polare oder geladene variable Aminosäure *x*. Daran schließen meist die zwei hydrophoben Aminosäuren Phenylalanin und Leucin an, denen eine wichtige Rolle bei der Wechselwirkung mit der Translokase zugeschrieben wird ^[41]. Die Erkennungssequenz schließt meist mit einer polaren Aminosäure wie Lysin ab ^[6,10].

Die α -helikale H-Region Tat-abhängiger Signalpeptide besitzt eine geringere Hydrophobizität als die von Sec-abhängigen Signalpeptiden ^[6,10,75]. Es konnte gezeigt werden, dass der Hydrophobizitätsgrad dieser Region einen entscheidenden Einfluss auf die Transportroute besitzt ^[82]. Durch eine Hydrophobizitätssteigerung der H-Region konnte ein gezielter Sec-abhängiger Transport eines Tat-abhängigen Substrates induziert werden.

Die C-Region trägt die Erkennungs- und Schnittstellensequenz AxA der Signalpeptidase, welche sich an der Position zwischen -3 und -1 des Substrates befindet ^[83,84]. Zudem existiert in dieser Region teilweise ein spezifisches Lysin, welches einen Sec-abhängigen Transport verhindern soll und daher als „*Sec-Avoidance*“-Signal bezeichnet wird ^[20].

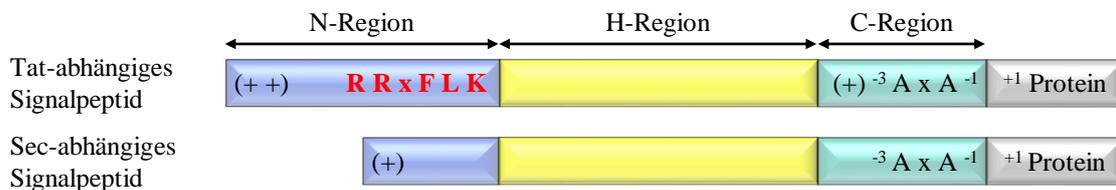


Abbildung 3 Vergleich eines Tat-abhängigen und Sec-abhängigen Signalpeptids

Signalpeptide sind meist N-terminale Verlängerungen des Substrates (grau) und können in eine N-Region (blau – kationisch), eine H-Region (gelb – hydrophob) und eine C-Region (grün – polar) unterteilt werden. Die Erkennungs- und Schnittstellensequenz der Signalpeptidase sowie die charakteristische Erkennungssequenz der Tat-abhängigen Signalpeptide (rot) ist gekennzeichnet (*x* = variable Aminosäure). Abbildung verändert übernommen aus ^[85].

1.3 Komponenten des Tat-Systems

Das Tat-System ist ein membrangebundener Multiproteinkomplex, dessen Komponentenzahl je nach Organismus und Gattung variiert^[5]. In den meisten Gram-negativen Bakterien und Archaeen wurden die Proteine TatA, TatB und TatC als essentielle Komponenten charakterisiert^[20,21,48,53,86–88]. In Pflanzenzellen werden die Komponenten als Tha4 (*thylakoid assembly 4*; TatA-Homolog), Hcf106 (*high chlorophyll fluorescent 106*; TatB-Homolog) und cpTatC (*chloroplast TatC*; TatC-Homolog) bezeichnet^[8,86].

Im Gram-negativen Bakterium *E. coli* existiert darüber hinaus noch ein weiteres TatE- und TatD-Protein. In diesem Bakterium liegen die Informationen der Tat-Komponenten auf dem Operon *tatABCD* vor und das Gen *tatE* wird monocistronisch transkribiert^[9,11,20]. TatE ist wahrscheinlich durch eine Genduplikation aus TatA hervorgegangen und Komplementationsanalysen^[21,53,89] sowie diverse andere Studien^[90] belegen eine überlappende Funktion mit TatA^[9,53,91]. Dennoch scheint TatE eine geringere Relevanz als TatA zu besitzen, da es ein niedrigeres Expressionsniveau zeigt und in *ΔtatA*-Stämmen eine geringere Transporteffizienz vorliegt^[21,89]. TatD ist im Gegensatz zu den restlichen membrangebundenen Tat-Komponenten ein zytoplasmatisches Enzym mit Desoxyribonukleasefunktion^[92]. Diesem Protein konnte bislang noch keine klare Beteiligung am Translokationsprozess zugeschrieben werden^[92–94], jedoch wird eine mögliche Anteilnahme an der Qualitätskontrolle des Tat-System kontrovers diskutiert^[95,96].

Bei Gram-positiven Bakterien muss hingegen zwischen Vertretern mit hohem und niedrigem genomischen Guanin- und Cytosin-Gehalt (GC-Gehalt) unterschieden werden^[97]. In Bakterien mit hohem GC-Gehalt setzt sich der Multiproteinkomplex ebenfalls aus den Proteinen TatA, TatB und TatC zusammen. In Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt existiert hingegen kein TatB, wodurch das Transportsystem oftmals als “minimale TatA/TatC-Translokase“ bezeichnet wird^[6,98–101]. Ein solcher Organismus stellt zum Beispiel das Bakterium *B. subtilis* dar, dessen Genom für drei *tatA*- sowie zwei *tatC*-Gene kodiert und welches zwei substratspezifische Tat-Systeme besitzt^[102]. Hierbei übernimmt die TatA_d/TatC_d-Translokase unter Phosphatmangel die Sekretion des Enzyms Phosphodiesterase PhoD^[6,98] und die TatA_y/TatC_y-Translokase exportiert die Eisen-abhängige Peroxidase YwbN^[99]. Dem zusätzlichen Protein TatA_c konnte bislang noch keine Funktion am Translokationsprozess zugeschrieben werden^[99,103]. Bei solchen minimalen Translokasen übernimmt TatA die Funktion der fehlenden Komponente TatB^[13,48,99]. So ist beispielsweise *B. subtilis* TatA_d befähigt, *E. coli* TatA, TatE und TatB in entsprechen-

den Deletionsstämmen funktionell zu ersetzen ^[102]. Durch Mutationsstudien konnte auch ein bifunktionelles *E. coli* TatA erzeugt werden, welches einen funktionsfähigen Tat-abhängigen Transport des Substrates TorA in Abwesenheit von TatB erlaubt ^[104].

1.3.1 Struktur der Komponenten des Tat-Systems

Sequenzanalysen belegten schon frühzeitig eine strukturelle Verwandtschaft der *E. coli* Proteine TatA, TatB und TatE ^[18]. Diese zeigt sich durch eine 20 %ige Sequenzidentität von TatA und TatB ^[105] und durch eine 53 %ige Sequenzidentität von TatA und TatE ^[21]. Basierend auf diesen Sequenzanalysen wurde den Proteinen eine erste Struktur aus einer N-terminalen α -helikalen Transmembranhelix (TMH), einer flach auf der Membran liegenden, amphiphilen α -Helix (APH) und einer unstrukturierten C-terminalen Region zugeschrieben ^[9,16,106–108] (siehe Abbildung 4).

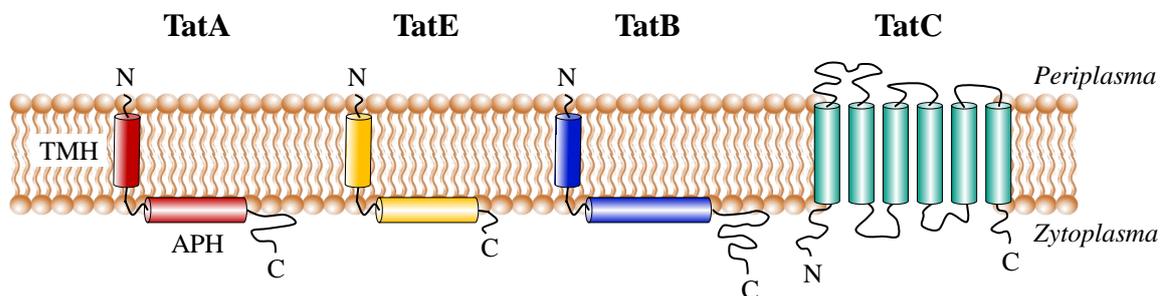


Abbildung 4 Strukturvorhersage der *E. coli* Tat-Komponenten

Die Proteine TatA (rot), TatE (orange) und TatB (blau) bestehen aus einer N-terminalen transmembranen α -Helix (TMH), einer auf der Membran aufliegenden, amphiphilen α -Helix (APH) und einer unstrukturierten C-terminalen Region unterschiedlicher Länge. Das Protein TatC (grün) besteht aus sechs TMHs. Abbildung verändert übernommen aus ^[109].

Die Proteine unterscheiden sich zum einen durch die Länge der C-terminalen Region und zum anderen durch die bedeutend längere APH von TatB ^[14,53,110,111]. Die Helices sind durch eine Gelenkregion miteinander verbunden, wodurch sich eine L-förmige Struktur ergibt ^[106]. Diese Gelenkregion besitzt ein konserviertes GPxxLP-Motiv, dessen Substitution zu einem Stabilitäts- und Funktionalitätsverlust der Proteine führt ^[105,112–114]. Die Ausrichtung der Termini in der Membran ist bislang noch nicht abschließend geklärt. Zugänglichkeitsstudien durch Proteasen und Oxidantien belegen eine zytoplasmatische Ausrichtung des C-Terminus für TatA und TatB, wobei der N-Terminus in Richtung Periplasma exponieren soll ^[86,108,112,115–118]. Maleimid-Markierungsstudien an TatA sprechen hingegen für eine inverse Topologie ^[119]. Darüber hinaus konnten Proteolysestudien auch eine peri- sowie zytoplasmatische Angreifbarkeit der APH von TatA belegen und deuten auf eine duale Topologie dieser Helix hin ^[120].

Das sehr hydrophobe TatC-Protein ist die größte Komponente des Multiproteinkomplexes und besitzt beispielsweise im Bakterium *E. coli* ein Molekulargewicht von 28,9 kDa mit 258 Aminosäuren. Ursprünglich sprach man TatC eine Topologie aus vier TMHs und zwei großen periplasmatischen Schleifen zu ^[121]. Diese Strukturvorhersage wurde jedoch durch Maleimid-Markierungsstudien ^[122] und Fusionsexperimenten mit topologischen Markerproteinen ^[123,124] angezweifelt, wodurch sich eine Topologie aus sechs TMHs mit zwei zytoplasmatischen Termini etablierte ^[21,87,122–125].

1.3.1.1 Struktur des Proteins Tata

Die vorhergesagte Struktur von Tata konnte inzwischen mittels diverser Studien bestätigt und spezifiziert werden. Die α -helikale Faltung der Helices wurde für *E. coli* Tata und *B. subtilis* Tata_d mit Hilfe der isotropen Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD) belegt ^[108,126]. Die Membranorientierung von *B. subtilis* Tata_d wurde darüber hinaus mittels der orientierten CD-Spektroskopie (OCD) bestimmt ^[126]. Diese Daten zeigen eine oberflächengebundene Orientierung der APH und eine membrandurchspannende Orientierung der TMH. Die lokale Struktur von detergenssolubilisiertem *B. subtilis* Tata_d wurde zudem mittels der Flüssig-Kernspinresonanz-Spektroskopie (*nuclear magnetic resonance*; NMR) aufgeklärt ^[106] (siehe Abbildung 5 A). Diese Daten bestätigen eine L-förmige Anordnung der Helices und belegen eine leichte Krümmung der APH. Zudem zeigen sie, dass insbesondere die konservierten Prolin- und Leucinseitenketten des konservierten GPxxLP-Motivs in der Gelenkregion durch interhelikale Wechselwirkungen eine stabilisierende Wirkung auf die L-förmige Struktur besitzen ^[106] (siehe Abbildung 5 B).

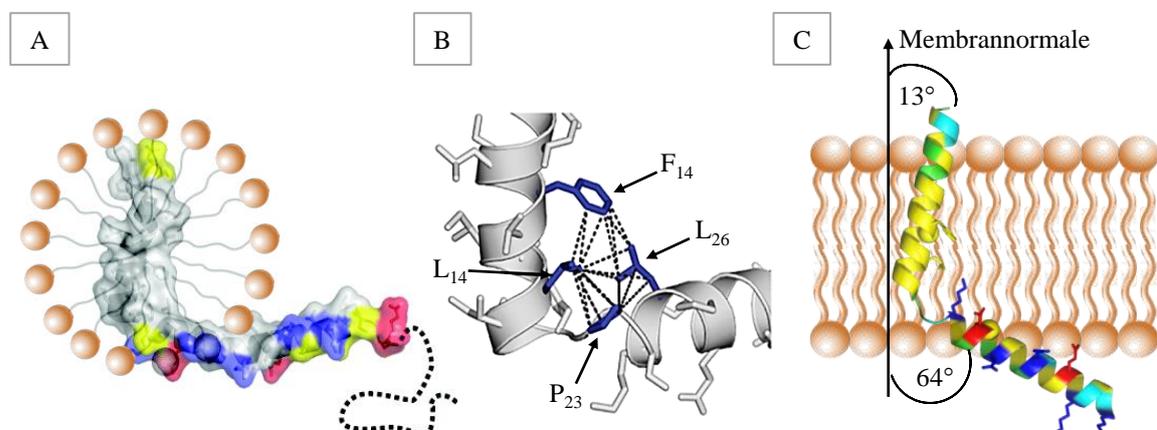


Abbildung 5 Lokale Struktur und Membranorientierung von *B. subtilis* Tata_d

A: Darstellung der lokalen Struktur von *B. subtilis* Tata_d in einer Micelle basiert auf Daten aus der Flüssig-NMR-Spektroskopie ^[106]. **B:** Bänderdarstellung der lokalen Konformation der Gelenkregion von *B. subtilis* Tata_d. Gezeigte Interaktionen der Aminosäureseitenketten (blau) basieren auf Daten aus der Flüssig-NMR-Spektroskopie ^[106]. **C:** Bänderdarstellung von *B. subtilis* Tata₂₋₄₅ in einer orientierten Lipiddoppelschicht. Membranorientierung basiert auf Daten aus der Festkörper-NMR-Spektroskopie ^[127].

Um die Membranorientierung zu spezifizieren, wurde *B. subtilis* TatA_d auch mit Hilfe der Festkörper-NMR-Spektroskopie in planaren Bicellen untersucht^[127]. Durch diese Studie gelang es, eine Neigung der TMH von 13° und einen Kippwinkel der APH von 64° relativ zur Membrannormalen zu bestimmen (siehe Abbildung 5 C). Diese Daten führten zu der Erkenntnis, dass die APH eine Schräglage annimmt und nicht wie angenommen, flach auf der Membranoberfläche liegt. Diese Membranorientierung lässt sich durch die ungewöhnlich kurze TMH erklären, welche nur schwer eine Membran durchspannen kann und somit die APH zum Teil mit in die Membran zieht.

1.3.1.2 Struktur des Proteins TatB

Über die Struktur von TatB liegen bislang noch keine so detaillierten Informationen wie über TatA vor. Nach einer kürzlich veröffentlichten Strukturuntersuchung mittels der Flüssig-NMR-Spektroskopie kann die APH von *E. coli* TatB in drei Teile (α_1 , α_2 und α_3) unterteilt werden^[128] (siehe Abbildung 6). Deletionsstudien der APH-Teile α_2 und α_3 zeigen eine verminderte Translokationseffizienz, was für eine funktionelle Bedeutung dieser Regionen spricht^[110]. Dennoch konnten bislang keine konservierten Aminosäuren in diesen beiden APH-Teilen verifiziert werden^[105,114].

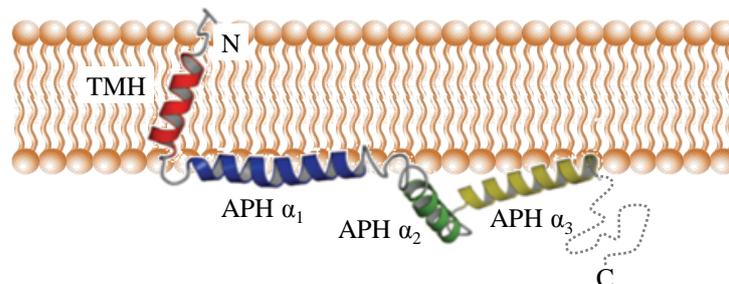


Abbildung 6 Lokale Struktur von *E. coli* TatB

Bänderdarstellung von *E. coli* TatB. Die APH lässt sich basierend auf Daten aus der Flüssig-NMR-Spektroskopie in drei Teile (α_1 , α_2 und α_3) unterteilen. Abbildung verändert übernommen aus^[18].

1.3.1.3 Struktur des Proteins TatC

Die Topologie der sechs TMHs von TatC konnte durch die Aufklärung der Kristallstruktur von TatC aus der hyperthermophilen Gattung *Aquifex aeolicus* (*A. aeolicus*) erst kürzlich eindeutig bestätigt werden^[129,130] (siehe Abbildung 7). Die Membranorientierung der TMHs führt zu einer Oberflächenstruktur, die einem konkaven „handförmigen“ Hohlraum gleicht. Außergewöhnlich ist hierbei, dass die konkave Oberfläche mit einigen geladenen und polaren Aminosäuren ausgekleidet ist, deren Seitenketten frei zugänglich in die hydrophobe Lipiddoppelschicht exponieren.

TatC wurde auch mittels ortsgerichteter Mutagenesen in verschiedenen Organismen ausgiebig untersucht. Hierbei zeigte sich, dass bestimmte konservierte Aminosäuren in der N-terminalen Region und der ersten zytoplasmatischen Schleife (Region 1) eine bedeutende Rolle bei der Signalpeptid-Erkennung besitzen ^[122,131–139]. Interaktionsstudien mit TatB führten zu einer weiteren potentiellen TatB-Bindungsstelle an der kurzen fünften TMH von TatC (Region 2) ^[132,140,141]. Im Zentrum der konkaven Tasche besitzt TatC zudem eine konservierte Glutaminsäure (E₁₆₅ in *A. aeolicus* TatC, E₁₇₀ in *E. coli* TatC), deren Substitution zu einer Beeinträchtigung der Translokaseeffizienz führt und somit möglicherweise eine funktionelle Bedeutung besitzen könnte ^[132,134,142].

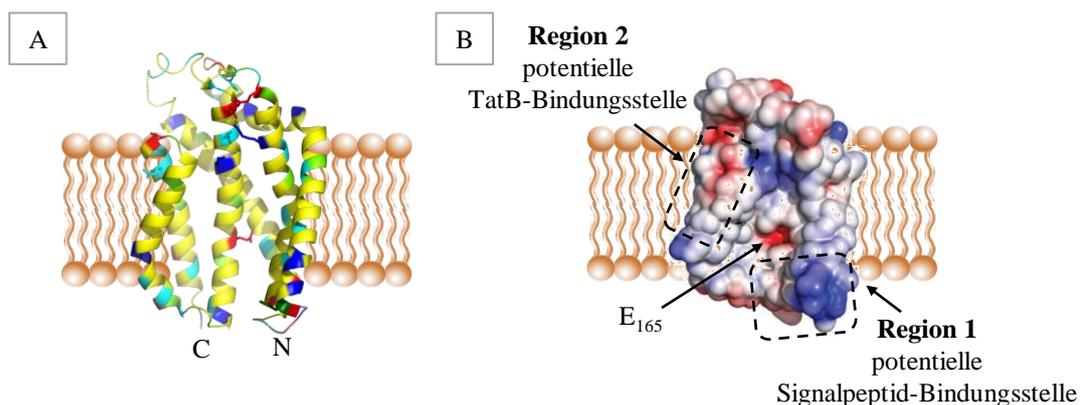


Abbildung 7 Struktur von *A. aeolicus* TatC

A: Bänderdarstellung von *A. aeolicus* TatC basiert auf Röntgenkristallographiedaten. **B:** Oberflächendarstellung von *A. aeolicus* TatC gleicht einem konkaven „handförmigen“ Hohlraum. Geladene Aminosäuren sind farbig gekennzeichnet (blau – kationisch, rot – anionisch). Region 1 und 2 stellen potentielle Signalpeptid- und TatB-Bindungsstellen dar, welche auf Mutations- und Interaktionsstudien basieren. Abbildung verändert übernommen aus ^[129].

1.3.2 Funktion der Komponenten des Tat-Systems

Die einzelnen Tat-Komponenten wurden ausgehend von ihrer Entdeckung detailliert studiert, um Rückschlüsse über ihre Funktion beim Translokationsprozess zu erlangen. Basierend auf Mutagenese- und Interaktionsstudien an TatC wird diesem Protein eine Rezeptorfunktion zugeschrieben, wobei es die Erkennung und Bindung des Substrates über dessen Signalpeptid übernehmen soll ^[122,131–139,143]. In Organismen, in denen TatB vertreten ist, soll TatC zudem mit diesem assoziieren und einen funktionellen TatBC-Erkennungskomplex bilden ^[135,136,144–146]. Des Weiteren liegen auch zahlreiche experimentelle Befunde vor, welche eine Interaktion von TatB mit TatC und dem Signalpeptid belegen ^[132,137,138,141,147–149]. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen beispielsweise einen TatBC-Erkennungskomplex, der bis zu zwei Substratmoleküle binden kann ^[149]. Darüber hinaus deuten Interaktionsstudien auch auf eine Wechselwirkung des TatBC-

Komplexes mit TatA hin ^[145]. Hierzu zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen mittels Negativkontrastierung einen zylindrischen isolierten *E. coli* TatAB-Komplex mit einem hohen Überschuss an TatA, dessen Größe im Bereich von ungefähr 600 kDa liegt ^[150]. TatB wird daher eine Art Vermittlerrolle zwischen TatA und TatC zugeschrieben und TatA soll die porenbildende Funktion übernehmen ^[135]. Das hohe Expressionsniveau von TatA im Bakterium *E. coli* (20–25-fach höher als TatB, 50-fach höher als TatC und 50–200-fach höher als TatE) bekräftigt zudem die Annahme, dass TatA durch Selbstassemblierung die Translokationspore bildet ^[89]. Bislang ist jedoch noch nicht verstanden, weshalb TatB nur in einigen Organismen eine funktionelle Bedeutung besitzt, während es in einigen Gram-positiven Bakterien nicht existiert ^[53]. Auch die Komplexstruktur von TatA ist bislang noch nicht geklärt, obwohl dessen Oligomerisierungsverhalten schon weitreichend erforscht wurde. Zum Beispiel belegen BN-PAGE-Studien (*blue native – polyacrylamide gel electrophoresis*) *E. coli* TatA-Oligomere in einem Größenbereich von 70–600 kDa und *B. subtilis* TatA_d-Oligomere in einem Größenbereich von 50–170 kDa ^[144,151,152]. Kryoelektronenmikroskopische Aufnahmen von detergensolubilisiertem *E. coli* TatA ^[151] und *B. subtilis* TatA_d ^[153] führten ebenfalls zu Komplexstrukturen variabler Größe (siehe Abbildung 8). Die porenartigen *E. coli* TatA-Komplexe weisen eine hohe Heterogenität auf und besitzen Größen im Bereich von 130–390 kDa. Für *B. subtilis* TatA_d wurden hingegen kleinere asymmetrische Ringstrukturen mit konstanter Ringdicke gezeigt, deren Größen im Bereich von 70–120 kDa liegen. Diese Daten bekräftigen somit die Annahme, dass TatA eine flexible Translokationspore bildet, die sich der Substratgröße anpassen kann.

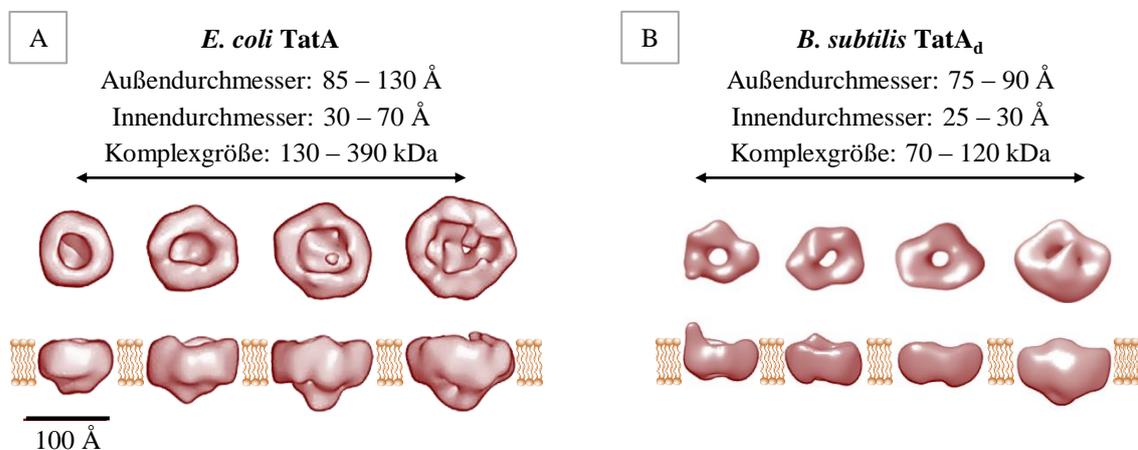


Abbildung 8 Dreidimensionale Dichtekarten von *E. coli* TatA und *B. subtilis* TatA_d

Dreidimensionale Dichtekarten basieren auf kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen und sind von der vertikalen und der seitlichen Betrachtungsweise gezeigt. **A:** Porenartige *E. coli* TatA-Strukturen. **B:** Ringförmige *B. subtilis* TatA_d-Strukturen. Abbildungen verändert übernommen aus ^[151,153].

Auch *in vivo* wurden große zirkuläre *E. coli* TatA-Oligomere mit Hilfe der Fluoreszenz-Elektronenmikroskopie nachgewiesen, welche sich über einen tetrameren Zwischenzustand bildeten und nur in Anwesenheit des TatBC-Komplexes lokalisiert werden konnten^[154]. Vernetzungsstudien in nativen *E. coli*-Membranen zeigen zudem nur TatA-Komplexe mit einem hohem Ordnungsgrad in Anwesenheit von TatB und TatC^[155].

In einigen Organismen konnte TatA neben einer membrangebundenen Form auch zytoplasmatisch in einer löslichen Form lokalisiert werden (*B. subtilis*^[156], *E. coli*^[157], *Streptomyces lividans*^[158], *Haloferax volcanii*^[159], Chloroplasten^[160]). Erstmals konnte diese lösliche Form beispielsweise im Gram-positiven Bakterium *B. subtilis* mit Hilfe der Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden^[156] (siehe Abbildung 9 A). Weitere Untersuchungen deuten zudem darauf hin, dass TatA in seiner löslichen Form auch zur homooligomeren Komplexbildung neigt. Elektronenmikroskopische Aufnahmen mittels Negativkontrastierung zeigen runde sowie längliche *B. subtilis* His₆-TatA_d-Strukturen mit einem Durchmesser von 12 nm und 25 nm^[161] (siehe Abbildung 9 B). Hierbei wurde vorgeschlagen, dass TatA_d eine Art Proteinmicellenstruktur bildet, bei der sich die hydrophoben TMHs im Proteinkern ansammeln und durch die APHs von der Umgebung abgeschirmt werden^[161]. Elektronenmikroskopiestudien mit zytoplasmatischem *E. coli* TatA führten zu röhrenförmigen, hexagonal angeordneten Strukturen, welche oft in Kontakt mit den Zellpolen lokalisiert wurden^[157]. Die Bildung dieser TatA-Röhren, welche einen Außendurchmesser von 11,5 nm und einen Innendurchmesser von 6,7 nm besitzen, erforderte jedoch die Anwesenheit von TatC. Darüber hinaus belegen Vernetzungs- und Interaktionsstudien eine intrinsische Affinität von löslichem TatA zu den Tat-abhängigen Substraten^[156,162-164]. Daher wird TatA neben seiner membrangebundenen porenbildenden Funktion auch eine zytoplasmatische Chaperonfunktion zugeschrieben, wobei es die Substrate an die Membran führen soll.

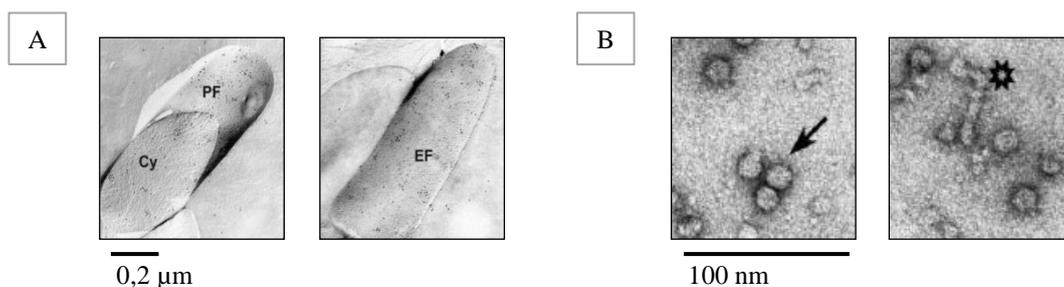


Abbildung 9 Lösliche Form von *B. subtilis* TatA_d

A: Lokalisierung von TatA_d in *B. subtilis*-Zellen mit Hilfe der Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie (PF = Protoplasmafläche; Cy = Zytoplasma; EF = Exoplasmafläche). **B:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen mittels Negativkontrastierung von löslichen globulären (Pfeil) und wurmförmigen (Stern) *B. subtilis* His₆-TatA_d-Komplexen. Abbildungen verändert übernommen aus^[156,161].

1.4 Mechanismus der Tat-abhängigen Proteintranslokation

Die spezifischen Funktionen der Tat-Komponenten lassen sich in einem Konsensus-Mechanismus zusammenfassen, dessen molekulare Details jedoch noch weitgehend unbekannt sind ^[12,85,111] (siehe Abbildung 10). Nach diesem Modell werden Tat-abhängige Substrate mit einem fusionierten Signalpeptid synthetisiert, welches das charakteristische Doppel-Arginin-Sequenzmotiv trägt. TatC assoziiert mit TatB zu einem TatBC-Erkennungskomplex und bindet daraufhin das Substrat über dessen Signalpeptid. Nach dieser Substratbindung werden durch den TatBC-Komplex TatA-Monomere rekrutiert, welche ebenfalls mit TatB und TatC interagieren. Diese Interaktion initiiert eine Assemblierung von TatA zu einer homooligomeren Translokationspore variabler Größe, die sich dem Substratdurchmesser anpassen kann ^[151]. Nachdem das Substrat die Membran passiert hat, wird das Signalpeptid von einer Signalpeptidase abgespalten und der Multiproteinkomplex dissoziiert.

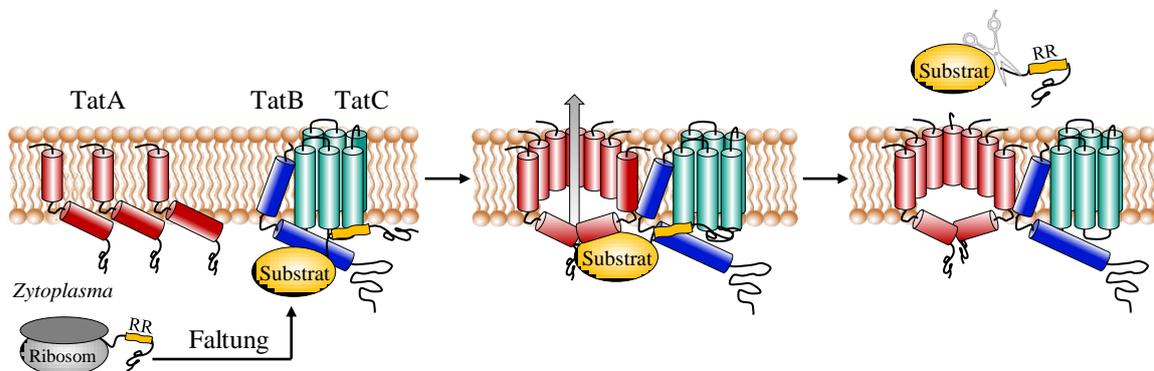


Abbildung 10 Konsensus-Mechanismus der Tat-abhängigen Proteintranslokation

Substrate (orange) werden mit einem Tat-abhängigen fusionierten Signalpeptid synthetisiert und falten sich zytoplasmatisch. TatC (grün) assoziiert mit TatB (blau) zu einem TatBC-Erkennungskomplex, welcher das Substrat bindet und die Bildung der Translokationspore durch mehrere TatA-Monomere (rot) initiiert. Nach erfolgreicher Translokation spaltet eine Signalpeptidase (Schere) das Signalpeptid ab und der Multiproteinkomplex dissoziiert. Abbildung verändert übernommen aus ^[129,130].

1.4.1 Energetisierung der Tat-abhängigen Proteintranslokation

Das Tat-System wird im Gegensatz zu vielen anderen Translokasen durch die PMF und nicht durch die ATP-Hydrolyse angetrieben ^[19,25,165,166]. Es wird angenommen, dass die Bildung des TatBC-Komplexes sowie die Erkennung und Bindung des Substrates energieunabhängige Prozesse sind ^[25,135,167–170]. Bei der Porenbildung wird hingegen von einem energiegetriebenen Prozess ausgegangen ^[25,135,167,168]. Fraglich ist hierbei nur, ob die Oligomerisierung der TatA-Monomere auch energieabhängig ist ^[18]. Im aktiven Translokationszustand bildet TatA einen transienten oligomeren Komplex, der bei Entfernung

des Protonengradienten innerhalb von Sekunden zerfällt ^[18,45,171,172]. Hingegen konnten *in vivo* auch stabile TatA-Oligomere in Abwesenheit eines Protonengradienten lokalisiert werden ^[154,171]. Ob die Translokation des Substrates und die Dissoziation des Multiprotein-komplexes energieabhängig sind, ist bislang noch nicht geklärt ^[170].

Auch stellt sich bislang die entscheidende Frage, in welchem Ausmaß der Protonengradient, und das sich daraus bildende elektrische Membranpotential beim Transport involviert sind. Eine verminderte Transporteffizienz in Abhängigkeit eines limitierten Protonenflusses sprach schon frühzeitig für einen Prozess, der vom Protonengradienten abhängig ist ^[27]. Dies führte zu der Hypothese eines möglichen Substrat-Protonen-Antiport-Mechanismus ^[173]. Auch bekräftigte eine Beeinträchtigung der Transporteffizienz oder eine völlige Blockade des Systems durch Einsatz Protonengradienten-zerstörender Moleküle den hohen Einfluss des Protonengradienten ^[166,170,174–178]. Ein *in vivo*-Nachweis eines Transports in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*, welcher nicht vom Protonengradienten abhängt, führte hingegen zu einer ersten Mitberücksichtigung des elektrischen Membranpotentials ^[173,179]. Ausgehend von dieser Entdeckung sprachen auch weitere *in vitro*-Studien dem elektrischen Membranpotential eine weitaus größere Bedeutung zu, als ursprünglich angenommen ^[180,181].

1.4.2 Bildung des Translokationspore

Die Bildung der Translokationspore durch eine Homooligomerisierung von TatA stellt einen entscheidenden Schritt des Translokationsprozesses dar. Wichtige Aspekte, wie die Porenbildung oder die Struktur der Pore, sind bislang noch weitgehend ungeklärt. Auch stellt sich noch die entscheidende Frage, über welchen Mechanismus TatA assembliert. Oligomerisierungsstudien ^[182,183] erbrachten Hinweise, dass die TMHs von TatA miteinander interagieren und sich aneinanderreihen. Zudem deuten BN-PAGE-Daten darauf hin, dass ein konserviertes saures DDE-Motiv, welches C-terminal an die APH angrenzt, eine wichtige Rolle bei der Oligomerisierung von TatA besitzt ^[182]. In unserem Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Anne S. Ulrich konnte durch Sequenzanalysen gezeigt werden, dass TatA-Proteine eine auffallend hohe Ladungsdichte besitzen, während ihre Nettoladung annähernd neutral ist ^[184] (siehe Tabelle 1). Die Ladungen der APH sind komplementär zu einem dicht geladenen Teil der C-terminalen Region, welche als DCR (*densely charged region*) bezeichnet wurde. Diese Ladungskomplementarität existiert ebenfalls im TatA-Homolog *E. coli* TatE, jedoch nicht in *E. coli* TatB und seinem pflanzlichen Homolog Hcf106.

zurück und die TatA_d-Monomere assemblieren über fünf weitere intermolekulare Salzbrücken miteinander (siehe Abbildung 11 D und 11 E). Die Zuordnung der Salzbrücken basierte auf BN-PAGE-Studien diverser TatA_d-Mutanten ^[152,184].

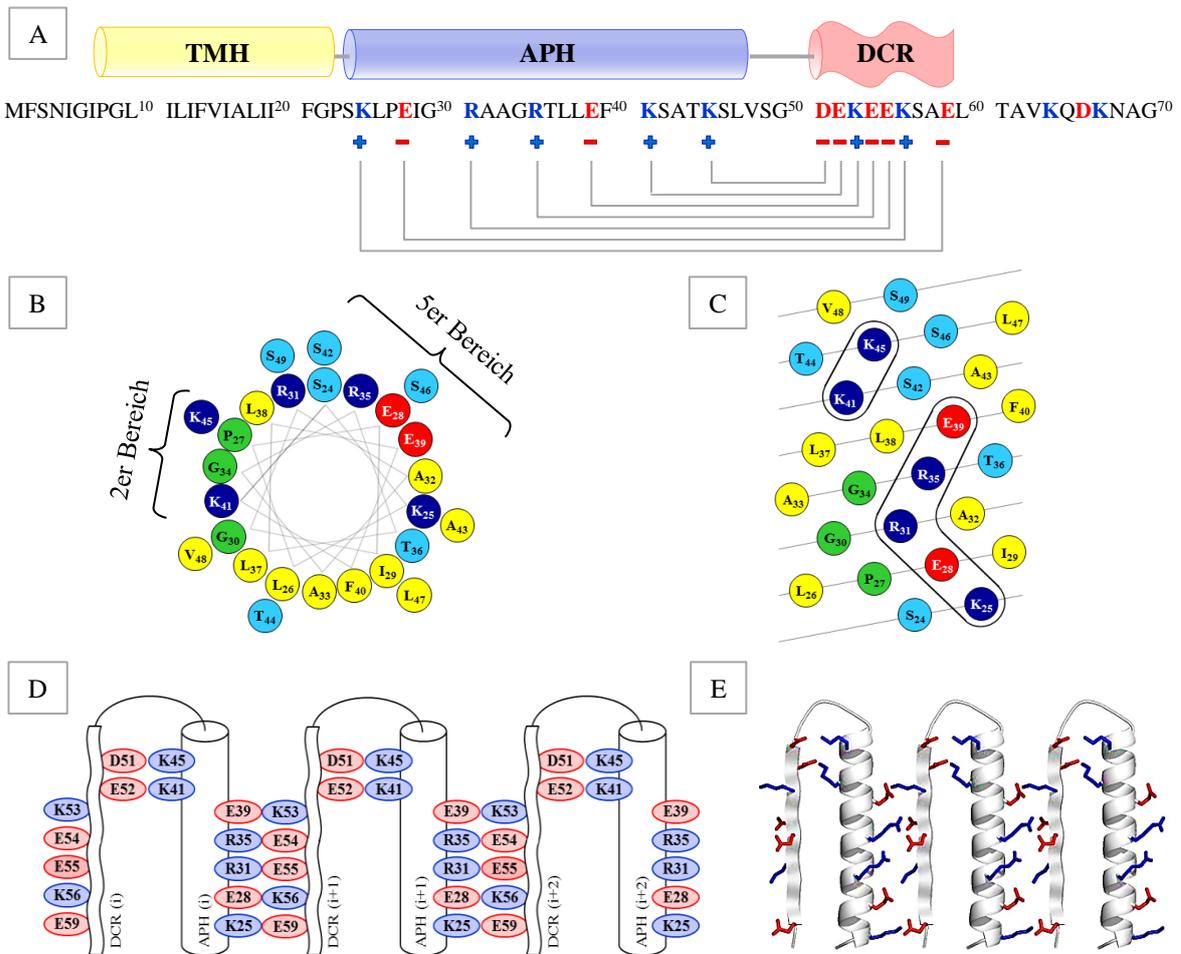


Abbildung 11 Homooligomerisierung von *B. subtilis* TatA_d nach der „Charge-Zipper“-Hypothese

A: Aminosäuresequenz von *B. subtilis* TatA_d mit Darstellung der komplementär geladenen Aminosäuren. **B** und **C:** Helixrad- und flache Projektion der APH-Oberfläche von *B. subtilis* TatA_d mit gekennzeichneten räumlich getrennten Ladungsbereichen. **D** und **E:** Schematische und Bänderdarstellung der Homooligomerisierung von drei TatA_d-Monomeren über Salzbrücken. Die DCR der einzelnen TatA_d-Monomere faltet sich über zwei intramolekulare Salzbrücken haarnadelförmig auf die APH zurück und benachbarte TatA_d-Monomere assemblieren über fünf intermolekulare Salzbrücken. Farbcodierung der Aminosäuren: Gelb – hydrophob (L, I, V, F, A), rot – anionisch (D, E), blau – kationisch (K, R), cyan – polar (S, T), grün – Helix Modifikatoren (P, G). Abbildungen verändert übernommen aus ^[184].

Da für eine Salzbrückenbildung die Länge der APH und der DCR möglichst identisch sein sollte, wurde eine β -Faltblattstruktur der DCRs bei der Assemblierung vorgeschlagen. Durch eine solche Struktur hätte die DCR eine identische Länge wie die APH von 31,5 Å und könnte eine Biomembran mit einer typischen Länge von 30 Å gut durchspannen, wodurch eine Öffnung der Translokationspore erklärt werden könnte. In einer β -Faltblattstruktur besitzen die C _{β} -C _{γ} -Bindungen der Aminosäuren eine freie Rotierbarkeit, wodurch

sich die Seitenketten nach rechts oder links zur nächstgelegenen komplementär geladenen Aminosäure ausrichten könnten. Daher wäre auch eine Torsionsspannung entlang des β -Faltblattrückgrats auszuschließen und die DCRs könnten bei der Assemblierung flexibel bleiben. Durch eine solche Assemblierung würde eine TatA_d-Palisade entstehen, bei der die über Salzbrücken verknüpften DCR-APH-Haarnadelschleifen auf der Membranoberfläche liegen und eine hydrophile Interaktionsstelle für das Substrat bieten (siehe Abbildung 12). Die entstehende Ladungsneutralität durch die Salzbrückenbildung würde außerdem eine Insertion der DCR-APH-Haarnadelschleifen in die Membran ermöglichen. Dieses bislang einzige konkrete Assemblierungsmodell von TatA_d lässt jedoch die Frage offen, welche Form der Translokationskanal besitzt. Die TatA_d-Palisade könnte sich in Form einer Pore um das Substrat anordnen oder es könnte ein Spalt in der Membran durch zwei TatA_d-Palisaden gebildet werden. Ein solcher Membranspalt könnte entweder in einer „front-to-front“-Orientierung der TatA_d-Palisaden durch einen Einklappmechanismus der APHs entstehen oder sich in einer „back-to-back“-Orientierung der TatA_d-Palisaden durch einen Kippmechanismus ausbilden. In jedem Fall würde durch die Insertion der ladungsneutralen APH-DCR-Haarnadelschleifen ein transienter hydrophiler Kanal entstehen, der sich dem Substratdurchmesser anpassen könnte.

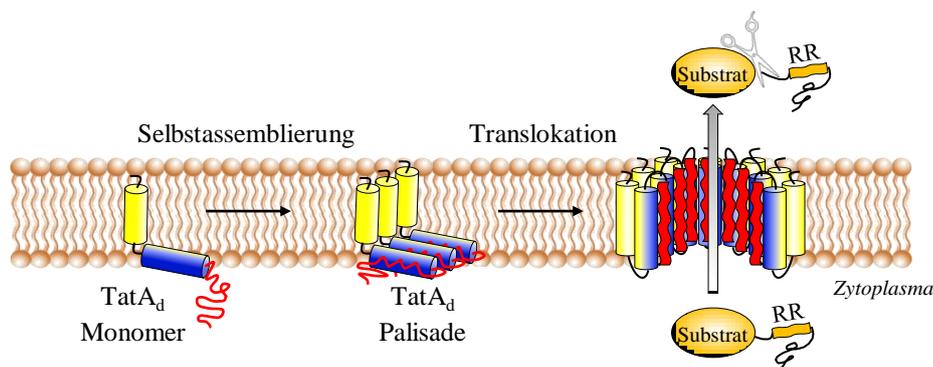


Abbildung 12 Bildung der Translokationspore über den „Charge-Zipper“-Mechanismus

TatA_d-Monomere assemblieren über intra- und intermolekulare Salzbrücken zu einer TatA_d-Palisade. Die verknüpften APH-DCR-Haarnadelschleifen können aufgrund der entstehenden Ladungsneutralität in die Membran einklappen, wodurch eine Translokationspore mit hydrophiler Auskleidung für den Substrattransport gebildet wird. Abbildung verändert übernommen aus ^[184].

Dieser Assemblierungsmechanismus ist auch mit weiteren Modellen kompatibel, welche den Translokationsprozess näher beschreiben. So lässt er sich beispielsweise mit dem sogenannten „Falltürmechanismus“ vereinen, mit welchem erstmals ein Einklappen der APHs in die Membran von Gouffi *et al.* vorgeschlagen wurde ^[120]. Dieser Mechanismus gründete auf dem experimentellen Befund einer peri- sowie zytoplasmatischen Angreifbarkeit der APH von TatA. Durch eine Membraninsertion der APHs während des Translokations-

prozesses lässt sich eine solche duale Topologie der Helix erklären^[119,120]. Auch ist es prinzipiell mit Modellen kompatibel, welche bei der Porenbildung von einer Membrandestabilisierung durch eine Ansammlung der TMHs von TatA ausgehen. Diese Ansammlung könnte nach der „Charge-Zipper“-Hypothese durch eine Homooligomerisierung von TatA erklärt werden. Eine Membrandestabilisierung wurde erstmals von Brüser *et al.* vorgeschlagen^[185] und erst kürzlich von Rodriguez *et al.*^[107] erweitert (siehe Abbildung 13). Der TMH von TatA, welche zu kurz für eine membrandurchspannende Orientierung ist und daher die APH teilweise mit in die Membran zieht, wird hierbei eine bedeutende Rolle zugeschrieben. Die Initiierung der Translokationsporenbildung wird durch eine Interaktion eines TatA-Oligomers mit dem TatBC-Komplex beschrieben, wobei dessen kurze TMHs in die Membran hineingezogen werden. Diese Umorientierung der TatA-Protomere bewirkt aufgrund der geladenen N-Termini und einer konservierten polaren Aminosäure am N-terminalen Ende der TMHs (Q₈ bei *E. coli* TatA) eine Deformation und Ausdünnung der Membran, welche letztendlich zum Zerreißen der Lipiddoppelschicht führt.

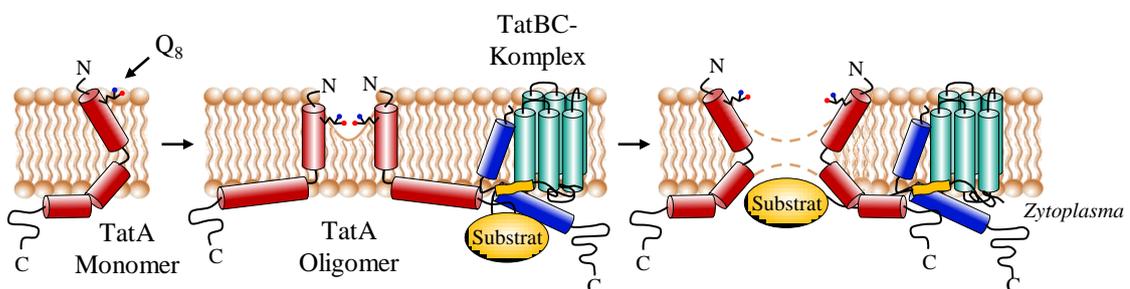


Abbildung 13 Bildung der Translokationspore durch eine Membrandestabilisierung

Im monomeren Zustand liegt TatA (rot) in einer Orientierung vor, bei der dessen kurze TMH die APH teilweise mit in die Membran zieht. Durch eine Interaktion mit dem TatBC-Komplex (TatB – blau; TatC – grün) wird die Oligomerisierung mehrerer TatA-Monomere zu einer Translokationspore initiiert. Hierbei werden die TMHs des TatA-Oligomers verstärkt in die Membran hineingezogen, wodurch eine Ausdünnung der Membran entsteht, die letztendlich zum Zerreißen der Lipiddoppelschicht führt. Abbildung verändert übernommen aus^[107].

1.4.3 Interaktion zwischen TatA und TatC

Die Initiierung des Translokationsprozesses wird bislang durch eine Interaktion von TatA mit dem TatBC-Erkennungskomplex beschrieben^[12,85]. Es ist jedoch noch nicht bekannt, über welchen molekularen Mechanismus diese Interaktion erfolgt und wie die PMF diesen Prozess energetisiert. Die Aufklärung der Kristallstruktur von *A. aeolicus* TatC^[129] ermöglichte erst kürzlich konkretere Überlegungen über potentielle Interaktionsmodelle der Tat-Komponenten. So beschäftigte sich auch unser Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Anne S. Ulrich (KIT) eingehend mit den außergewöhnlichen Merkmalen der TatC-Struktur und

deren funktioneller Bedeutung. Basierend auf den Strukturdaten von *A. aeolicus* TatC modellierten wir in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Wolfgang Wenzel (KIT) Homologiemodelle von *B. subtilis* TatC_d und *E. coli* TatC (siehe Abbildung 14). Diese Modelle zeigen eine ähnliche globale Struktur der TatC-Proteine, bei der die Ladungsverteilung strukturell konserviert ist. Dies führte zu der Annahme, dass es sich hierbei um funktionell wichtige Interaktionsstellen beim Translokationsprozess handeln könnte.

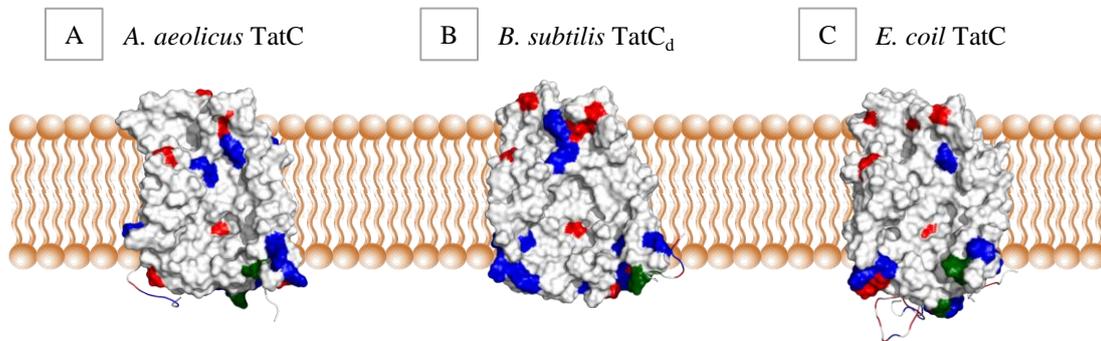


Abbildung 14 Homologiemodelle von TatC-Proteinen

A: Kristallstruktur von *A. aeolicus* TatC. **B:** Homologiemodell von *B. subtilis* TatC_d. **C:** Homologiemodell von *E. coli* TatC. Farbcodierung der strukturell konservierten Ladungsverteilung: Rot – anionisch (D, E), blau – kationisch (K, R), grün – ionisierbar (H, N-Terminus).

Basierend auf dieser konservierten Ladungsverteilung von TatC postulierten wir einen neuen Translokationsmechanismus. Dieses Modell basiert auf einer völlig neuartigen Hypothese, wie TatC, angetrieben durch den Protonengradienten, initial als eine Proteinflippase auf TatA wirkt und TatA die Protonen von der extra- zur intrazellulären Seite transportiert. Diese Interaktion verläuft über eine schrittweise Ausbildung mehrerer Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem N-Terminus von TatA und den konservierten geladenen Aminosäuren von TatC. Um diesen Mechanismus übersichtlicher zu beschreiben, führten wir eine Nomenklatur der funktionell relevanten Aminosäuren von TatC ein, welche in Abbildung 15 A–C am Beispiel von *B. subtilis* TatC_d gezeigt ist. Ausgangspunkt dieses Modells ist eine über den „Charge-Zipper“-Mechanismus verknüpfte TatA_d-Palisade^[184], bei der die TMHs in der Membran verankert sind. In einem ersten Schritt interagiert die führende TMH der TatA_d-Palisade an der Zugangsstelle (*access site*; A-Stelle), wobei die TMH in die Membran gezogen wird und eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem deprotonierten N-Terminus von TatA_d und der Asparaginsäure D₂₀₄ von TatC_d gebildet wird. Durch eine weitere Wasserstoffbrücke zwischen dem Asparagin N₄ von TatA_d und der Asparaginsäure D₂₀₈ von TatC_d, welche beide genau eine Helixwindung entfernt liegen, wird diese Koordination zusätzlich stabilisiert. Vernetzungsstudien zeigen hierzu auch eine Interaktion von TatA am periplasmatischen Ende der

fünftens TMH von TatC, welche sich ebenfalls in der Nähe des N-Terminus von TatA befindet ^[141]. In Organismen, in denen TatB existiert, könnte dessen N-Terminus initial an die A-Stelle von TatC binden und dessen N-terminale konservierte Glutaminsäure (E₈ bei *E. coli* TatB) eine Interaktionsstelle für den N-Terminus von TatA bieten.

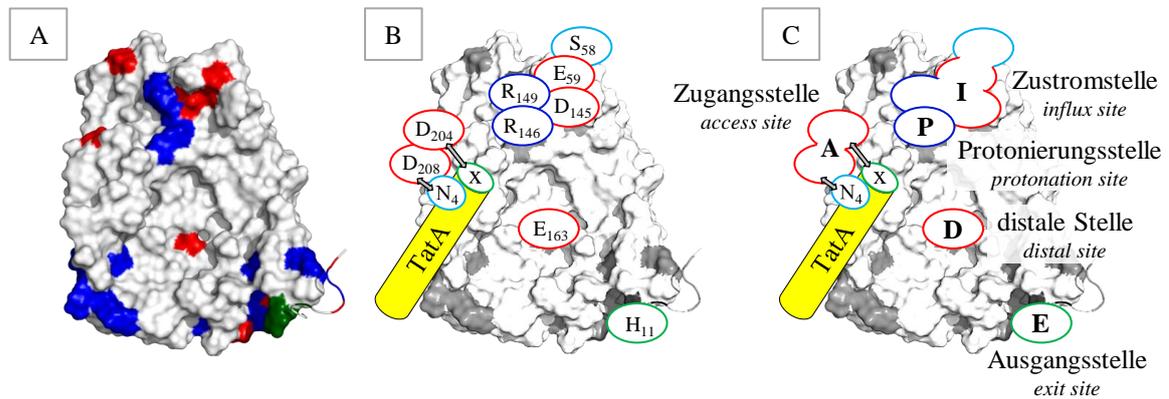


Abbildung 15 Darstellung der strukturell konservierten Aminosäuren von *B. subtilis* TatC_d

A: Homologiemodell von *B. subtilis* TatC_d. **B:** Schematische Darstellung der strukturell konservierten Aminosäuren von *B. subtilis* TatC_d. Die TMH von TatA (gelb) interagiert über ihren deprotonierten N-Terminus (x) und über ihr Asparagin N₄ mit TatC_d. **C:** Nomenklatur der für den Translokationsmechanismus relevanten TatC_d-Bereiche. Farbcodierung der strukturell konservierten Aminosäuren: Rot – anionisch (D, E), blau – kationisch (K, R), grün – ionisierbar (H, N-Terminus).

Anschließend bewegt sich die führende TMH der TatA_d-Palisade von der A-Stelle zur Protonierungsstelle (*protonation site*; P-Stelle) und wird dort durch das Arginin R₁₄₆ von TatC protoniert. Da die TatA_d-Protomere über die DCR-APH-Haarnadelschleifen miteinander verknüpft sind, werden die folgenden TMHs mitgezogen. Die P-Stelle wird über die Zustromstelle (*influx site*; I-Stelle), welche aus mehreren polaren und geladenen Aminosäuren (S₅₈, E₅₉, D₁₄₅, R₁₄₉) besteht, mit Protonen beliefert. Durch ein Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen können die extrazellulären Protonen über einen Grotthuß-Mechanismus an die P-Stelle transportiert werden. Nachdem der N-Terminus der führenden TMH protoniert wurde, werden alle weiteren Bewegungen unidirektional und irreversibel durch den Protonengradienten getrieben. Der protonierte N-Terminus wird in Richtung der distalen Stelle (*distal site*; D-Stelle) gezogen und trägt der PMF folgend das Proton in Richtung Zytoplasma. An der D-Stelle, welche genau im Zentrum der konkaven Tasche von TatC_d liegt, interagiert der protonierte N-Terminus mit der konservierten Glutaminsäure E₁₆₃. Beim Übergang von der D-Stelle zur Ausgangsstelle (*exit site*; E-Stelle) wird die TMH in einer flachen Orientierung auf der zytoplasmatischen Membranoberfläche fixiert. Hier wird der protonierte N-Terminus durch das konservierte Histidin H₁₁ von TatC_d stabilisiert und die TatA_d-Protomere können in einer intermediären oberflächengebundenen Orientierung an der Membranoberfläche entlassen werden (siehe Abbil-

dung 16). Diese „geflippte“ oberflächengebundene Orientierung induziert einen lateralen Druck in der zytoplasmatischen Monoschicht, der sich mit zunehmender TatA_d-Proto-merenanzahl erhöht. Ähnlich der Wirkung antimikrobieller Peptide könnte sich bei einem bestimmten Schwellenwert die Spannung in der Monoschicht auflösen^[186], wodurch die APH-DCR-Haarnadelschleifen kooperativ in die Lipiddoppelschicht einklappen könnten und eine Translokationspore mit hydrophiler Auskleidung bilden.

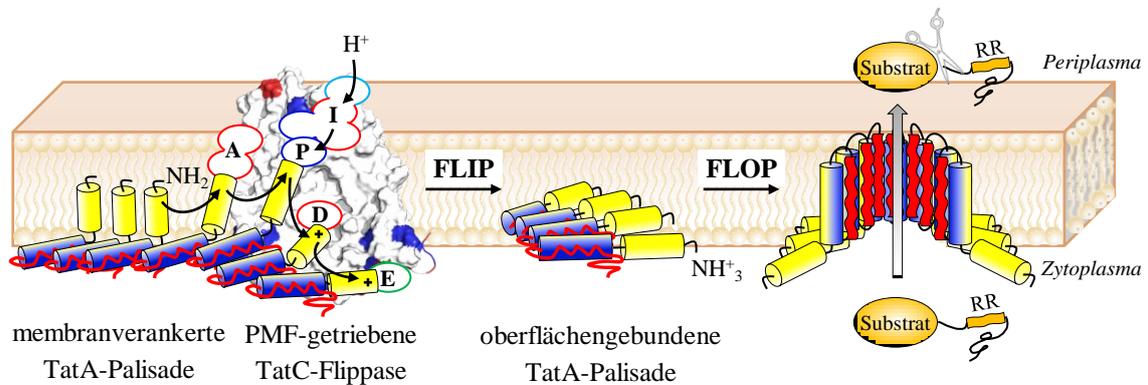


Abbildung 16 „TatC-Flippase“-Translokationsmechanismus

TatC wirkt als eine PMF-getriebene Proteinflippase auf eine TatA-Palisade, wodurch die membranverankerten TMHs von TatA in eine intermediäre oberflächengebundene Orientierung flippen. Die deprotonierten N-Termini von TatA interagieren mit den geladenen TatC-Bereichen, wobei sie durch TatC protoniert werden und die Protonen über die Zytoplasmamembran transportieren. Aufgrund des entstehenden lateralen Drucks in der Monoschicht wird eine kooperative Flop-Reaktion der APH-DCR-Haarnadelschleifen ausgelöst, wobei diese in die Membran einklappen und eine Translokationspore mit hydrophiler Auskleidung für den Substrattransport bilden.

2. Aufgabenstellung und Zielsetzung

Das Membranprotein TatA stellt eine Schlüsselkomponente der Tat-abhängigen Proteintranslokase dar^[18,45]. Es interagiert zytoplasmatisch in einer löslichen Form mit dem Tat-abhängigen Substrat und führt dieses als eine Art Chaperon an die Membran^[156-163]. In seiner membrangebundenen Form interagiert es mit dem Membranprotein TatC und bildet letztendlich die Translokationspore aus^[12,85]. Um nähere Einblicke über die Struktur und Funktion dieses Proteins zu erlangen, lag der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit in einer Charakterisierung der löslichen Form und in einer detaillierten Analyse der membrangebundenen Form des Proteins TatA_d aus *B. subtilis*.

Für die Charakterisierung der löslichen Form von TatA_d sollte zuerst die ungewöhnliche Löslichkeit dieses Membranproteins erforscht werden. Anschließend sollte mit Hilfe biophysikalischer Methoden wie der dynamischen Lichtstreuung, der analytischen Ultrazentrifugation und der Größenausschluss-Chromatographie die Größe der löslichen TatA_d-Komplexe unter nicht-denaturierenden Bedingungen bestimmt werden.

In seiner membrangebundenen Form ist TatA über seine kurze transmembrane α -Helix (TMH) in der Membran verankert und dessen amphiphile Helix orientiert sich auf der Membranoberfläche^[127]. Basierend auf der erst kürzlich veröffentlichten Kristallstruktur von TatC aus *A. aeolicus*^[129] postulierten wir zu Beginn dieser Studie einen neuen Translokationsmechanismus für den Tat-abhängigen Transport. Dieses Modell basiert auf einer völlig neuartigen Hypothese, wie TatC, angetrieben durch den Protonengradienten, als eine Proteinflippase auf die kurze TMH von TatA wirkt. Hierbei wird der N-Terminus von TatA durch TatC protoniert, wodurch die TMH an die Membranoberfläche „flippt“. Durch diese Konformationsänderung nimmt TatA intermediär eine flach gestreckte, oberflächengebundene Orientierung ein, bevor es die Translokationspore ausbildet. Um einen ersten Beweis für diese Hypothese zu erbringen, sollte das „Herausflippen“ der TMH von TatA_d experimentell belegt werden. Die Festkörper-NMR- und SR-OCD-Spektroskopie eignen sich sehr gut, um die Lage einer α -Helix bezüglich einer Membran zu bestimmen. Aus diesem Grund sollte mit Hilfe dieser beiden Methoden untersucht werden, ob durch geeignete Wahl der Systembedingungen oder durch minimale strukturelle Veränderungen der Proteinstruktur ein „Herausflippen“ der TMH auch in Abwesenheit von TatC und ohne einen Protonengradienten induziert werden kann.

Der Wildtyp TatA₂₋₇₀ besteht aus einer TMH (TatA₈₋₂₃), einer APH (TatA₂₄₋₄₈) und einer weitgehend unstrukturierten C-terminalen Region. Als Ausgangspunkt der TatA_d-Mutanten wurde das Fragment TatA₂₋₄₅ gewählt, welches um die C-terminale Region verkürzt ist. Durch Einführung verschiedener Mutationen wurde die TMH dieses Fragments verkürzt beziehungsweise verlängert und dessen N-terminale Ladungsdichte erhöht. Um eine Verkürzung der TMH zu erreichen, wurde die hydrophobe Aminosäuresequenz LIL aus dem Transmembranbereich deletiert (TatA₂₋₄₅ ΔLIL). Verlängerungen der TMH wurden durch Leucin- und Alanininsertionen im Transmembranbereich erzeugt (TatA₂₋₄₅ 3er LAL, TatA₂₋₄₅ 5er LAL, TatA₂₋₄₅ 7er LAL). Zudem wurden die polaren und helixbrechenden Aminosäuren, die sich im N-terminalen Bereich befinden (S₃A, N₄A, G₆A, P₈A, G₉A), bei der Mutante TatA₂₋₄₅ 5er A durch Alanin ersetzt, wodurch die Ausbildung einer versteiften TMH ab Phenylalanin F₂ ermöglicht wurde. Um Mutanten mit einer erhöhten Ladungsdichte zu erzeugen, wurden Lysin-, Glutaminsäure- und Asparaginsäuresubstitutionen in der N-terminalen Region durchgeführt (TatA₂₋₄₅ F₂K, TatA₂₋₄₅ F₂E, TatA₂₋₄₅ F₂D, TatA₂₋₄₅ F₂D I₇D).

3.1.1 Proteinexpression der Tata-Konstrukte

Zur rekombinanten Darstellung der Proteine wurden die verschiedenen pET-28a(+)-Vektoren in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. Da die Proteine unter anderem für NMR-Experimente verwendet wurden, erfolgte die Expression uniform ¹⁵N-markiert in M9-Minimalmedium ^[188]. Für die Charakterisierung der löslichen Form von TatA₂₋₇₀ wurde der Wildtyp zusätzlich auch unmarkiert in Vollmedium exprimiert. Die Proteinexpressionen wurden bei 37 °C durchgeführt und die Induktion konstant bei einer optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 0,6–0,8 a. u. mit Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) eingeleitet.

Da Mutationen einen negativen Einfluss auf das Expressionsniveau besitzen können, wurden im Vorfeld Testexpressionen der TatA₂₋₄₅-Mutanten durchgeführt. Zur Dokumentation des Expressionsverlaufs wurden ab dem Zeitpunkt der Induktion stündlich Proben entnommen und Wachstumskurven erstellt. Hierzu vergleicht Abbildung 17 A den Expressionsverlauf von TatA₂₋₄₅ mit den Mutanten, welche eine verkürzte oder verlängerte TMH besitzen, und Abbildung 17 B vergleicht den Expressionsverlauf von TatA₂₋₄₅ mit den Mutanten, deren N-terminale Ladungsdichte erhöht wurde. Um die zeitliche Zunahme der Proteinmenge zu bestimmen, wurde anschließend eine SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis*) der Proben durchgeführt und nach einem

folgenden Western Blot-Verfahren die TatA₂₋₄₅-Mutanten über den His₆-Tag immunologisch detektiert (siehe Abbildung 17 C).

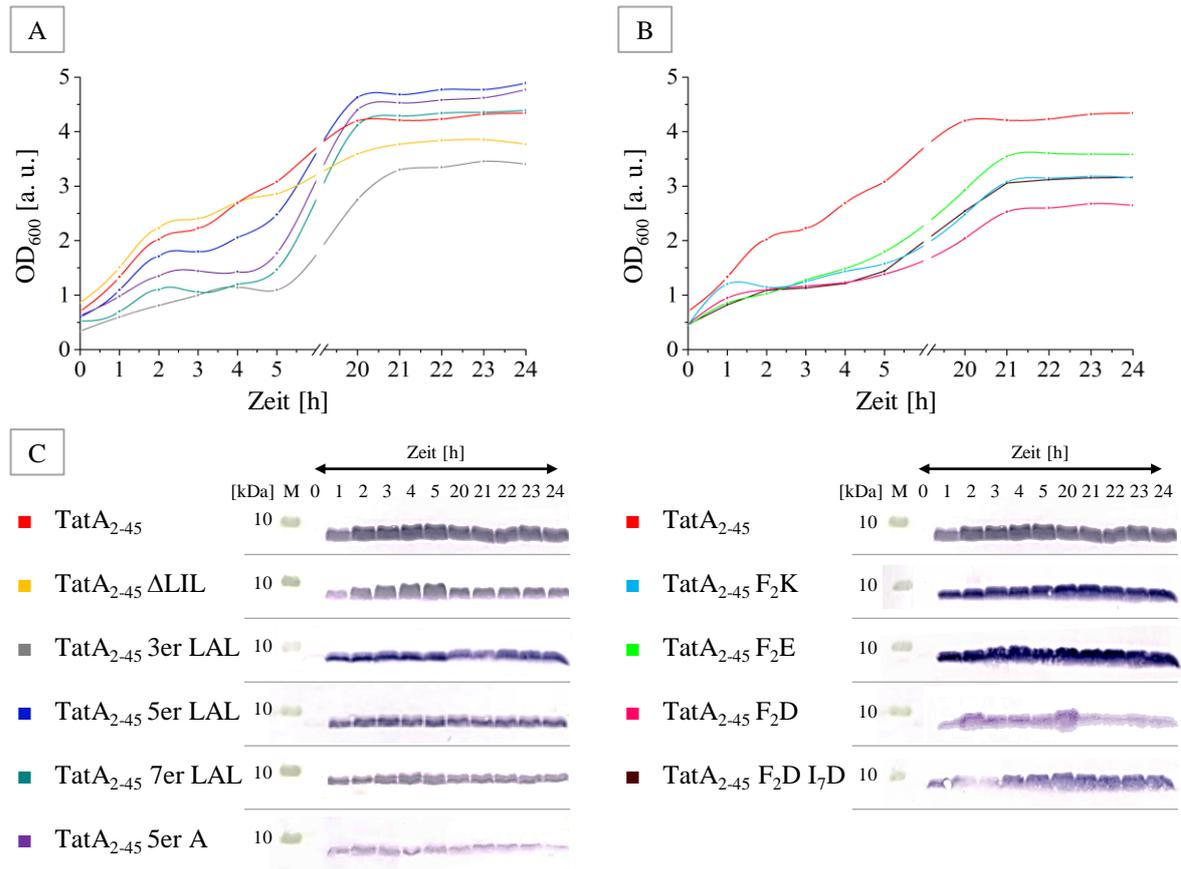


Abbildung 17 *E. coli*-Wachstumskurven der TatA₂₋₄₅-Mutanten mit zugehörigen Western Blots

A: *E. coli*-Wachstumskurven des Fragments TatA₂₋₄₅ und der TatA₂₋₄₅-Mutanten mit einer verkürzten oder verlängerten TMH. **B:** *E. coli*-Wachstumskurven des Fragments TatA₂₋₄₅ und der TatA₂₋₄₅-Mutanten mit einer erhöhten N-terminalen Ladungsdichte. **C:** Western Blots der Proteinexpressionen immunologisch detektiert über den His₆-Tag (M = Marker; 0 = Proben vor Zugabe des Induktors IPTG).

Die Wachstumskurven zeigen einen charakteristischen Kurvenverlauf einer Proteinexpression. Kurz nach der Induktion ist ein leichter Abfall der Wachstumsgeschwindigkeit zu erkennen, der sich durch die Stoffwechselumstellung der Zellen auf die Proteinexpression erklären lässt. Es ist deutlich zu erkennen, dass nach 24 h bei den Mutanten TatA₂₋₄₅ 5er LAL, TatA₂₋₄₅ 7er LAL und TatA₂₋₄₅ 5er A eine höhere Zelldichte als bei TatA₂₋₄₅ erreicht wird, wohingegen alle anderen Mutanten eine geringere Zelldichte aufweisen.

In den Western Blots sind vor der Induktion keine Banden zu erkennen, woraus sich schließen lässt, dass keine Basalexpression stattfindet (siehe Abbildung 17 C, Tasche 0). Der Western Blot von TatA₂₋₄₅ zeigt ab dem Zeitpunkt der Induktion kontinuierlich starke Banden, was für ein hohes Expressionsniveau spricht und mit vorangegangenen Daten im

Einklang steht ^[189]. Die Mutanten TatA₂₋₄₅ ΔLIL, TatA₂₋₄₅ 3er LAL, TatA₂₋₄₅ 5er LAL und alle Mutanten mit einer erhöhten N-terminalen Ladungsdichte führen zu einer vergleichbaren Bandenintensität wie TatA₂₋₄₅. Hingegen deuten die etwas schwächeren Banden der Mutante TatA₂₋₄₅ 7er LAL auf ein etwas geringeres Expressionsniveau hin. Der Western Blot der Mutante TatA₂₋₄₅ 5er A zeigt deutlich schwächere Banden und belegt somit eine schlechtere Proteinexpression und eine geringere Proteinausbeute. Die Bandenintensität bleibt bei allen Mutanten im Expressionsverlauf weitgehend konstant, und es ist selbst nach 24 h kein merklicher Proteinabbau zu erkennen. Demzufolge können alle Mutanten über Nacht exprimiert werden, wodurch eine größere Proteinausbeute aufgrund der höheren Zelldichte erzielt wird.

3.1.2 Aufreinigung der TatA-Konstrukte

Ausgehend von den Ergebnissen der Testexpressionen wurden alle TatA-Konstrukte bei 37 °C für 24 h im präparativen Maßstab exprimiert. Im Anschluss wurden die Zellen aufgeschlossen und die Zellplasma-, Zelltrümmer- und Membranfraktion (ZPF, ZTF, MF) getrennt ^[189]. Aus diesen Fraktionen wurde das Protein durch den fusionierten His₆-Tag über eine Nickelchelate-Affinitätschromatographie gewonnen. Daraufhin wurde der His₆-Tag durch eine BrCN-Spaltung entfernt und durch eine subtraktive Nickelchelate-Affinitätschromatographie vom Protein getrennt. Bei dieser zweiten Aufreinigung eluierte das gespaltene Protein ohne His₆-Tag im Durchfluss. Das am Säulenmaterial gebundene ungespaltene His₆-Tag-Protein und der His₆-Tag wurden anschließend durch einen Elutionspuffer mit erhöhter Imidazolkonzentration vom Säulenmaterial verdrängt.

Um die erfolgreiche Abspaltung und Abtrennung des His₆-Tags zu überprüfen, wurde eine SDS-PAGE der gesammelten Fraktionen durchgeführt und nach einem folgenden Western Blot-Verfahren das Protein immunologisch detektiert. Die SDS-PAGE Ergebnisse einer solchen subtraktiven Nickelchelate-Affinitätschromatographie sind exemplarisch von einer Aufreinigung von unmarkiertem TatA₂₋₇₀ in Abbildung 18 gezeigt. Um zwischen ungespaltenem His₆-TatA₂₋₇₀ und gespaltenem TatA₂₋₇₀ klar zu unterscheiden, wurden ein polyclonaler TatA_d-Antikörper und ein monoklonaler His₆-Tag-Antikörper verwendet.

Der Western Blot, der mit dem His₆-Tag-Antikörper inkubiert wurde, zeigt erwartungsgemäß keine Banden der Durchflussfraktionen (siehe Abbildung 18 B, Tasche 2.–4.). Dies spricht für eine erfolgreiche Abspaltung und Abtrennung des His₆-Tags. Durch den TatA_d-Antikörper wird aufgereinigtes TatA₂₋₇₀ in den Durchflussfraktionen der Membran-, Zelltrümmer- und Zellplasmafraktion identifiziert (siehe Abbildung 18 C, Tasche 2.–4.).

Es ist deutlich zu erkennen, dass nur wenig TatA₂₋₇₀ in der Zellplasmafraktion vorhanden ist, welches höchstwahrscheinlich aus der löslichen TatA_d-Fraktion der Zelle stammt. Im Gegensatz zum Wildtyp TatA₂₋₇₀ konnten die TatA₂₋₄₅-Mutanten, deren C-terminale Region entfernt wurde, meist nur in der Membran- und der Zelltrümmerfraktion lokalisiert werden. Bei hohen Proteinkonzentrationen ist zusätzlich eine Bande bei 15 kDa zu erkennen, welche durch eine Dimerbildung des Proteins erklärt werden kann. Die Elutionsfraktionen zeigen in beiden Western Blots Banden von ungespaltenem His₆-TatA₂₋₇₀, was für eine unvollständig abgelaufene BrCN-Spaltung spricht (siehe Abbildung 18 B und 18 C, Tasche 5.–7.). Die zusätzlichen Banden im Größenbereich von 17–26 kDa deuten zudem darauf hin, dass auch His₆-TatA₂₋₇₀ zur Bildung oligomerer Komplexe neigt.

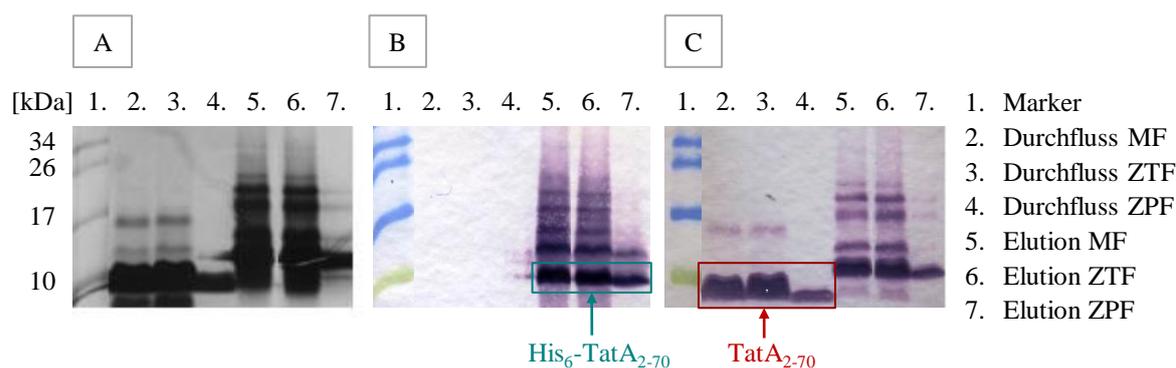


Abbildung 18 SDS-Gel und Western Blots einer Aufreinigung von TatA₂₋₇₀

A: SDS-Gel der Fraktionen von einer subtraktiven Nickelchelate-Affinitätschromatographie von TatA₂₋₇₀. **B:** Western Blot der Fraktionen von einer subtraktiven Nickelchelate-Affinitätschromatographie von TatA₂₋₇₀ immunologisch detektiert über den His₆-Tag. **C:** Western Blot der Fraktionen von einer subtraktiven Nickelchelate-Affinitätschromatographie von TatA₂₋₇₀ immunologisch detektiert über TatA_d. MF = Membranfraktion; ZTF = Zelltrümmerfraktion; ZPF = Zellplasmafraktion.

3.1.3 Charakterisierung der TatA-Konstrukte

Die TatA-Konstrukte wurden im Anschluss an einen Dialyseschritt durch Lyophilisation in Form eines weißen Proteinpulvers gewonnen. Um die Reinheit der Proteine zu überprüfen, wurde eine SDS-PAGE durchgeführt (siehe Abbildung 19).

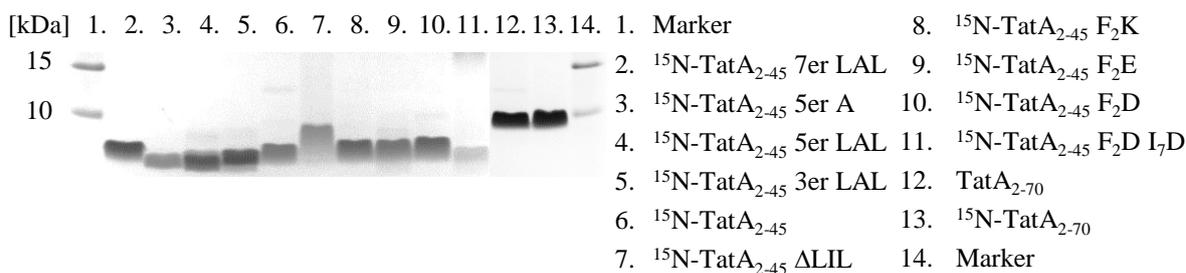


Abbildung 19 SDS-Gel der aufgereinigten TatA-Konstrukte

SDS-Gel aller unmarkierten und markierten TatA-Konstrukte nach der Abtrennung des His₆-Tags.

Das SDS-Gel zeigt die Banden der TatA₂₋₄₅-Mutanten unterhalb der 10 kDa-Markerbande und die Banden der TatA₂₋₇₀-Konstrukte in Höhe der 10 kDa-Markerbande. Bei genauerer Betrachtung ist zum einen zu erkennen, dass die Mutante ¹⁵N-TatA₂₋₄₅ ΔLIL trotz des kleinsten Molekulargewichts von 4395,21 Da etwas höher läuft als alle anderen Mutanten (siehe Abbildung 19, Tasche 7.). Zum anderen laufen die Mutanten ¹⁵N-TatA₂₋₄₅ 7er LAL, ¹⁵N-TatA₂₋₄₅ 5er A und ¹⁵N-TatA₂₋₄₅ 5er LAL trotz ihres höheren Molekulargewichts etwas niedriger als TatA₂₋₄₅ (siehe Abbildung 19, Tasche 2.–4.). Ein solches Laufverhalten deutet darauf hin, dass diese Mutanten in SDS-Micellen möglicherweise eine andere Faltung als TatA₂₋₄₅ annehmen. Da das SDS-Gel keine weiteren signifikanten Banden durch Verunreinigungen aufweist, kann von einer hohen Reinheit aller TatA-Konstrukte ausgegangen werden.

Die TatA-Konstrukte wurden in Kooperation mit Herrn Dr. Sergii Afonin (KIT) auch mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie (*matrix assisted laser desorption ionisation – time of flight – mass spectrometry*) charakterisiert. Der Vergleich der detektierten Massen mit dem berechneten Molekulargewicht M_r ^[190] der Proteine (siehe Tabelle 3) bestätigte eine hohe Reinheit und eine erfolgreiche uniforme ¹⁵N-Markierung der TatA-Konstrukte.

TatA-Konstrukte	M_r [Da] unmarkiert	M_r [Da] uniform ¹⁵ N-markiert
TatA ₂₋₄₅ ΔLIL	4344,21	4395,21
TatA ₂₋₄₅ 5er A	4626,68	4679,68
TatA ₂₋₄₅ F ₂ D	4651,60	4705,60
TatA ₂₋₄₅ F ₂ D I ₇ D	4653,53	4707,53
TatA ₂₋₄₅ F ₂ E	4665,63	4719,63
TatA ₂₋₄₅ F ₂ K	4664,69	4719,69
TatA ₂₋₄₅	4683,69	4737,69
TatA ₂₋₄₈ 3er LAL	4981,09	5038,09
TatA ₂₋₅₀ 5er LAL	5165,32	5224,32
TatA ₂₋₅₂ 7er LAL	5349,56	5410,56
TatA ₂₋₇₀	7299,52	7384,52



Tabelle 3 Molekulargewicht der TatA-Konstrukte

3.2 Charakterisierung der löslichen Form von TatA

Das Protein TatA_d liegt neben einer membrangebundenen Form auch zytoplasmatisch in einer löslichen Form vor ^[156,164]. In dieser löslichen Form neigt es zur homooligomeren Komplexbildung und interagiert mit dem Tat-abhängigen Substrat ^[161,162]. Nachdem TatA₂₋₇₀ erfolgreich rekombinant dargestellt werden konnte, sollte dessen lösliche Form *in vitro* näher charakterisiert werden. Hierzu wurden in einem ersten Schritt Bedingungen gesucht, um das Protein zu lösen. Anschließend sollten neue Erkenntnisse über das Oligomerisierungsverhalten von löslichem TatA₂₋₇₀ erlangt werden. Hierzu wurde das Protein zum einen unter denaturierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE untersucht und zum anderen die Komplexgröße der löslichen TatA₂₋₇₀-Oligomere unter nicht-denaturierenden Bedingungen mit Hilfe der Größenausschluss-Chromatographie, der dynamischen Lichtstreuung und der analytischen Ultrazentrifugation bestimmt.

3.2.1 Bestimmung des Löslichkeitsverhalten von TatA₂₋₇₀

Um die lösliche Form von TatA₂₋₇₀ näher zu erforschen, wurde dessen Löslichkeitsverhalten in salzhaltigen Lösungen mit unterschiedlichem pH-Wert untersucht, da das Protein in Wasser nahezu unlöslich ist. Für diese Experimente wurden verschiedene biologische Puffer sowie verdünnte Salzsäure (HCl)- und Natriumhydroxid (NaOH)-Lösung verwendet. Um einen großen pH-Bereich abzudecken, wurden die Puffer Citrat, Bis(2-hydroxyethyl)-amino-tris(hydroxymethyl)-methan (Bis-Tris), Tris-(hydroxy-methyl-amino)methan (Tris) und Natriumphosphat (NaPi) gewählt. Zur Bestimmung der löslichen Proteinmenge wurde jede Probe nach dem Lösevorgang 15 min zentrifugiert und im Anschluss eine SDS-PAGE des Überstandes durchgeführt (siehe Abbildung 20). Als Referenzprobe wurde TatA₂₋₇₀ solubilisiert in SDS-Ladepuffer verwendet.

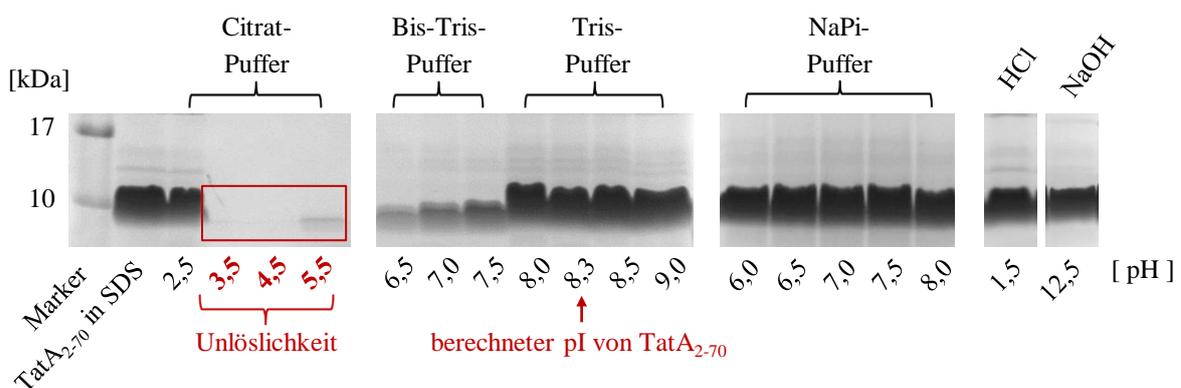


Abbildung 20 SDS-Gele der Löslichkeitsexperimente von TatA₂₋₇₀

SDS-Gele von TatA₂₋₇₀ gelöst in verschiedenen biologischen Puffern mit unterschiedlichem pH-Wert (Citrat, Bis-Tris, Tris, NaPi; 20 mM), in HCl-Lösung (25 mM) und in NaOH-Lösung (25 mM). Die Proteinbanden wurden mit einer Coomassie-Färbung detektiert.

Die SDS-Gele zeigen, dass TatA₂₋₇₀ eine auffallend hohe Löslichkeit in salzhaltigen Lösungen besitzt. Das Protein ist nur im pH-Bereich von 3,5–5,5 unlöslich und ab pH 6,5 steigt dessen Löslichkeit kontinuierlich an. Im stark sauren pH-Bereich sowie ab pH 8,0 ist das Protein vollständig löslich. Ein außergewöhnlicher Aspekt ist auch die Löslichkeit von TatA₂₋₇₀ bei pH 8,3. Dieser pH-Wert entspricht dem theoretisch ermittelten isoelektrischen Punkt des Proteins, welcher sich anhand der Aminosäuresequenz berechnen lässt^[190]. Bei diesem pH-Wert sollte TatA₂₋₇₀ eine neutrale Nettoladung besitzen und somit die geringste Löslichkeit aufweisen. Zur experimentellen Bestimmung des isoelektrischen Punktes wurden auch erste isoelektrische Fokussierungen durchgeführt. Diese deuten ebenfalls darauf hin, dass eine starke Abweichung zwischen dem experimentell bestimmten und dem theoretisch ermittelten isoelektrischen Punkt von TatA₂₋₇₀ besteht.

3.2.2 Bestimmung der Größe der löslichen TatA₂₋₇₀-Oligomere unter denaturierenden Bedingungen

Um die SDS-Gele der Löslichkeitsexperimente genauer zu untersuchen, wurden sie nach einer Coomassie-Färbung mit einer weiteren Silberfärbung behandelt. Diese Färbung weist eine 10–100-fach höhere Empfindlichkeit auf und besitzt eine Nachweisgrenze von 0,1–1 ng Protein pro mm² Bandenfläche^[191]. Sie beruht auf einer nicht-stöchiometrischen Komplexbildung der Silberionen mit den Glutaminsäure-, Asparaginsäure- und Cysteinsseitenketten der Proteine. Durch Zugabe von Formaldehyd werden die Silberionen unter stark alkalischen Bedingungen zu elementarem Silber reduziert, wodurch eine Schwärzung der Banden entsteht^[191].

Durch diese Silberfärbung konnte unter denaturierenden Bedingungen ein außergewöhnliches Bandenmuster für TatA₂₋₇₀ detektiert werden (siehe Abbildung 21). Die SDS-Gele zeigen neben einer starken Mono- und Dimerbande auch weitere schwache Banden im Größenbereich von 25–50 kDa und 70–200 kDa. Diese Banden lassen sich durch eine Homooligomerisierung von TatA₂₋₇₀ erklären und können aufgrund einer Lücke im Größenbereich von ungefähr 50–70 kDa in nieder- und hochmolekulare Oligomerbanden unterteilt werden. Die Detektion dieses Bandenmusters, trotz überschüssiger Detergenzugabe und Hitzedenaturierung, spricht für eine sehr hohe Komplexstabilität, auch wenn die Komplexe nur in sehr geringen Konzentrationen vorliegen. Bei genauerer Betrachtung ist außerdem unter sauren Bedingungen eine etwas stärkere Bandenintensität als unter basischen Bedingungen zu erkennen.

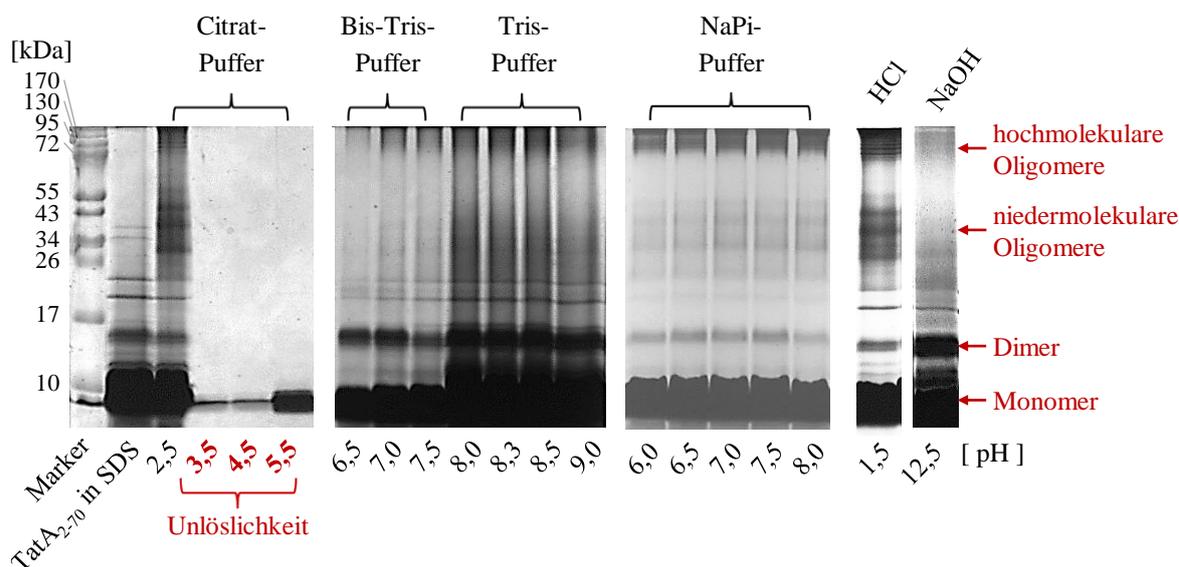


Abbildung 21 SDS-Gele der Löslichkeitsexperimente von TatA₂₋₇₀ nach einer Silberfärbung

SDS-Gele von TatA₂₋₇₀ gelöst in verschiedenen biologischen Puffern mit unterschiedlichem pH-Wert (Citrat, Bis-Tris, Tris, NaPi; 20 mM), in HCl-Lösung (25 mM) und in NaOH-Lösung (25 mM). Die Proteinbanden wurden mit einer Silberfärbung detektiert.

Dieses außergewöhnliche Bandenmuster wurde erstmals bei Löslichkeitsexperimenten von TatA₂₋₇₀ gelöst in einem Acetonitril (AN)/5 mM HCl (1 : 1)-Gemisch entdeckt (siehe Abbildung 22, Tasche 4.). Diese Experimente basierten auf vorangegangenen RP-HPLC-Studien (*reversed phase – high performance liquid chromatography*), welche den Hinweis erbrachten, dass TatA₂₋₇₀ unter diesen Bedingungen eluiert und somit in diesem Gemisch löslich sein sollte^[192].

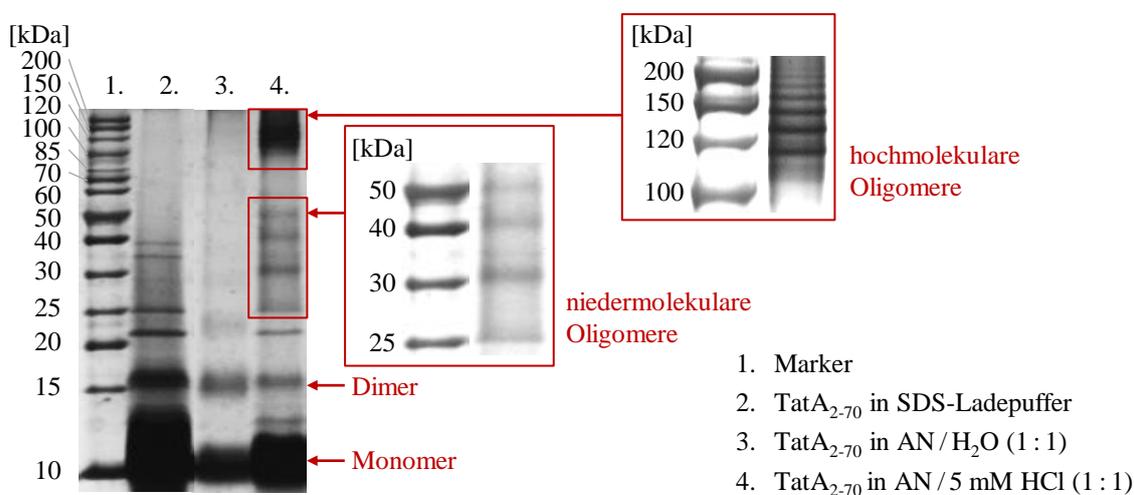


Abbildung 22 SDS-Gel von TatA₂₋₇₀ gelöst in verschiedenen Acetonitrilmischungen

SDS-Gel von TatA₂₋₇₀ gelöst in SDS-Ladepuffer, in einem AN/H₂O (1 : 1)-Gemisch und in einem AN/5 mM HCl (1 : 1)-Gemisch. Die Proteinbanden wurden mit einer Silberfärbung detektiert.

Das SDS-Gel zeigt deutlich, dass die nieder- und hochmolekularen Oligomerbanden mit Ausnahme der Dimerbande nur detektiert werden, wenn zum Lösen des Proteins 5 mM HCl zugesetzt werden (siehe Abbildung 22, Tasche 2.–4.). Somit sprechen auch diese Daten dafür, dass eine Säurezugabe die homooligomere Komplexbildung des Proteins begünstigt. TatA₂₋₇₀ läuft bei einer SDS-PAGE grundsätzlich höher als seinem Molekulargewicht von 7299,52 Da entsprechend. Die niedermolekularen Oligomerbanden erstrecken sich bis in den Größenbereich von etwa 50 kDa und deuten auf eine Bildung bis zum Hexamer hin. Die hochmolekularen Oligomerbanden lassen auf eine Homooligomerisierung von ungefähr 10–20 TatA₂₋₇₀-Protomeren schließen und könnten möglicherweise nativen TatA_d-Oligomeren entsprechen ^[152].

3.2.3 Bestimmung der Größe der löslichen TatA₂₋₇₀-Oligomere unter nicht-denaturierenden Bedingungen

Nachdem durch die Löslichkeitsexperimente Bedingungen gefunden wurden, in denen TatA₂₋₇₀ in löslicher Form vorliegt, wurde das Oligomerisierungsverhalten des Proteins unter nicht-denaturierenden Bedingungen charakterisiert. Hierzu wurde das Protein in Natriumphosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,5 gelöst und die Größe der löslichen TatA₂₋₇₀-Oligomere mit Hilfe der Größenausschluss-Chromatographie und der dynamischen Lichtstreuung bestimmt. Als Referenzproben wurden bei diesen Experimenten Cytochrom c (12 kDa), Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*; BSA; 66,5 kDa) und Dextran (250 kDa) verwendet. Zudem wurde in Kooperation mit Herrn Dr. Vitali Vogel (Universität Frankfurt) das Protein mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation untersucht und anhand dieser Daten ebenfalls die Komplexgröße von TatA₂₋₇₀ in seiner löslichen Form bestimmt.

Die Größenausschluss-Chromatographie (*size-exclusion chromatography*; SEC) beruht auf dem Prinzip der Gelfiltration, bei der Proteine über eine wässrige mobile Phase durch eine poröse Gelmatrix nach der Größe ihres hydrodynamischen Radius getrennt werden ^[193]. Da keine konkreten Anhaltspunkte über die Größenordnung der löslichen TatA₂₋₇₀-Oligomere existierten, wurde mit zwei unterschiedlichen Chromatographiesäulen ein Trennbereich von 1–600 kDa abgedeckt. Der Chromatographieverlauf wurde als Funktion des Retentionsvolumens gegen die UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm dargestellt (siehe Abbildung 23).

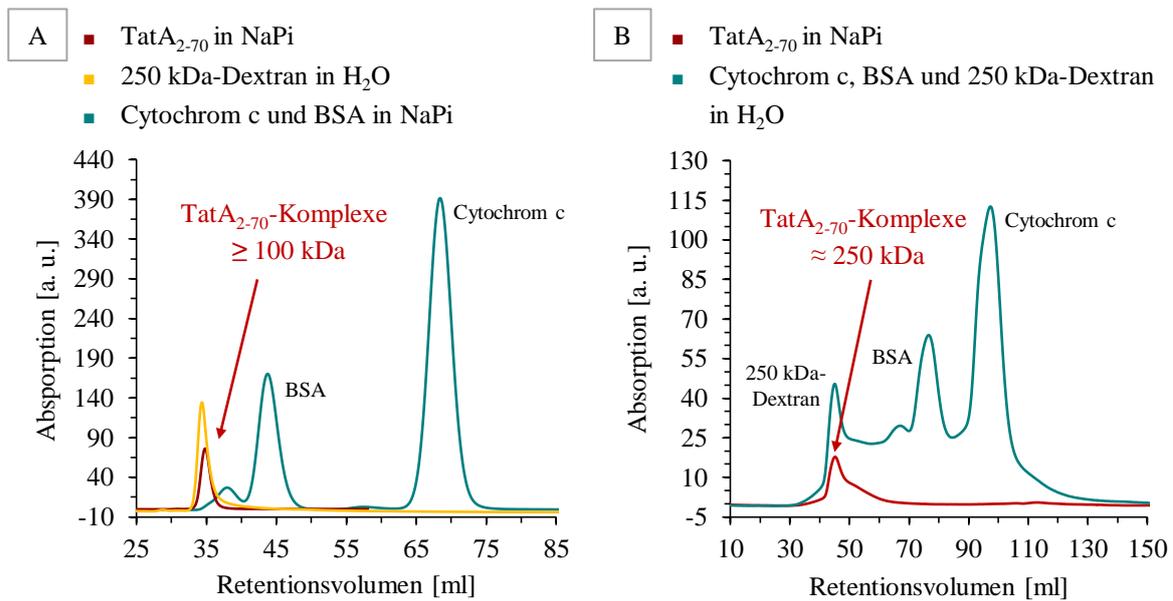


Abbildung 23 SEC-Diagramme von TatA₂₋₇₀, 250 kDa-Dextran, BSA und Cytochrom c

SEC-Diagramme von TatA₂₋₇₀, Dextran (250 kDa), BSA (66,5 kDa) und Cytochrom c (12 kDa) gelöst in Natriumphosphatpuffer (NaPi; 20 mM; pH 7,5) oder H₂O. **A:** Verwendung einer HiPrep™ 16/60 Sepharyl™ S-100 Säule (Trennbereich: 1–100 kDa). **B:** Verwendung einer HiLoad 16/60 Superdex 200 pg Säule (Trennbereich: 10–600 kDa).

Bei der Verwendung einer Säule mit einem Trennbereich von 1–100 kDa zeigt das SEC-Diagramm ein Signal von TatA₂₋₇₀ nach einem Retentionsvolumen von 35 ml (siehe Abbildung 23 A). Diese schnelle Retention lässt auf eine Elution im Totvolumen der Säule schließen, spricht jedoch auch für TatA₂₋₇₀-Oligomere im Größenbereich von ≥ 100 kDa. Bei der Verwendung einer Säule mit einem Trennbereich von 10–600 kDa zeigt das SEC-Diagramm ein Signal von TatA₂₋₇₀ nach einem Retentionsvolumen von 47 ml (siehe Abbildung 23 B). TatA₂₋₇₀ eluiert in diesem Fall im selben Ausschlussvolumen wie 250 kDa-Dextran, was auf Komplexe mit einem Molekulargewicht von etwa 250 kDa hindeutet. Diese Größenordnung würde einer Homooligomerisierung von ungefähr 35 TatA₂₋₇₀-Protomeren entsprechen.

Die dynamische Lichtstreuung (DLS) ist eine hochauflösende Laserstreulicht-Technik, mit der unter anderem der mittlere hydrodynamische Durchmesser \varnothing_h eines löslichen Proteins ermittelt werden kann. Bei dieser Methode kommt es aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung der löslichen Makromoleküle zu Fluktuationen der Streulichtintensität. Diese Streulichtschwankungen werden in kurzen Zeitabständen detektiert und über eine Autokorrelationsfunktion ausgewertet. Anschließend kann anhand der Stokes-Einstein-Beziehung der mittlere hydrodynamische Durchmesser \varnothing_h der Makromoleküle errechnet werden ^[194–196].

Das DLS-Diagramm von TatA₂₋₇₀ zeigt eine Größenverteilung im Bereich von 10–100 nm (siehe Abbildung 24). Anhand der Messdaten konnte ein mittlerer hydrodynamischer Durchmesser \varnothing_h der TatA₂₋₇₀-Oligomere von 26,5 nm ermittelt werden.

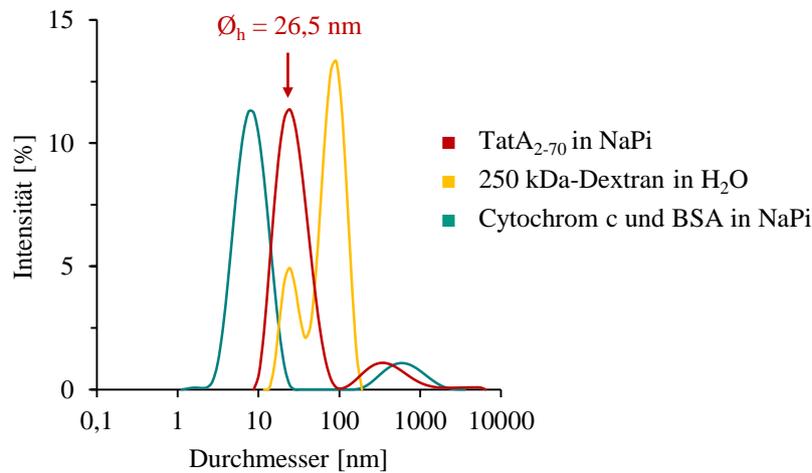


Abbildung 24 DLS-Diagramme von TatA₂₋₇₀, 250 kDa-Dextran, BSA und Cytochrom c

Größenverteilung von TatA₂₋₇₀, Dextran (250 kDa), BSA (66,5 kDa) und Cytochrom c (12 kDa) gelöst in NaPi (20 mM; pH 7,5) oder H₂O.

Die analytische Ultrazentrifugation (AUZ) beruht auf der Sedimentation von löslichen Makromolekülen infolge einer Zentrifugalbeschleunigung. Hierbei wird im Speziellen bei einem Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiment auf so hohe Rotationsgeschwindigkeiten beschleunigt, dass die Makromoleküle in Abhängigkeit ihrer Form und Größe mit konstanter Geschwindigkeit sedimentieren. Die Teilchenkonzentration wird als Funktion des radialen Abstandes in festen Zeitabständen detektiert und ein Sedimentationsprofil erstellt. Anhand dieser Messdaten kann anschließend eine differentielle Sedimentationskoeffizienten-Verteilung und das Molekulargewicht der Makromoleküle durch numerische Integration ermittelt werden^[197–199]. Ein solches Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiment wurde mit TatA₂₋₇₀ durchgeführt. Hierbei wurde auf eine Rotationsgeschwindigkeit von 40000 rpm beschleunigt und die Teilchenkonzentration durch UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 270 nm detektiert (siehe Abbildung 25).

Das Sedimentationsprofil zeigt stark abflachende Absorptionskurven und eine Plateauzone, in der die Konzentration in radialer Richtung konstant bleibt (siehe Abbildung 25 A). Diese Abflachung lässt sich auf den Verdünnungseffekt durch die sektorförmige Messzelle zurückführen, deutet aber auch auf eine hohe Sedimentationsgeschwindigkeit der löslichen TatA₂₋₇₀-Oligomere hin. Die zugehörige Sedimentationskoeffizienten-Verteilung zeigt ein scharfes Signal bei 11 S und ein sehr breites unsymmetrisches Signal bei 19 S (siehe Abbildung 25 B). Diese beiden Signale entsprechen umgerechnet Komplexgrößen von

200 kDa und etwa 400 kDa, wobei das breite Signal des 400 kDa-Komplexes auf eine Größenverteilung schließen lässt.

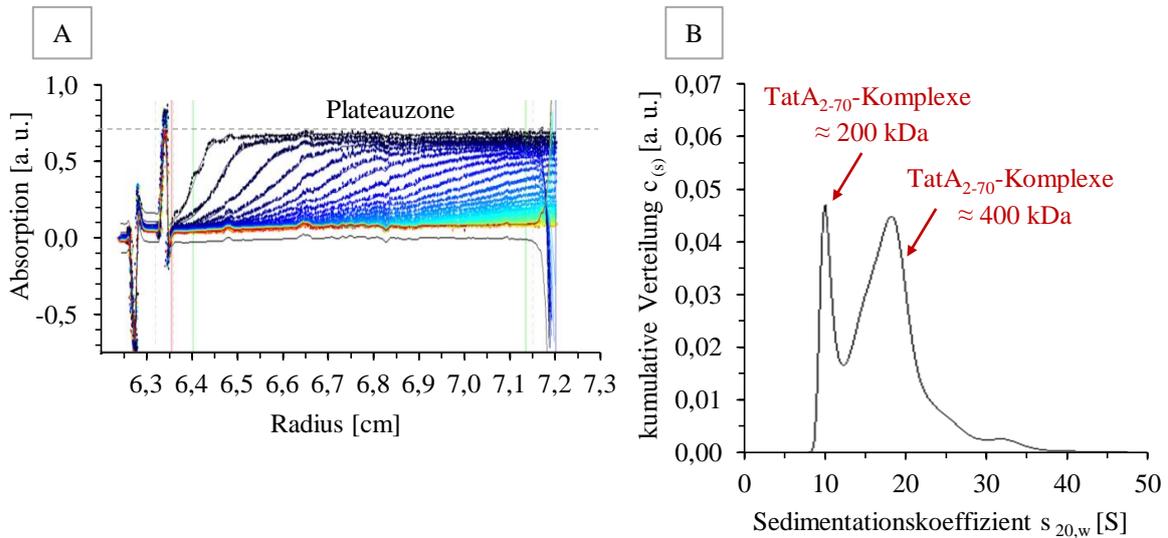


Abbildung 25 AUZ-Diagramme von TatA₂₋₇₀

A: Sedimentationsprofil von TatA₂₋₇₀ gelöst in NaPi (10 mM; pH 7,5). **B:** Zugehörige Sedimentationskoeffizienten-Verteilung von TatA₂₋₇₀. Messungen wurden von Herrn Dr. Vitali Vogel (Universität Frankfurt) durchgeführt.

3.3 Bestimmung der Orientierung von membrangebundenem Tata

Das Protein TatA_d ist in seiner membrangebundenen Form über seine ungewöhnlich kurze TMH von nur 16 Aminosäuren in der Membran verankert, während sich dessen APH auf der Membranoberfläche orientiert^[127]. Basierend auf der kürzlich veröffentlichten Kristallstruktur von *A. aeolicus* TatC^[129] postulierten wir im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Anne S. Ulrich (KIT) zu Beginn der vorliegenden Arbeit einen völlig neuartigen Mechanismus der Tat-abhängigen Proteintranslokation. Nach diesem Modell wirkt das Membranprotein TatC als eine PMF-getriebene Proteinflippase auf die kurze TMH von TatA. Dabei wird der N-Terminus von TatA durch TatC protoniert und ein „Herausflippen“ der TMH an die Membranoberfläche induziert. Durch eine solche Konformationsänderung geht die TMH von TatA von einer membranverankerten in eine intermediäre oberflächengebundene Orientierung über, was letztendlich die Porenöffnung induziert. Um für dieses Modell einen ersten experimentellen Beweis zu erbringen, wurde ein System ohne TatC-Flippase und ohne Protonengradient gewählt. Durch geeignete Wahl der Systembedingungen wurde anschließend versucht, die energetische Barriere einer solchen „Flip-Reaktion“ der TMH von TatA zu überwinden (siehe Abbildung 26). Hierfür wurde die Orientierung von TatA₂₋₇₀ in Abhängigkeit von Einflussfaktoren wie dem pH-Wert, der Temperatur, der

Membrandicke oder der Membranbeschaffenheit untersucht. In Kombination zu diesen Systembedingungen wurde zusätzlich erforscht, ob das Protein seine Orientierung in der Membran durch eine TMH-Verlängerung, eine TMH-Verkürzung oder eine Erhöhung der N-terminalen Ladungsdichte ändert. Die Orientierung des Proteins wurde mit Hilfe der orientierten Synchrotron-Zirkulardichroismus (SR-OCD)-Spektroskopie und der Festkörper-NMR-Spektroskopie in Membran-imitierenden Modellsystemen bestimmt.

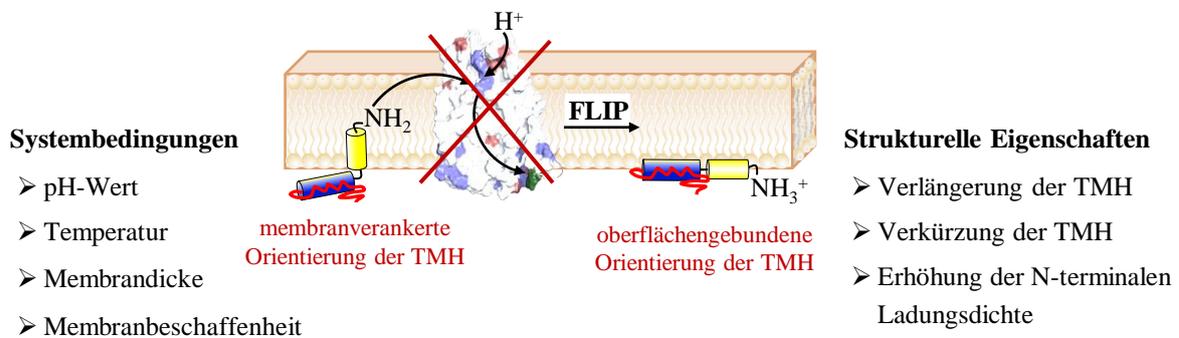


Abbildung 26 Zielstellung der Untersuchung von membrangebundenem TatA

Um erste experimentelle Beweise für das „TatC-Flippase“-Translokationsmodell zu erbringen, wurde für die Untersuchungen ein System ohne TatC-Flippase und ohne Protonengradient gewählt. Durch geeignete Wahl der Systembedingungen und durch minimale strukturelle Veränderungen von TatA wurde versucht, ein „Herausflippen“ der TMH zu induzieren. Die TMH geht bei einer solchen Konformationsänderung von einer membranverankerten in eine intermediäre oberflächengebundene Orientierung über.

3.3.1 Festkörper-NMR-Messungen an TatA₂₋₇₀ und TatA₂₋₄₅

Mit Hilfe der eindimensionalen ¹⁵N-Festkörper-NMR-Spektroskopie ist es unter anderem möglich, die Orientierung von Proteinen in Membran-imitierenden Modellsystemen zu bestimmen. Diese Methode beruht auf der Wechselwirkung der magnetischen Momente der NMR-aktiven ¹⁵N-Kerne mit externen und internen lokalen Magnetfeldern. Im Gegensatz zur Flüssig-NMR-Spektroskopie besitzen hierbei die anisotropen Spinwechselwirkungen eine bedeutende Rolle, da diese aufgrund der eingeschränkten Beweglichkeit der Proteine nicht ausgemittelt werden. Diese fehlende Ausmittlung führt zu NMR-Spektren, die viele Informationen über die Orientierung und Dynamik eines Proteins liefern, jedoch auch eine starke Linienverbreiterung aufweisen^[200,201]. Durch die Verwendung orientierter NMR-Proben ist es aber möglich, diese Linienverbreiterung zu reduzieren und schärfere Signale zu detektieren. Für die Herstellung einer solchen orientierten NMR-Probe wurde TatA₂₋₇₀ mit dem jeweiligen Lipid in dem organischen Lösungsmittel 1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-propanol (HFIP) gelöst. Anschließend wurde die Lösung auf Glasplättchen aufgetragen, wobei sich bei der Trocknung ein Protein-Lipid-Film bildete. Um während den Messungen eine hohe Signalintensität zu erzielen, wurden mehrere Glasplättchen gestapelt

und als Probenmaterial uniform ^{15}N -markiertes Protein verwendet. Der Glasplättchenstapel wurde bei einer 97 %igen relativen Luftfeuchtigkeit (97 % rH) hydratisiert, wodurch sich Lipiddoppelschichten parallel zu den Glasoberflächen ausbildeten. Anschließend wurde der Glasplättchenstapel mit Parafilm und einer Polyethylenfolie luftdicht verpackt, um eine Dehydratation während den Messungen zu verhindern. Als Membran-imitierende Modellsysteme wurden ausschließlich Phosphoglyceride verwendet, deren Kopfgruppen eine Phosphatgruppe tragen. Aus diesem Grund konnte die Orientierung der Lipidmoleküle vor und nach den ^{15}N -NMR-Messungen durch ^{31}P -NMR-Experimente überprüft werden. Die Messungen wurden in einer 0° -Orientierung der Membrannormalen relativ zum Magnetfeld durchgeführt, wodurch die Lipidmoleküle parallel zum Magnetfeld ausgerichtet vorlagen. Um die Orientierung von TatA₂₋₇₀ in der Membran zu bestimmen, wurde das Protein in dem Lipid 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DMPC) rekonstituiert und die orientierte NMR-Probe gemessen (siehe Abbildung 27). Dieses Lipid besitzt zwei gesättigte Acylketten mit 14 C-Atomen und bildet eine Membran mit einer hydrophoben Dicke von 25,4 Å [202].

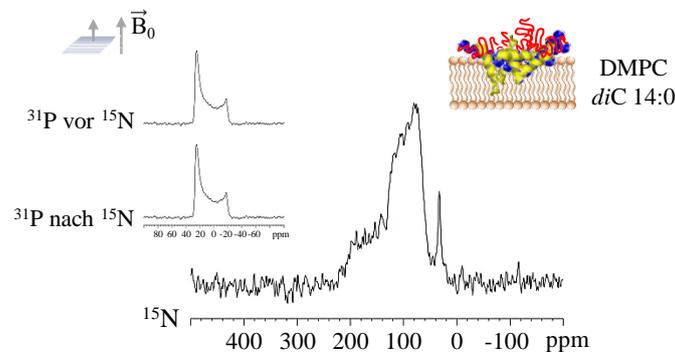


Abbildung 27 NMR-Spektren von TatA₂₋₇₀ in DMPC

Rekonstitutionsbedingungen: Lösungsmittel HFIP, pH 5–6, P : L = 1 : 100.

^{15}N -NMR-Experiment: CP-RAMP-Echo, CP 43 kHz, Echo-Puls 50 kHz, Entkopplung 30 kHz, T = 35 °C.

Die ^{31}P -NMR-Spektren zeigen neben einem Pulveranteil ein schmales Signal hoher Intensität im Bereich von 20–30 ppm. Dieses Signal wird durch die Lipidmoleküle hervorgerufen, welche parallel zum Magnetfeld ausgerichtet sind, und spricht für eine gute Orientierung der Lipidmoleküle. Das ^{15}N -NMR-Spektrum zeigt ein scharfes Signal bei 32 ppm, welches charakteristisch für den N-Terminus und die Lysinseitenketten des Proteins ist [203]. Außerdem ist ein hoher Pulveranteil zu erkennen, bei dem sich die Signale über die gesamte Spannweite des chemischen Verschiebungstensors (*chemical shift anisotropy tensor*; CSA-Tensor) von 60–220 ppm erstrecken. Dieser hohe Pulveranteil wurde entweder durch die unstrukturierte C-terminale Region des Proteins hervorgerufen

und überdeckt die Signale der orientierten Proteinanteile, oder die Rekonstitution von TatA₂₋₇₀ war nicht erfolgreich und das Protein liegt aggregiert vor. Daher ist es nicht möglich aus diesem Spektrum eine Aussage über die Orientierung von TatA₂₋₇₀ zu treffen. Basierend auf diesem unzureichenden Ergebnis wurde eine Rekonstitutionsmethode über Lipidvesikel erprobt und Phosphatidylcholinlipide mit unterschiedlicher Acylkettenlänge (siehe Tabelle 4) getestet. Das Protein wurde in neutralem Natriumphosphatpuffer gelöst und mit einer zuvor hergestellten Vesikelsuspension gemischt. Anschließend wurden orientierte NMR-Proben hergestellt und diese gemessen (siehe Abbildung 28).

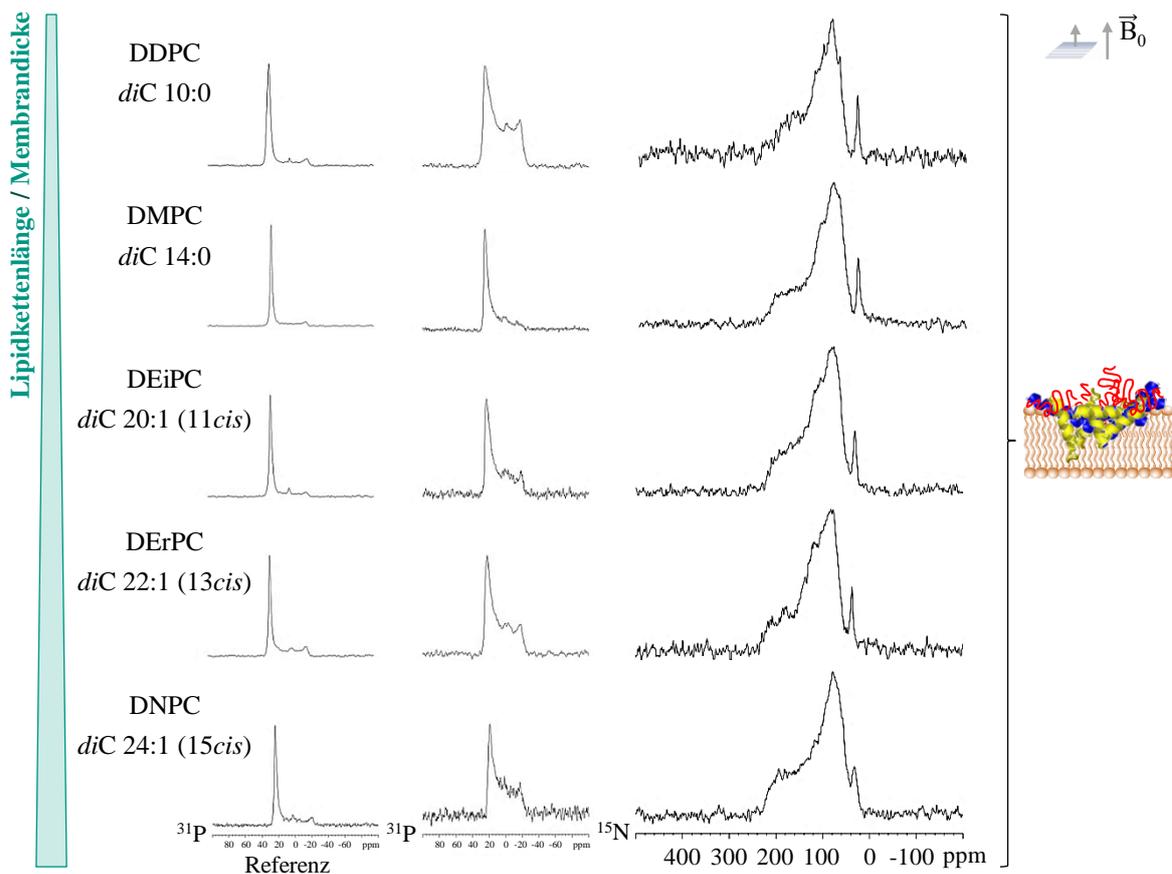


Abbildung 28 NMR-Spektren von TatA₂₋₇₀ in Lipiden mit unterschiedlicher Acylkettenlänge

Rekonstitutionsbedingungen: Lösungsmittel NaPi (20 mM; pH 7,5), P : L = 1 : 100.

¹⁵N-NMR-Experimente: CP-RAMP-Echo, CP 43 kHz, Echo-Puls 50 kHz, Entkopplung 30 kHz, T = 35 °C.

Unter Verwendung der Rekonstitution über Lipidvesikel zeigt das ³¹P-NMR-Spektrum von TatA₂₋₇₀ im Lipid DMPC einen geringeren Pulveranteil als unter Verwendung der HFIP-vermittelten Rekonstitution. Die ³¹P-NMR-Spektren von TatA₂₋₇₀ in den anderen Lipiden zeigen einen höheren Pulveranteil und außerdem ist bei 0 ppm ein schwaches isotropes Signal zu erkennen, dass durch die Verwendung des Natriumphosphatpuffers hervorgerufen wird. Die ¹⁵N-NMR-Spektren zeigen in allen Lipiden einen hohen Pulveranteil, wodurch ebenfalls keine Aussage über die Orientierung des Proteins getroffen werden

kann. Demzufolge wird durch eine Rekonstitution über Lipidvesikel und durch Lipide mit unterschiedlicher Acylkettenlänge die Qualität der ^{15}N -NMR-Spektren nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse führten zu der Schlussfolgerung, dass das Protein TatA₂₋₇₀ für weitere Untersuchungen ungeeignet ist.

Aus diesem Grund wurde das Fragment TatA₂₋₄₅, welches um die unstrukturierte C-terminale Region verkürzt ist, für die folgenden NMR-Experimente verwendet (siehe Abbildung 29). Hierfür wurde das Protein ebenfalls mit Hilfe des Lösungsmittels HFIP in DMPC-Modelmembranen rekonstituiert. Vorangegangene NMR-Studien hatten gezeigt, dass dieses Fragment sich in planaren Bicellen gut orientiert ^[127].

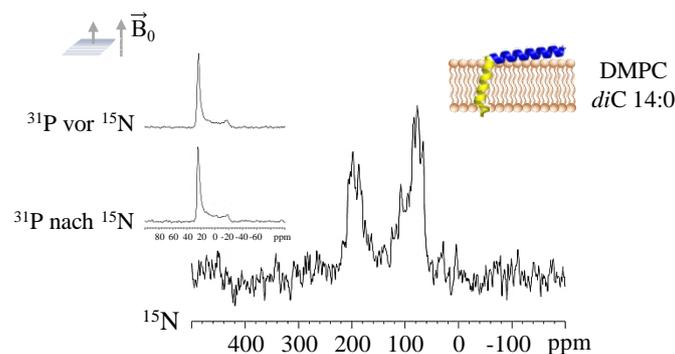


Abbildung 29 NMR-Spektren von TatA₂₋₄₅ in DMPC

Rekonstitutionsbedingungen: Lösungsmittel HFIP, pH 5–6, P:L = 1 : 75.

^{15}N -NMR-Experiment: CP-RAMP-Echo, CP 43 kHz, Echo-Puls 50 kHz, Entkopplung 30 kHz, T = 35 °C.

Die ^{31}P -NMR-Spektren zeigen nur einen sehr geringen Pulveranteil und demnach eine sehr gute Orientierung der Lipidmoleküle. Das ^{15}N -NMR-Spektrum zeigt zwei scharf getrennte spektrale Regionen. Die Signale im Bereich von 80–130 ppm stammen von senkrecht zum Magnetfeld orientierten Proteinanteilen. Diese Proteinanteile liegen parallel zur Membranoberfläche und können der APH von TatA₂₋₄₅ zugeordnet werden. Die Signale im Bereich von 170–210 ppm stammen von parallel zum Magnetfeld orientierten Proteinanteilen. Diese Proteinanteile liegen senkrecht zur Membranoberfläche und können der TMH von TatA₂₋₄₅ zugeordnet werden. Demzufolge besitzt das Fragment TatA₂₋₄₅ eine Orientierung, bei der die TMH die Membran annähernd senkrecht durchspannt und die APH sich auf der Membranoberfläche liegend orientiert. Somit orientiert sich das Protein in DMPC-Modellmembranen, wie es bereits in planaren Bicellen beobachtet wurde ^[127]. Vergleicht man die hydrophobe Dicke von DMPC-Membranen (25,4 Å) mit der Länge der TMH von TatA₂₋₄₅ (24,0 Å), lässt sich diese stabile membrandurchspannende Orientierung gut erklären.

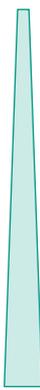
3.3.2 Einfluss der Membrandicke

Nachdem das Fragment TatA₂₋₄₅ in DMPC-Modellmembranen erfolgreich rekonstituiert werden konnte, wurde das Protein in Abhängigkeit der Membrandicke untersucht. Hierbei wurde überprüft, ob die Lipidkettenlänge einen Einfluss auf die α -helikale Faltung von TatA₂₋₄₅ besitzt, und ob sich die Orientierung des Proteins durch die veränderte Membrandicke ändert. Für diese Experimente wurden Phosphatidylcholinlipide mit einer Acylkettenlänge von 8–24 C-Atomen verwendet. Die Lipide sollten sich während den Messungen in ihrer biologisch relevanten lamellaren flüssig-kristallinen L _{α} -Phase befinden, in der sie eine Lipiddoppelschicht bilden, die einer natürlichen Membran mit hoher Flexibilität entspricht^[204]. Um ein übermäßiges Heizen während den Messungen zu verhindern, wurden daher Lipide mit einer Phasenübergangstemperatur ≤ 30 °C gewählt. Im kurzkettigen Bereich (8–14 C-Atome) konnten somit gesättigte Lipide verwendet werden, wohingegen im langkettigen Bereich (16–24 C-Atome) einfach ungesättigte Lipide eingesetzt werden mussten. Tabelle 4 fasst die verwendeten Phosphatidylcholinlipide mit Acylkettenlänge, zugehöriger Abkürzungsnomenklatur, Molekulargewicht M_r , Phasenübergangstemperatur T_m und hydrophober Membrandicke d_L zusammen. Die hydrophobe Membrandicke d_L hängt von der C-Atomanzahl n_c der Acylketten ab und wurde nach folgenden Formeln berechnet^[202]:

$$\text{gesättigte Lipide:} \quad d_L (n_c : 0) = 2,21 \text{ \AA} (n_c - 2,5) \quad (3.1)$$

$$\text{ungesättigte Lipide:} \quad d_L (n_c : 1) = 1,90 \text{ \AA} (n_c - 3,9) \quad (3.2)$$

Phosphatidylcholinlipide	Acylkettenlänge	Abkürzung	M_r [g/mol]	T_m [°C]	d_L [Å]
1,2-Dioctanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	<i>diC</i> 8:0	DOcPC	509,61	-	12,2
1,2-Didecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	<i>diC</i> 10:0	DDPC	565,72	-	16,6
1,2-Dilauroyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	<i>diC</i> 12:0	DLPC	621,83	-1	21,0
1,2-Dipalmitoleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	<i>diC</i> 16:1 (9 <i>cis</i>)	DPolePC	730,01	-36	23,0
1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	<i>diC</i> 14:0	DMPC	677,93	23	25,4
1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	<i>diC</i> 18:1 (9 <i>cis</i>)	DOPC	786,11	-20	26,8
1,2-Dieicosenoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	<i>diC</i> 20:1 (11 <i>cis</i>)	DEiPC	842,22	-1	30,6
1,2-Dierucoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	<i>diC</i> 22:1 (13 <i>cis</i>)	DErPC	898,33	11	34,4
1,2-Dinervonoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	<i>diC</i> 24:1 (15 <i>cis</i>)	DNPC	954,43	27	38,2



Membrandicke d_L

Tabelle 4 Eigenschaften der Phosphatidylcholinlipide mit unterschiedlicher Acylkettenlänge

M_r = Molekulargewicht; T_m = Phasenübergangstemperatur^[205]; d_L = hydrophobe Membrandicke^[202]

Um den Einfluss der Lipidkettenlänge auf die α -helikale Faltung von TatA₂₋₄₅ zu überprüfen, wurde das Protein in kleinen unilamellaren Lipidvesikeln rekonstituiert und mit Hilfe der isotropen SR-CD-Spektroskopie untersucht. Mit dieser Methode ist es möglich, die globale Sekundärstruktur eines Proteins zu bestimmen. Sie beruht auf dem Prinzip, dass chirale Verbindungen links und rechts polarisiertes Licht unterschiedlich stark absorbieren und dieser Absorptionsunterschied zu charakteristischen Linienformen der unterschiedlichen Sekundärstrukturelemente führt^[206,207]. Bei einer quantitativen Auswertung wird das CD-Signal in die mittlere molare Elliptizität pro Peptidbindung $[\theta]_{\text{MRE}}$ (*mean residue ellipticity*; MRE) umgerechnet, wofür die genaue Proteinkonzentration bekannt sein muss. Da TatA₂₋₄₅ jedoch kein UV-absorbierendes Tryptophan oder Tyrosin besitzt, konnte die Konzentration nicht genau bestimmt werden. Daher erfolgte nur eine qualitative Auswertung, wobei die erhaltenen SR-CD-Spektren mit Basisspektren reiner Sekundärstrukturelemente^[206] verglichen wurden (siehe Abbildung 30).

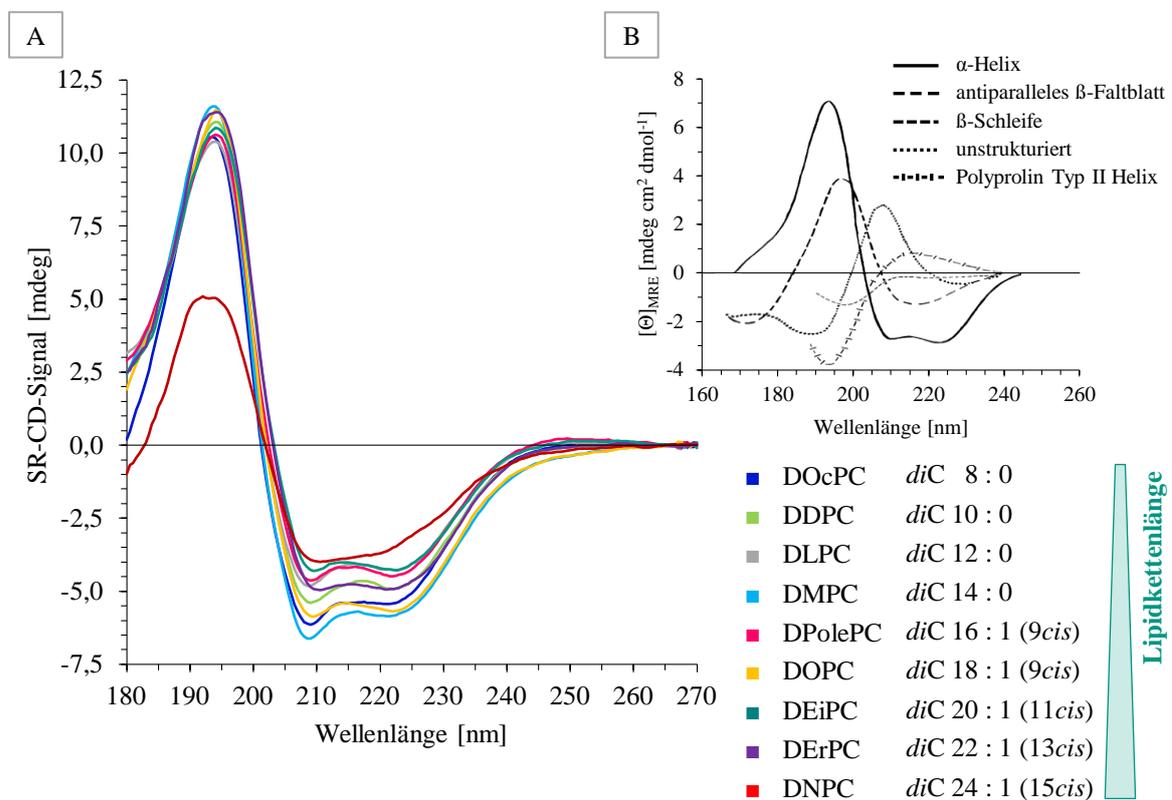


Abbildung 30 SR-CD-Spektren von TatA₂₋₄₅ in Lipiden mit unterschiedlicher Acylkettenlänge

A: SR-CD-Spektren von TatA₂₋₄₅ in Phosphatidylcholinlipidvesikeln mit unterschiedlicher Acylkettenlänge. Rekonstitutionsbedingungen und SR-CD-Messungen: Lösungsmittel HFIP, pH 5–6, P : L = 1 : 50, T = 35 °C.
B: Berechnete CD-Basisspektren reiner Sekundärstrukturelemente^[206].

Die SR-CD-Spektren zeigen eine positive Bande bei 192 nm und zwei negative Banden bei 208 nm und 222 nm. Diese Linienform lässt auf einen hohen α -helikalen Sekundärstrukturanteil schließen. Die geringere Intensität des SR-CD-Spektrums von TatA₂₋₄₅ im Lipid

DNPC und dessen schwächer ausgeprägtere Bande bei 222 nm deuten auf zusätzliche aggregierte Proteinanteile hin. Da alle anderen Spektren jedoch eine gute Übereinstimmung zeigen, scheint die Lipidkettenlänge keinen großen Einfluss auf die Faltung von TatA₂₋₄₅ zu besitzen.

In weiteren Experimenten wurde die Orientierung von TatA₂₋₄₅ in Abhängigkeit der Membrandicke mit Hilfe der Festkörper-NMR-Spektroskopie analysiert (siehe Abbildung 31). Hierfür wurde das Protein in Phosphatidylcholinlipide mit unterschiedlicher Acylkettenlänge (siehe Tabelle 4) rekonstituiert und orientierte NMR-Proben hergestellt.

Einige ³¹P-NMR-Spektren zeigen einen geringen Pulveranteil, wobei die Lipidmoleküle jedoch weitgehend eine gute Orientierung aufweisen. Anhand der ³¹P-NMR-Spektren nach den ¹⁵N-NMR-Experimenten ist deutlich zu erkennen, dass die Lipidorientierung durch die lange Messdauer der ¹⁵N-NMR-Experimente nicht beeinflusst wird. Im kürzesten Lipid DOPC zeigt das ¹⁵N-NMR-Spektrum von TatA₂₋₄₅ hochfeldverschobene Signale der TMH im Bereich von 140–190 ppm, was auf eine starke Neigung der Helix schließen lässt. Das scharfe Signal bei 120 ppm deutet zudem auf flexible Proteinanteile hin. Mit der schnellen Beweglichkeit solcher Anteile geht eine Ausmittelung der chemischen Verschiebung einher, wodurch ein scharfes isotropes Signal bei 120 ppm entsteht. Im Lipid DDPC sind die Signale der TMH nur leicht hochfeldverschoben, was für eine leichte Aufrichtung der TMH spricht. Die ¹⁵N-NMR-Spektren von TatA₂₋₄₅ in den Lipiden DLPC bis DEiPC zeigen die Signale der TMH im Bereich von 170–210 ppm. Daraus lässt sich schließen, dass die TMH diese Modellmembranen annähernd senkrecht durchspannt. In den langen Lipiden DERPC und DNPC sind hohe Pulveranteile zu erkennen, die auf eine mögliche Proteinaggregation zurückzuführen sind.

Zusammenfassend zeigen die ¹⁵N-NMR-Spektren eine eindeutige Orientierungsänderung der TMH von TatA₂₋₄₅ in Abhängigkeit der Membrandicke. In dünnen Membranen neigt sich die TMH, um sich der Membrandicke anzupassen, und richtet sich mit zunehmender Membrandicke immer weiter auf. In Membranen, deren Dicke ungefähr mit der Länge der TMH von TatA₂₋₄₅ übereinstimmt, durchspannt die TMH die Lipiddoppelschicht annähernd senkrecht. In dicken Membranen scheint das Protein zu aggregieren, was ein erster Hinweis für ein „Herausflippen“ der TMH sein könnte, da diese zu kurz für eine membran-durchspannende Orientierung ist und daher wahrscheinlich auf der Membranoberfläche aggregiert.

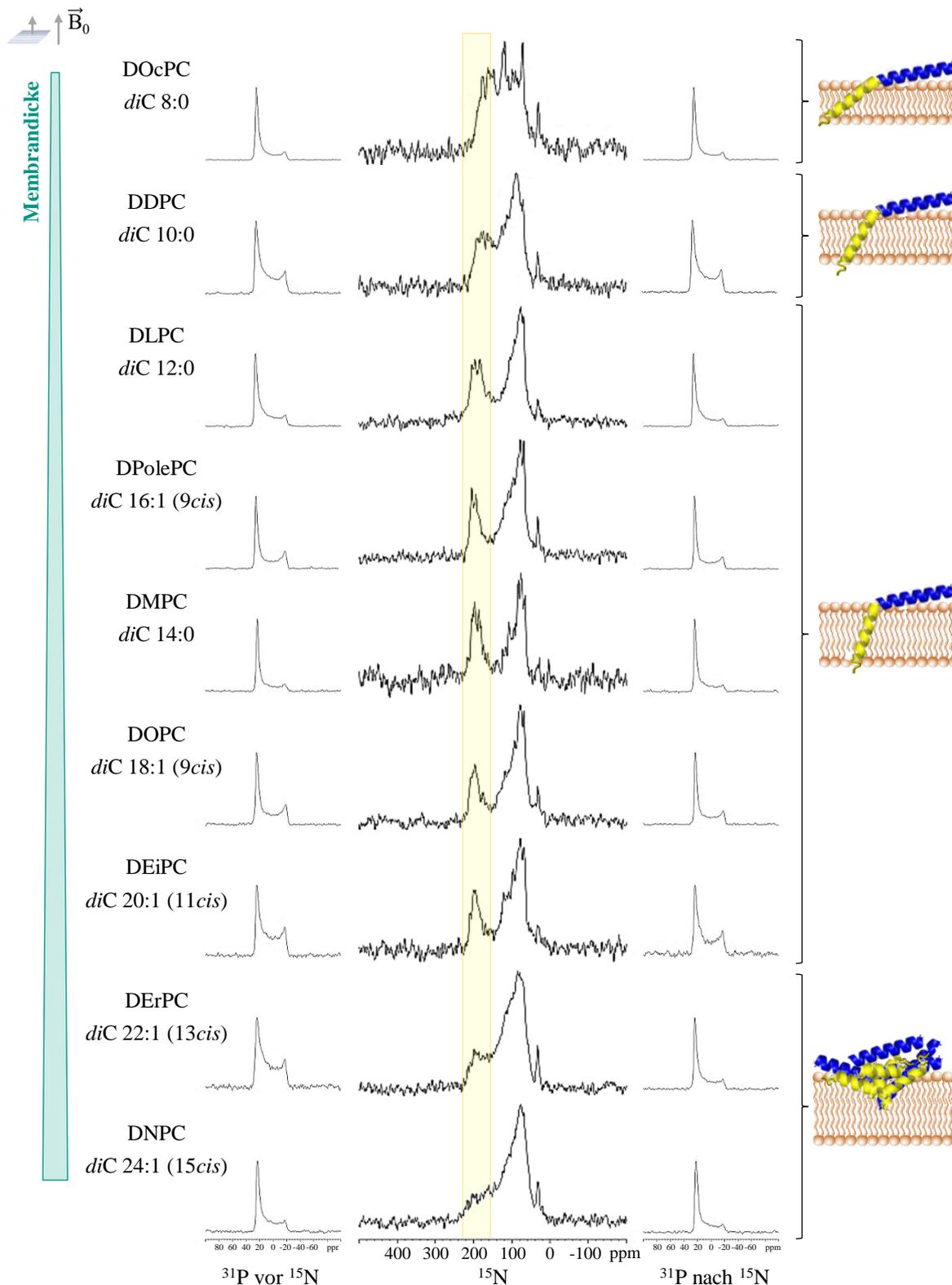


Abbildung 31 NMR-Spektren von TatA₂₋₄₅ in Lipiden mit unterschiedlicher Acylkettenlänge

Rekonstitutionsbedingungen: Lösungsmittel HFIP, pH 5–6, P : L = 1 : 75.

¹⁵N-NMR-Experimente: CP-RAMP-Echo, CP 43 kHz, Echo--Puls 50 kHz, Entkopplung 30 kHz, T = 35 °C.

3.3.3 Einfluss des pH-Wertes

In weiteren Experimenten wurde untersucht, welchen Einfluss eine pH-Wert-Änderung auf die Orientierung von TatA₂₋₄₅ besitzt. Aufgrund des organischen Lösungsmittels HFIP lag der pH-Wert der bisherigen NMR-Proben im leicht sauren pH-Bereich von 5–6. Da die N-terminale Aminogruppe eines Proteins typischerweise einen pK_S-Wert von etwa 7,7^[208] besitzt, kann davon ausgegangen werden, dass der N-Terminus von TatA₂₋₄₅ bei diesen Proben weitgehend protoniert vorlag. Diese energetisch ungünstige Ladung innerhalb der hydrophoben Membrenumgebung könnte auch die beobachtete Aggregation von TatA₂₋₄₅ in dicken Membranen erklären. Unter basischen Bedingungen liegt der N-Terminus hingegen deprotoniert vor, wodurch dem Protein das Eintauchen in die Membran erleichtert werden sollte.

Um den Einfluss eines deprotonierten N-Terminus auf die Orientierung von TatA₂₋₄₅ zu untersuchen, wurde das Protein unter basischen Bedingungen in den Lipiden DErPC und DNPC rekonstituiert, wofür zwei unterschiedliche Rekonstitutionsansätze gewählt wurden. Zum einen wurde das Protein mit dem jeweiligen Lipid in HFIP gelöst und die Probe nach der Auftragung auf die Glasplättchen durch Zugabe von N-Cyclohexyl-2-aminoethansulfonsäure (CHES)-Puffer (5 mM, pH 9,5) alkalisiert. Der pH-Wert wurde mit Hilfe eines Kontakt-pH-Meters auf den Glasplättchen bestimmt und lag bei pH 8–9. Zum anderen wurde eine Detergens-vermittelte Rekonstitution verwendet, bei der das Protein mit dem jeweiligen Lipid in N-Lauroylsarcosin Natriumsalz (NLS) solubilisiert wurde. Das Detergens wurde anschließend durch eine Bio-BeadsTM-Behandlung entfernt und der pH-Wert der Vesikelsuspension vor der Auftragung auf die Glasplättchen mit NaOH-Lösung (1 M) auf pH ≈ 9 eingestellt. Unabhängig vom jeweiligen Rekonstitutionsansatz wurden im Anschluss orientierte NMR-Proben hergestellt und diese gemessen. Die NMR-Spektren unter leicht sauren und basischen Bedingungen sind in Abbildung 32 verglichen.

Die ³¹P-NMR-Spektren der basischen Proben zeigen einen sehr hohen Pulveranteil. Demzufolge wird die Lipidorientierung durch die basischen Bedingungen und den hohen Salzgehalt der Proben stark beeinträchtigt (siehe Abbildung 32 B und 32 C). Unter Verwendung der Detergens-vermittelten Rekonstitution ist zudem bei 0 ppm ein Signal zu erkennen, dass auf eine vollständige Hydrolyse der Acyl-Esterbindungen hindeutet^[209,210] (siehe Abbildung 32 C).

Das ¹⁵N-NMR-Signal bei 32 ppm ist charakteristisch für den N-Terminus (NH₃⁺) des Proteins^[203] und wird nur unter sauren Bedingungen detektiert (siehe Abbildung 32 A).

Unter basischen Bedingungen ist es hingegen nicht zu beobachten, was für eine erfolgreiche Deprotonierung von TatA₂₋₄₅ spricht (siehe Abbildung 32 B und 32 C). Die ¹⁵N-NMR-Spektren von TatA₂₋₄₅ im Lipid DErPC zeigen unter basischen Bedingungen eine leichte Intensitätserhöhung der Signale der TMH im Bereich von 170–210 ppm und deuten somit auf membrandurchspannende Proteinanteile hin (siehe Abbildung 32 B und 32 C, Lipid DErPC). Unter Verwendung der Detergens-vermittelten Rekonstitution sind auch im Lipid DNPC schwache ¹⁵N-NMR-Signale der TMH zu erkennen, welche ebenfalls für ein anteiliges Eintauchen der TMH in die Lipiddoppelschicht sprechen (siehe Abbildung 32 C, Lipid DNPC).

Der beobachtete Effekt des Eintauchens der TMH in die Membran könnte im Fall der Detergens-vermittelten Rekonstitution auch auf eventuell vorhandene Detergensrückstände zurückzuführen sein. Da der Effekt jedoch bei der basischen detergensfreien Probe von TatA₂₋₄₅ im Lipid DErPC auch zu beobachten ist, kann davon ausgegangen werden, dass durch die Deprotonierung des N-Terminus ein anteiliges Eintauchen der TMH in die Membran ermöglicht wurde, wodurch sich das Protein anteilig orientiert.

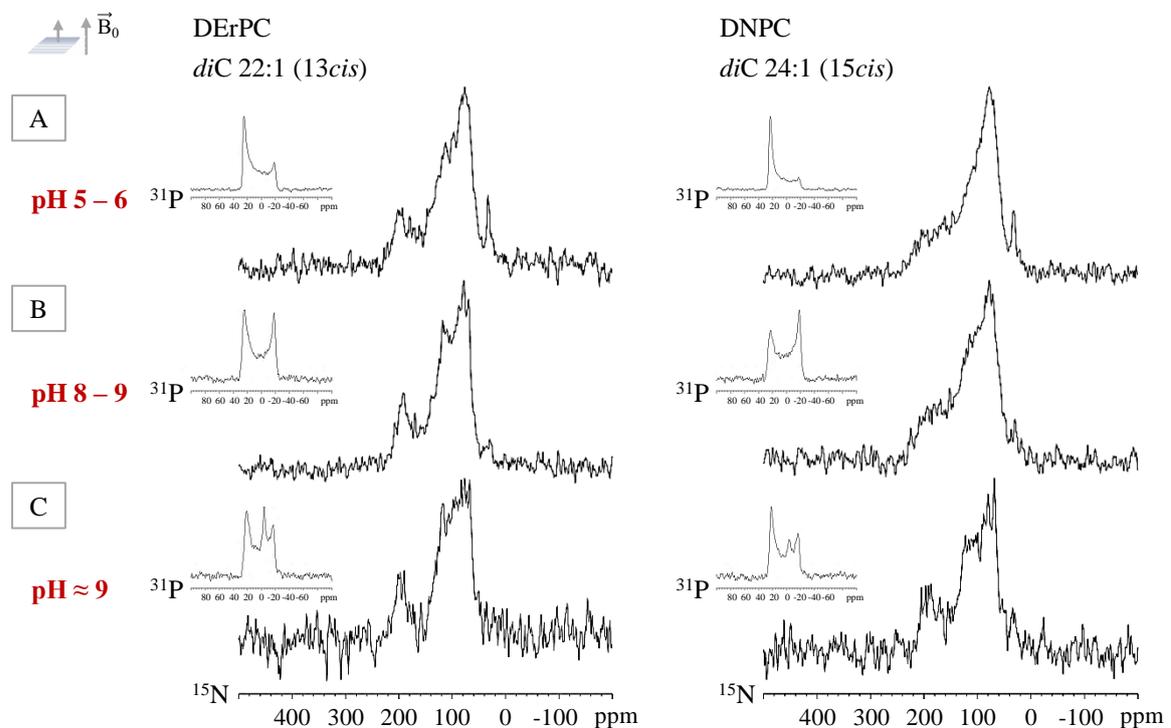


Abbildung 32 NMR-Spektren von TatA₂₋₄₅ in DErPC und DNPC bei unterschiedlichem pH-Wert

A: HFIP-vermittelte Rekonstitution: pH 5–6, P:L = 1:75. **B:** HFIP-vermittelte Rekonstitution mit Alkalisierung durch CHES-Puffer (5 mM; pH 9,5): pH 8–9, P:L = 1:75. **C:** Detergens-vermittelte Rekonstitution mit Alkalisierung durch NaOH-Lösung (1 M): pH ≈ 9, P:L = 1:75.

¹⁵N-NMR-Experimente: CP-RAMP-Echo, CP 43 kHz, Echo-Puls 50 kHz, Entkopplung 30 kHz, T = 35 °C.

Die NMR-Daten unter basischen Bedingungen erbrachten somit einen ersten experimentellen Hinweis, dass der Protonierungsgrad des N-Terminus einen Einfluss auf die Orientierung der TMH von TatA₂₋₄₅ besitzen könnte. Darauf basierend wurden in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Wolfgang Wenzel (KIT) *Monte Carlo*-Simulationen mit TatA₁₋₄₅ durchgeführt. Hierbei wurde die Orientierung des Proteins in Abhängigkeit des Protonierungsgrades des N-Terminus in impliziten Modellmembranen untersucht.

In einer ersten Simulation wurde eine Modellmembran mit einer hydrophoben Dicke von 42 Å gewählt. In dieser Membran lag das Protein verankert vor, da dessen TMH (24 Å) für eine membrandurchspannende Orientierung zu kurz ist. Diese Simulation führte bei einer Deprotonierung des N-Terminus von TatA₁₋₄₅ zu einer stabilen annähernd senkrechten Orientierung der TMH (siehe Abbildung 33 A). Eine Protonierung des N-Terminus führte hingegen zu einem „Herausflippen“ der TMH an die Membranoberfläche, wo sie auch bis zum Ende der Simulation verblieb (siehe Abbildung 33 B).

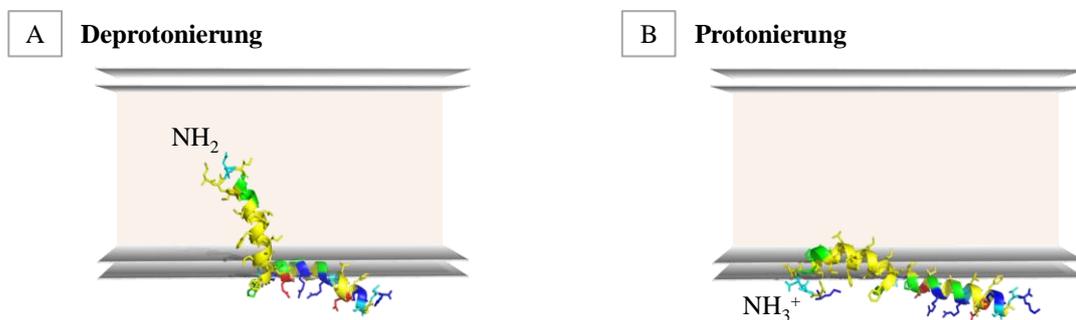


Abbildung 33 *Monte Carlo*-Simulationen von TatA₁₋₄₅ in impliziten Modellmembranen

A: Eine Deprotonierung des N-Terminus von TatA₁₋₄₅ führt zu einer annähernd senkrechten membranverankerten Orientierung der TMH. **B:** Eine Protonierung des N-Terminus von TatA₁₋₄₅ führt zu einem „Herausflippen“ der TMH an die Membranoberfläche. Simulationen wurden von Frau Dr. Julia Setzler (KIT) und Herrn Dr. Moritz Wolf (KIT) durchgeführt.

In einer weiteren Simulation wurde eine Modellmembran mit einer hydrophoben Dicke von nur 22 Å gewählt, in der die TMH die Lipiddoppelschicht durchspannen konnte. Bei dieser Simulation führte eine Protonierung des N-Terminus zu keiner Konformationsänderung des Proteins, da in diesem Fall der protonierte geladene N-Terminus nicht in der hydrophoben Membrenumgebung vorlag.

Demzufolge bekräftigen diese Simulationen die NMR-Daten und zeigen ebenfalls, dass der Protonierungsgrad des N-Terminus und die Membrandicke die Orientierung der TMH von TatA₂₋₄₅ beeinflussen.

3.3.4 Einfluss der Temperatur

NMR-Messungen werden meistens oberhalb der Phasenübergangstemperatur der Lipide durchgeführt, bei denen sich diese in ihrer flüssig-kristallinen Phase (L_α) befinden. In diesem Zustand entspricht die Lipiddoppelschicht einer natürlichen Membranumgebung mit einer hohen Flexibilität und einer geringen Packungsdichte^[204]. Durch die Eigenrotation der Lipide und die schnelle *trans-gauche*-Isomerie der Acylketten verlieren die Lipide ihre gestreckte Konformation^[211]. Dies führt zur einer lateralen Expansion sowie einer Mobilitäts- und Fluiditätssteigerung, wodurch die Membrandicke ab und das Membranvolumen zunehmen. Die Fluidität erleichtert hydrophoben Proteinsegmenten das Eintauchen in die Lipiddoppelschicht. Durch eine Senkung der Temperatur unter die Phasenübergangstemperatur der Lipide gehen diese in ihre lamellare Gel-Phase (L_β) über, in der sie eine starre gestreckte Konformation einnehmen. Die hierbei entstehende Rigidität der Lipiddoppelschicht sollte einen entgegengesetzten Effekt erzielen und ein „Herausflippen“ der TMH von TatA₂₋₄₅ begünstigen. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde TatA₂₋₄₅ in Phosphatidylcholinlipiden mit unterschiedlicher Acylkettenlänge rekonstituiert und die NMR-Messungen ober- und unterhalb der Phasenübergangstemperatur der Lipide durchgeführt. Diese Messungen führten unabhängig vom verwendeten Lipid zu einem analogen Ergebnis, welches exemplarisch für TatA₂₋₄₅ im Lipid DMPC in Abbildung 34 gezeigt ist.

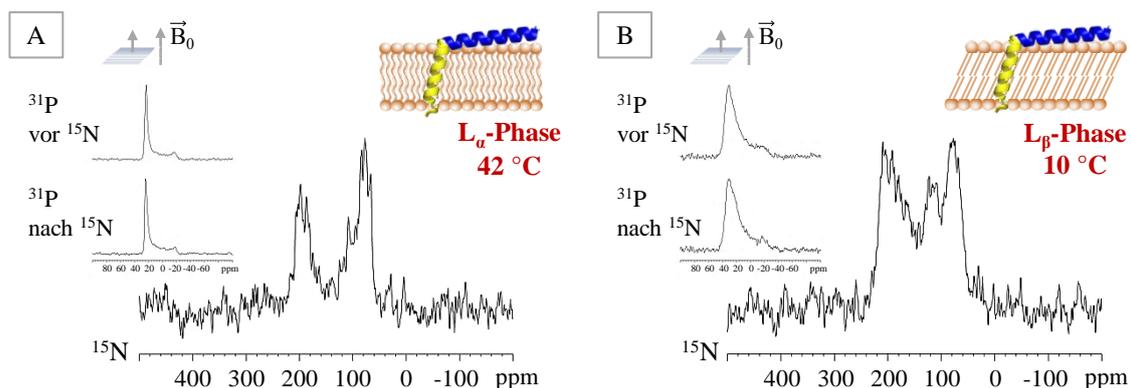


Abbildung 34 NMR-Spektren von TatA₂₋₄₅ in DMPC bei unterschiedlichen Temperaturen

A: NMR-Spektren von TatA₂₋₄₅ in DMPC; T = 42 °C. **B:** NMR-Spektren von TatA₂₋₄₅ in DMPC; T = 10 °C.

Rekonstitutionsbedingungen: Lösungsmittel HFIP, pH 5–6, P : L = 1 : 75.

¹⁵N-NMR-Experimente: CP-RAMP-Echo, CP 43 kHz, Echo-Puls 50 kHz, Entkopplung 30 kHz.

Der Vergleich der ³¹P-NMR- sowie ¹⁵N-NMR-Spektren zeigt, dass eine Temperatursenkung zwar zu einer starken Linienverbreiterung führt, sich die Signale jedoch nicht verschieben. Somit kann eine Orientierungsänderung des Proteins durch eine Temperatur-

änderung ausgeschlossen werden, und ein Einfluss durch eine eingeschränkte Acylketten-dynamik und eine erhöhte Packungsdichte ist nicht festzustellen.

3.3.5 Einfluss der Membranbeschaffenheit

Die bisherigen NMR-Daten zeigten, dass TatA₂₋₄₅ in dicken Membranen aggregiert, da wahrscheinlich dessen TMH zu kurz ist, um die Membran zu durchspannen. Dieses erste Anzeichen eines möglichen „Herausflippens“ der TMH führte zu der Überlegung, dass möglicherweise eine stabile oberflächengebundene Orientierung von TatA₂₋₄₅ aufgrund der hohen Packungsdichte der Phosphatidylcholinmembranen nicht möglich ist. Aus diesem Grund wurde durch die Verwendung von Phytanoyllipiden versucht, die Proteinaggregation zu verhindern und eine oberflächengebundene Orientierung von TatA₂₋₄₅ zu induzieren. Diese Lipide besitzen verzweigte Acylketten und bilden daher Membranen mit einer geringen Packungsdichte, wodurch mehr Platz in der Kopfgruppenregion für sich anlagernde Proteinsegmente gegeben ist. Sie gehören der übergeordneten Gruppe der Phosphoglyceride an und besitzen zwei gesättigte Acylketten mit 16 C-Atomen, die von der Phytansäure (3,7,11,15-Tetramethylhexadecansäure) abstammen und demnach an vier Positionen eine Methylgruppe tragen^[212]. Aufgrund ihrer Sättigung und Verzweigung bilden sie sehr stabile Membranen mit einer geringen Ionendurchlässigkeit und einer hohen Resistenz gegen Oxidationsprozesse^[212–215]. Sie sind in vielen gängigen Kopfgruppenvarianten erhältlich, wobei in der vorliegenden Arbeit nur die Lipide 1,2-Diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPhPC) und 1,2-Diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (DPhPE) verwendet wurden (siehe Abbildung 35 A). Das Lipid DPhPC weist über einen Temperaturbereich von -120 °C bis +120 °C keinen Phasenübergang von der L_β-Phase in die L_α-Phase auf und liegt demnach überwiegend in der biologisch relevanten L_α-Phase vor^[216]. Zudem konnten durch Untersuchungen der Lipid-Polymorphie weitere Überstrukturen des Lipids charakterisiert werden^[212,217–222]. Durch NMR-Studien^[217] wurde das Phasenübergangsverhalten des Lipids analysiert und dessen Phasendiagramm erstellt (siehe Abbildung 35 B). Hierbei konnten zwei lamellare Phasen (L_α und L_α') charakterisiert werden, welche sich in der Ausrichtung der Kopfgruppen relativ zur Membrannormalen unterscheiden. Zudem existiert eine hochviskose, optisch isotrope, kubische Phase (C) und eine inverse hexagonale Phase (H_{II}), bei der die Kopfgruppen nach innen ragen^[217]. Der Phasenübergang der beiden lamellaren Phasen erfolgt infolge einer Dehydratation und eines Temperaturanstiegs. Eine zunehmende Dehydratation und eine weitere Temperaturerhöhung führen zur spontanen Bildung der C-Phase und der H_{II}-Phase^[217].

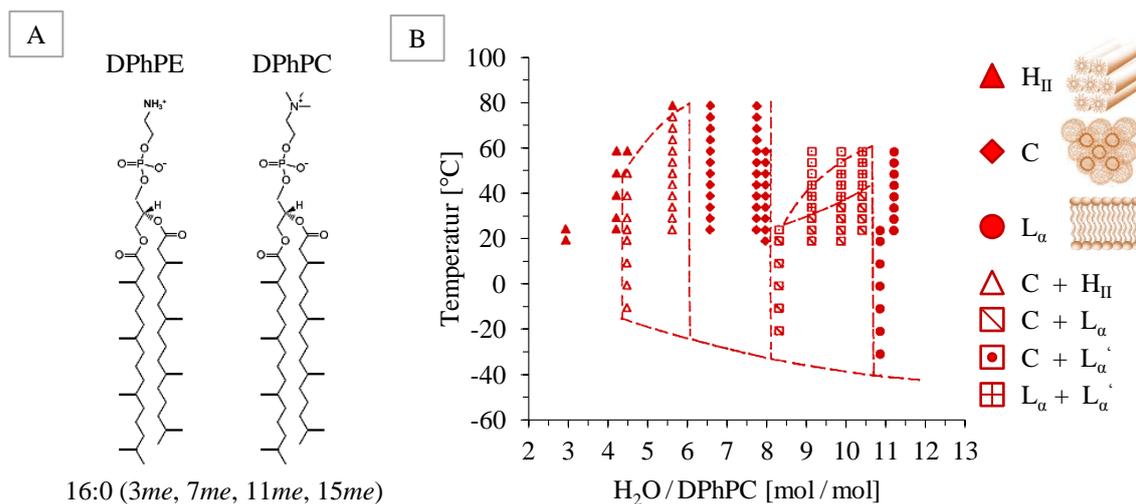


Abbildung 35 Phytanoyllipid DPhPC und DPhPE

A: Strukturformel von DPhPC und DPhPE. **B:** Phasendiagramm von DPhPC in H₂O. Phasengrenzung basiert auf Daten aus der Festkörper-NMR-Spektroskopie. Reine Lipidphasen werden durch volle Symbole und Lipidphasengemische durch offene Symbole gekennzeichnet (L_{α} und L_{α}' = lamellare Phasen; C = kubische Phase; H_{II} = inverse hexagonale Phase). Abbildungen verändert übernommen aus ^[217,223].

3.3.5.1 Orientierung von TatA₂₋₄₅ in Phytanoylmembranen

Um die Orientierung von TatA₂₋₄₅ in Phytanoylmembranen zu bestimmen, wurde das Protein in ersten Experimenten in dem Lipid DPhPC rekonstituiert und mit Hilfe der NMR-Spektroskopie untersucht. Die NMR-Spektren sind in Abbildung 36 gezeigt und zum Vergleich den NMR-Spektren von TatA₂₋₄₅ im Lipid DMPC gegenüber gestellt.

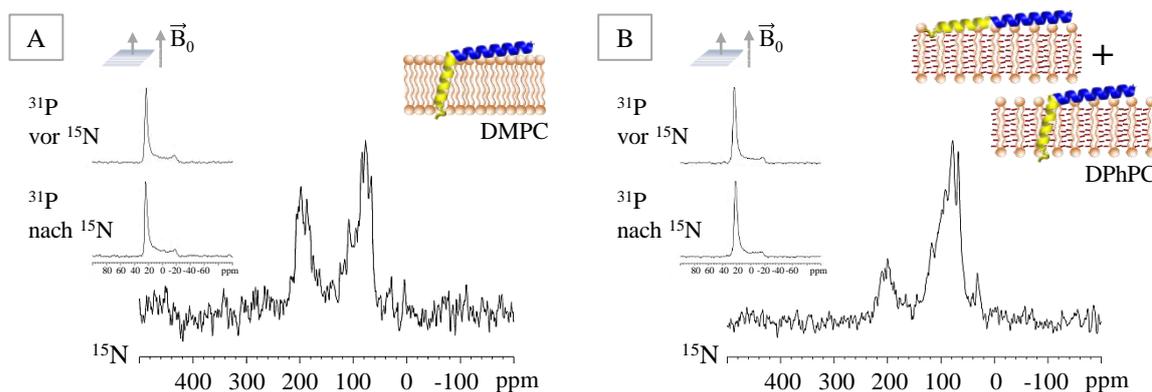


Abbildung 36 Vergleich der NMR-Spektren von TatA₂₋₄₅ in DMPC und DPhPC

A: NMR-Spektren von TatA₂₋₄₅ in DMPC. **B:** NMR-Spektren von TatA₂₋₄₅ in DPhPC.

Rekonstitutionsbedingungen: Lösungsmittel HFIP, pH 5–6, P : L = 1 : 75.

¹⁵N-NMR-Experimente: CP-RAMP-Echo, CP 43 kHz, Echo-Puls 50 kHz, Entkopplung 30 kHz, T = 35 °C.

Die ³¹P-NMR-Spektren zeigen in beiden Lipidsystemen einen sehr geringen Pulveranteil und demnach eine gute Orientierung der Lipidmoleküle. Der Vergleich der ¹⁵N-NMR-Spektren zeigt deutlich, dass die Signale der TMH im Bereich von 170–210 ppm einen Intensitätsunterschied aufweisen und dass sich die Signale im Bereich von 80–130 ppm

leicht unterscheiden. Im Lipid DPhPC ist die Signalintensität der transmembranen Proteinanteile deutlich geringer und die Signale der oberflächengebundenen Proteinanteile sind breiter. Daraus lässt sich schließen, dass die TMH von TatA₂₋₄₅ in DPhPC-Membranen zum Teil in einer membrandurchspannenden, aber auch zum Teil in einer oberflächengebundenen Orientierung vorliegt.

Die NMR-Probe von TatA₂₋₄₅ im Lipid DPhPC wurde auch in einer 90°-Orientierung der Membrannormalen relativ zum Magnetfeld gemessen. Durch eine solche Orientierungsänderung der Probe werden die Lipidkopfguppen senkrecht zum Magnetfeld ausgerichtet. Die ¹⁵N-NMR-Signale orientierter Proteinanteile werden um die isotrope Position bei 120 ppm im Spektrum gespiegelt und die Dimension der chemischen Verschiebung wird halbiert [224]. Durch diese Messungen sollten Informationen darüber gewonnen werden, welche Signale im 0°-Spektrum im Bereich von 80–130 ppm durch oberflächengebundene Proteinanteile hervorgerufen werden und welche dem Pulveranteil zuzuordnen sind. Der Vergleich der 0°- und 90°-Spektren von TatA₂₋₄₅ im Lipid DPhPC ist in Abbildung 37 gezeigt.

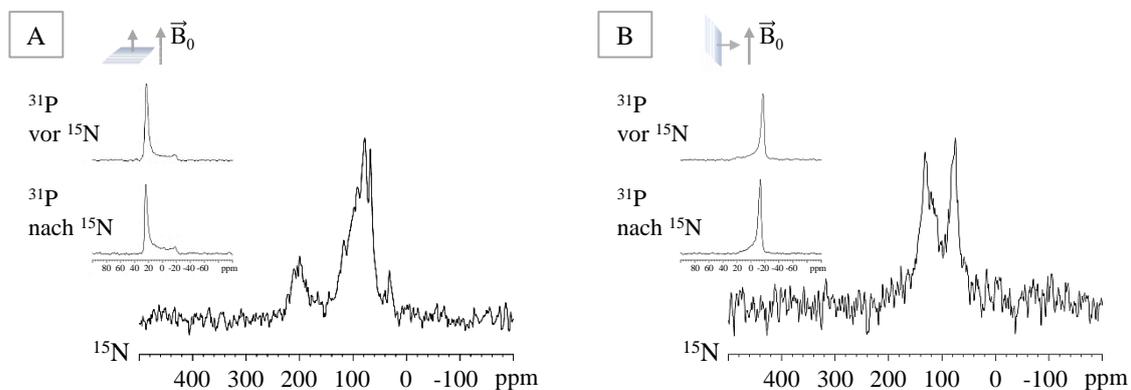


Abbildung 37 NMR-Spektren von TatA₂₋₄₅ in DPhPC in einer 0°- und 90°-Orientierung

A: NMR-Spektren von TatA₂₋₄₅ in DPhPC in einer 0°-Orientierung der Membrannormalen relativ zum Magnetfeld. **B:** NMR-Spektren von TatA₂₋₄₅ in DPhPC in einer 90°-Orientierung der Membrannormalen relativ zum Magnetfeld. Rekonstitutionsbedingungen: Lösungsmittel HFIP, pH 5–6, P : L = 1 : 75.

¹⁵N-NMR-Experimente: CP-RAMP-Echo, CP 43 kHz, Echo-Puls 50 kHz, Entkopplung 30 kHz, T = 35 °C.

Das ³¹P-NMR-Signal im Bereich von 20 ppm der 0°-Spektren wird in den 90°-Spektren in den Bereich von -10 ppm gespiegelt. Dies lässt sich durch die Orientierungsänderung der Lipidkopfguppen erklären, welche nicht mehr parallel, sondern senkrecht zum Magnetfeld ausgerichtet vorliegen. Im Fall der ¹⁵N-NMR-Spektren wird der Hauptanteil der Signale im Bereich von 80–130 ppm des 0°-Spektrums in den Bereich von 110–150 ppm des 90°-Spektrums gespiegelt. Dies spricht für einen hohen oberflächengebundenen Proteinanteil, der zum Teil auch von der oberflächengebundenen TMH stammt. Im 90°-Spektrum

wird das scharfe Signal im Bereich von 70–95 ppm von den gespiegelten Signalen der TMH hervorgerufen und von isotropen Signalen der Argininseitenketten sowie einem geringen Pulveranteil überlagert. Somit liefern diese Daten einen weiteren Hinweis, dass in DPhPC-Membranen ein anteiliges „Herausflippen“ der TMH von TatA₂₋₄₅ induziert wird.

Basierend auf diesem erfolversprechenden Ergebnis wurde zusätzlich das Phytanoyllipid DPhPE mit einem prozentualen Anteil von 5 % beigemischt. Dieses Lipid besitzt im Vergleich zu DPhPC eine kleinere kationische Kopfgruppe, wodurch noch mehr Platz in der Kopfgruppenregion für sich anlagernde TatA₂₋₄₅-Moleküle geboten werden sollte. In Abbildung 38 sind die NMR-Spektren von TatA₂₋₄₅ im Lipidgemisch aus 95 % DPhPC und 5 % DPhPE (DPhPC / 5 % PE) dargestellt.

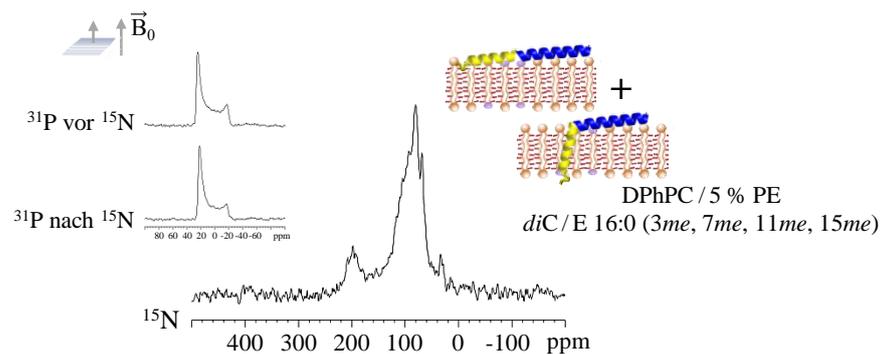


Abbildung 38 NMR-Spektren von TatA₂₋₄₅ in DPhPC / 5 % PE

Rekonstitutionsbedingungen: Lösungsmittel HFIP, pH 5–6, P:L = 1:75.

¹⁵N-NMR-Experiment: CP-RAMP-Echo, CP 43 kHz, Echo-Puls 50 kHz, Entkopplung 30 kHz, T = 35 °C.

Im Vergleich zum ¹⁵N-NMR-Spektrum von TatA₂₋₄₅ in reinem DPhPC ist hier zu erkennen, dass die Beimischung von 5 % DPhPE zu einer weiteren Intensitätssenkung der Signale der TMH im Bereich von 170–210 ppm führt. Demzufolge liegt in diesem Phytanoyllipidgemisch ein noch höherer Proteinanteil in einer oberflächengebundenen Orientierung vor. Diese Daten bekräftigen somit die Annahme, dass durch verzweigte Phytanoylmembranen und dem damit verbundenen erhöhten Platz in der Kopfgruppenregion ein „Herausflippen“ der TMH von TatA₂₋₄₅ begünstigt wird.

In weiteren Untersuchungen sollten die NMR-Ergebnisse auch mit Hilfe der SR-OCD-Spektroskopie bestätigt werden. Diese Messungen wurden von Frau M. Sc. Biol. Lena Steger (KIT) durchgeführt und werden hier zur Unterlegung der NMR-Daten gezeigt. Die orientierte Variante der CD-Spektroskopie basiert auf dem gleichen Prinzip wie die isotrope CD-Spektroskopie, wobei im Unterschied die Orientierung einer α -Helix in einer orientierten Lipiddoppelschicht bestimmt werden kann. Ein OCD-Spektrum einer α -Helix liefert bei 190 nm, 208 nm und 222 nm charakteristische Banden, welche zur Interpretation

herangezogen werden. Hierbei kann durch die An- und Abwesenheit der Bande bei 208 nm zwischen oberflächengebundenen und membrandurchspannenden Proteinanteilen unterschieden werden. Diese Methode liefert analog zur isotropen CD-Spektroskopie nur globale Informationen, wodurch ein OCD-Spektrum von TatA₂₋₄₅ ein Summenspektrum der Orientierungen der TMH und der APH zeigt. Da, wie bereits erwähnt, die Konzentration von TatA₂₋₄₅ aufgrund fehlender UV-absorbierender aromatischer Aminosäuren nicht genau bestimmt werden konnte, erfolgte auch hier nur eine qualitative Auswertung der SR-OCD-Spektren. Hierfür wurde das globale Minimum der Spektren auf die gleiche Intensität normiert. Bei der Probenpräparation der SR-OCD-Proben wurde ähnlich verfahren wie bei der Herstellung der NMR-Proben, um gleichbleibende Bedingungen zu gewährleisten. Das Protein wurde ebenfalls mit dem jeweiligen Lipid in HFIP solubilisiert und die Lösung auf einen Quarzglasprobenträger aufgetragen. Anschließend wurde die Probe bei einer 97 % rH hydratisiert, wobei sich im Unterschied zu einer NMR-Probe die Lipiddoppelschichten nur parallel zu einer einzigen Glasoberfläche ausbildeten. Um den Einfluss der Membranbeschaffenheit mit Hilfe der SR-OCD-Spektroskopie zu untersuchen, wurden als Membran-imitierende Modellsysteme ebenfalls das Lipid DMPC und das Lipidgemisch DPhPC/5 % PE verwendet. Die SR-OCD-Spektren sind den NMR-Spektren in Abbildung 39 gegenübergestellt.

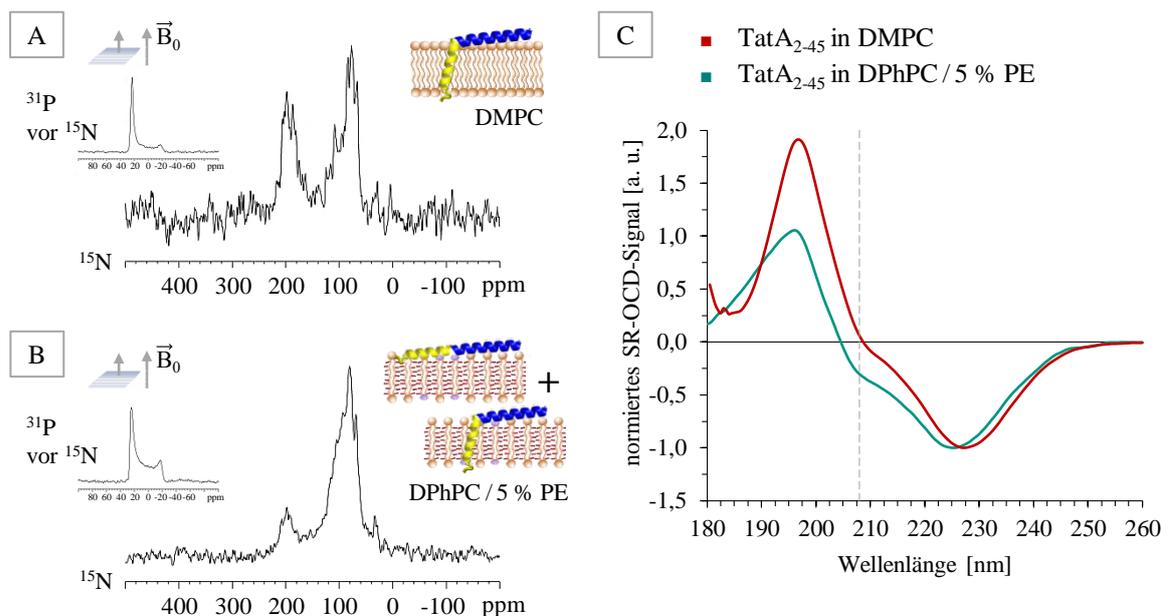


Abbildung 39 NMR- und SR-OCD-Spektren von TatA₂₋₄₅ in DMPC und DPhPC/5 % PE

A: NMR-Spektren von TatA₂₋₄₅ in DMPC; T = 35 °C. **B:** NMR-Spektren von TatA₂₋₄₅ in DPhPC/5 % PE; T = 35 °C. **C:** SR-OCD-Spektren von TatA₂₋₄₅ in DMPC und DPhPC/5 % PE; T = 30 °C. Das globale Minimum der Spektren wurde auf den Wert -1 normiert. Die Messungen wurden von Frau M. Sc. Biol. Lena Steger (KIT) durchgeführt. Rekonstitutionen: P : L = 1 : 75 (NMR) / 1 : 20 (SR-OCD), pH 5 – 6, HFIP.

¹⁵N-NMR-Experimente: CP-RAMP-Echo, CP 43 kHz, Echo-Puls 50 kHz, Entkopplung 30 kHz.

Das SR-OCD-Spektrum von TatA₂₋₄₅ in DPhPC/5 % PE zeigt eine stärkere Bande bei 208 nm als das SR-OCD-Spektrum von TatA₂₋₄₅ in DMPC, was auf einen größeren oberflächengebundenen Proteinanteil schließen lässt. Theoretisch könnte im Lipidgemisch DPhPC/5 % PE auch eine stärkere Neigung der TMH zu einer stärkeren Bande bei 208 nm führen. Diese Möglichkeit kann jedoch durch die NMR-Daten ausgeschlossen werden, da in diesem Lipidgemisch die ¹⁵N-NMR-Signale der TMH deutlich verringert sind und eine Neigung der TMH durch eine Verschiebung der Signale zu erkennen wäre. Somit bekräftigen die SR-OCD-Ergebnisse die NMR-Daten und deuten ebenfalls auf ein „Herausflippen“ der TMH von TatA₂₋₄₅ in Phytanoylmembranen hin.

3.3.5.2 Einfluss der Phytanoyllipid-Polymorphie

Die NMR-Spektren von TatA₂₋₄₅ in Phytanoyllipiden führten zu weiteren Ergebnissen, die zur Vorsicht bei der Verwendung dieser Lipidgruppe aufrufen und daher hier aufgeführt werden. Wie bereits erläutert, führen eine Dehydratation und eine Temperaturerhöhung zur spontanen Bildung der nicht-lamellaren kubischen und inversen hexagonalen Phase (C- und H_{II}-Phase) des Phytanoyllipids DPhPC^[217] (siehe Kapitel 3.3.5). Wenn die Orientierung eines Proteins in DPhPC mit Hilfe der NMR-Spektroskopie bestimmt werden soll, stellt die spontane Bildung dieser Phasen jedoch eine Gefahr dar, da sie zu Versuchsartefakten führt. Dieser Effekt soll am Beispiel von mehreren hintereinander aufgenommenen ³¹P-NMR- und ¹⁵N-NMR-Spektren von TatA₂₋₄₅ im Lipidgemisch DPhPC/5 % PE erläutert werden und ist in Abbildung 40 dargestellt.

Nach einer kurzen Messdauer zeigt das ¹⁵N-NMR-Spektrum, dass die TMH von TatA₂₋₄₅ zum Teil in einer membrandurchspannenden und zum Teil in einer oberflächengebundenen Orientierung vorliegt (Abbildung 40 A). Die vor und nach der ¹⁵N-NMR-Messung aufgenommenen ³¹P-NMR-Spektren zeigen eine recht gute Orientierung der Lipidmoleküle in ihrer flüssig-kristallinen L_α-Phase. Eine anschließende weitere ¹⁵N-NMR-Messung führt hingegen zu einem Spektrum, welches eine klare oberflächengebundene Orientierung von TatA₂₋₄₅ vortäuscht (siehe Abbildung 40 B), da im darauffolgenden ³¹P-NMR-Spektrum ein Signal bei 10 ppm zu erkennen ist, welches charakteristisch für die inverse hexagonale H_{II}-Phase der Lipide ist. Ein ³¹P-NMR-Spektrum einer solchen H_{II}-Phase wird im Vergleich zu einem ³¹P-NMR-Spektrum einer L_α-Phase um die isotrope Position bei 0 ppm gespiegelt und die Dimension der chemischen Verschiebung wird halbiert^[225]. Somit wird durch eine zu lange Messdauer und einer damit verbundenen Dehydratation der Probe, ein Übergang der Lipide in die H_{II}-Phase induziert. Die vorgetäuschte oberflächengebundene Orientierung von TatA₂₋₄₅ basiert daher nur auf der Bildung der anteiligen H_{II}-Phase der

Lipide. In einer solchen H_{II} -Phase liegt die APH von TatA₂₋₄₅ wahrscheinlich im Kopfgruppenkern der hexagonalen Röhren vor, während sich die TMH aufgrund der flexiblen Gelenkregion zwischen den Röhren orientiert und senkrecht zum Magnetfeld ausmittelt. Bei der Interpretation der ^{15}N -NMR-Spektren kann deshalb ohne Überprüfung der Lipidorientierung durch ein ^{31}P -NMR-Spektrum von einer falschen Orientierung der Proteine ausgegangen werden. Basierend auf dieser Erkenntnis wurden weitere NMR-Messungen, bei denen Phytanoyllipide verwendet wurden, bei einer niedrigeren Temperatur von 22 °C und mit kontrollierter Messdauer durchgeführt. Hierdurch sollte eine Dehydratation der NMR-Proben und ein Übergang der Lipide in ihre H_{II} -Phase verhindert werden.

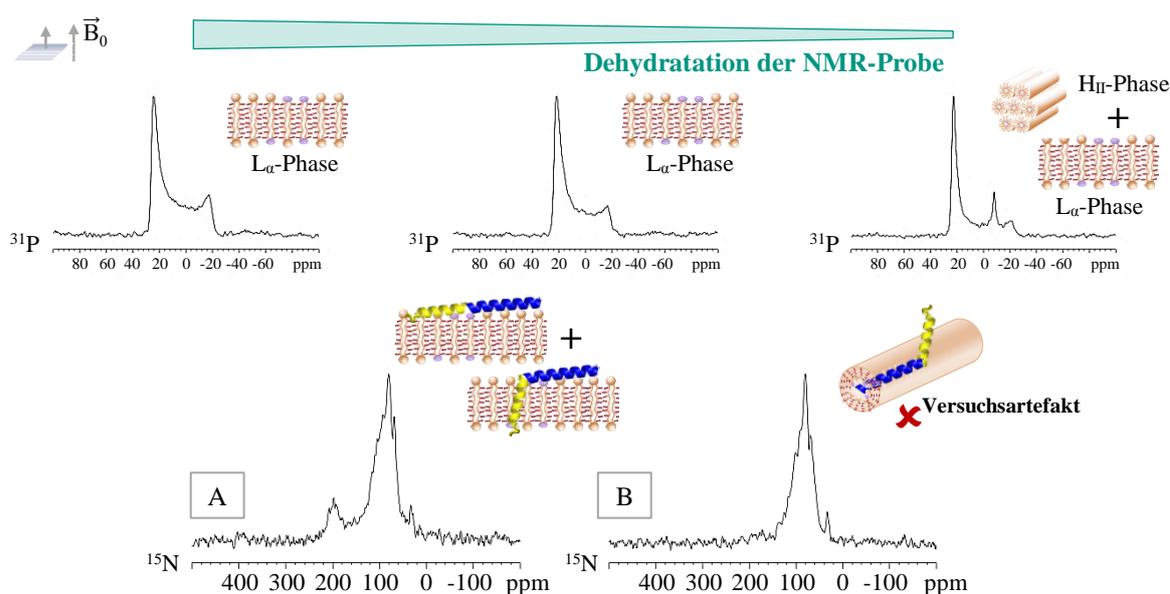


Abbildung 40 Auswirkungen einer Dehydratation der NMR-Probe

A: ^{15}N -NMR-Spektren von TatA₂₋₄₅ in DPhPC/5 % PE in der L_{α} -Phase der Lipide. **B:** ^{15}N -NMR-Spektren von TatA₂₋₄₅ in DPhPC/5 % PE in der H_{II} - und L_{α} -Phase der Lipide (nach Austrocknung der NMR-Probe durch eine lange Messdauer). Rekonstitutionsbedingungen: Lösungsmittel HFIP, pH 5–6, P:L = 1:75.

^{15}N -NMR-Experiment: CP-RAMP-Echo, CP 43 kHz, Echo-Puls 50 kHz, Entkopplung 30 kHz, T = 35 °C.

3.3.6 Einfluss der strukturellen Merkmale von Tata

Die Bestimmung der Membranorientierung von TatA₂₋₄₅ unter verschiedenen Systembedingungen lieferte mehrere Hinweise für eine Konformationsänderung der TMH. So deutet zum einen die Proteinaggregation in den dicken Membranen DPhPC und DNPC auf eine „Flip-Reaktion“ der TMH hin. Weiterhin führt eine Deprotonierung des N-Terminus zu einem anteiligen Eintauchen der TMH in dicken Membranen. Ein bedeutender Hinweis ist zudem, dass in Phytanoylmembranen eine anteilige oberflächengebundene Orientierung von TatA₂₋₄₅ induziert wird und somit diese Lipide ein „Herausflippen“ der TMH begünstigen. Diese Anhaltspunkte führten zu der Überlegung, neben den Systembedingungen

auch die strukturellen Merkmale des Proteins zu variieren, um ein „Herausflippen“ der TMH ohne TatC und ohne Protonengradient zu ermöglichen. Aus diesem Grund wurden TatA₂₋₄₅-Mutanten mit einer TMH-Verlängerung, einer TMH-Verkürzung und einer erhöhten N-terminalen Ladungsdichte dargestellt. Die zusätzlichen N-terminalen Ladungen sollten der TMH das Eintauchen in die Membran erschweren, während eine Verkürzung der TMH die energetische Barriere einer „Flip-Reaktion“ verringern sollte. Die Mutanten mit einer verlängerten TMH dienten hingegen als Kontrollmutanten, die eine membran-durchspannende Orientierung stabilisieren sollten. Abbildung 41 zeigt eine schematische Übersicht aller verwendeten Mutanten, und in Tabelle 5 sind die wichtigsten strukturellen Kenndaten der TMH dieser Proteine zusammengefasst.

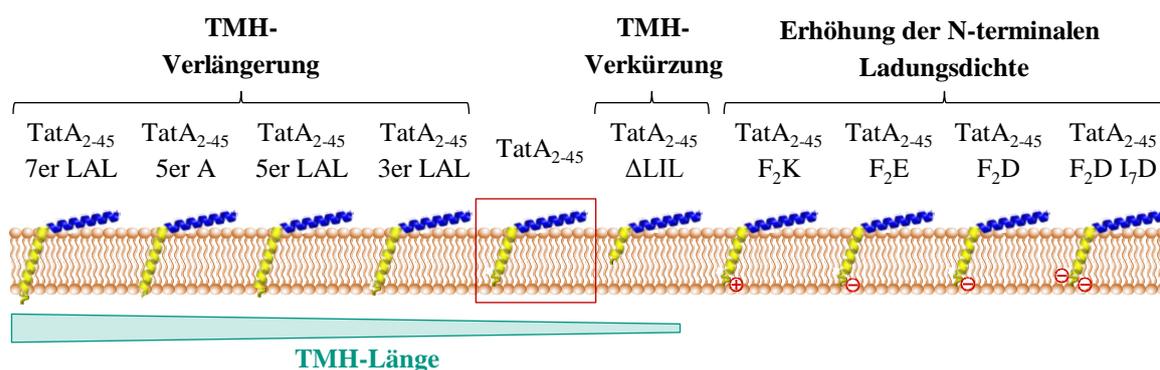


Abbildung 41 Übersicht der TatA₂₋₄₅-Mutanten

Schematische Darstellung der TatA₂₋₄₅-Mutanten mit einer TMH-Verlängerung, einer TMH-Verkürzung und einer erhöhten N-terminalen Ladungsdichte (Aminosäuresequenzen siehe Kapitel 3.1.).

Mutanten	AA-Anzahl der TMH	Sequenzbereich der TMH	TMH Länge [Å]	Anzahl der Helixwindungen	Mutation
TatA ₂₋₄₅ 7er LAL	23	P ₈ – P ₃₀	34,5	6,4	TMH-Verlängerung
TatA ₂₋₄₅ 5er A	22	F ₂ – P ₂₃	33,0	6,1	
TatA ₂₋₄₅ 5er LAL	21	P ₈ – P ₂₈	31,5	5,8	
TatA ₂₋₄₅ 3er LAL	19	P ₈ – P ₂₆	28,5	5,3	
TatA ₂₋₄₅	16	P ₈ – P ₂₃	24,0	4,4	
TatA ₂₋₄₅ ΔLIL	13	P ₈ – P ₂₀	19,5	3,6	TMH-Verkürzung
TatA ₂₋₄₅ F ₂ K	16	P ₈ – P ₂₃	24,0	4,4	Erhöhung der N-terminalen Ladungsdichte
TatA ₂₋₄₅ F ₂ E	16	P ₈ – P ₂₃	24,0	4,4	
TatA ₂₋₄₅ F ₂ D	16	P ₈ – P ₂₃	24,0	4,4	
TatA ₂₋₄₅ F ₂ D I ₇ D	16	P ₈ – P ₂₃	24,0	4,4	

Tabelle 5 Strukturelle Kenndaten der TMHs der TatA₂₋₄₅-Mutanten

Die Orientierung der Mutanten wurde ebenfalls in Abhängigkeit der Membrandicke sowie der Membranbeschaffenheit mit Hilfe der Festkörper-NMR- und SR-OCD-Spektroskopie analysiert und die erhaltenen Spektren mit denen des Fragments TatA₂₋₄₅ verglichen. Bei der Probenpräparation wurde ebenfalls eine Rekonstitution über das organische Lösungsmittel HFIP verwendet, um gleichbleibende Bedingungen zu gewährleisten.

3.3.6.1 Einfluss einer Erhöhung der N-terminalen Ladungsdichte

Die bisherigen Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, dass die TMH von TatA₂₋₄₅ im Lipid DMPC eine stabile membrandurchspannende Orientierung besitzt, während sie im Lipidgemisch DPhPC / 5 % PE auch eine anteilige oberflächengebundene Orientierung einnimmt. Um zu überprüfen, ob eine erhöhte N-terminale Ladungsdichte zu einer weiteren Erhöhung der oberflächengebundenen Proteinanteile führt, wurden die Mutanten TatA₂₋₄₅ F₂K, TatA₂₋₄₅ F₂E, TatA₂₋₄₅ F₂D und TatA₂₋₄₅ F₂D I₇D in diesen beiden Modellmembranen rekonstituiert und NMR-Experimente durchgeführt. Die erhaltenen Spektren wurden mit denen von TatA₂₋₄₅ verglichen und sind in Abbildung 42 dargestellt.

Der Pulveranteil der ³¹P-NMR-Spektren schwankt je nach verwendetem Lipidsystem und Protein, jedoch besitzen die Lipidmoleküle in allen Proben eine ausreichend gute Orientierung. Die ¹⁵N-NMR-Spektren der Ladungsmutanten zeigen keine großen Unterschiede zu denen von TatA₂₋₄₅ im jeweiligen Lipidsystem. Im Lipid DMPC sind deutliche Signale der TMH im Bereich von 170–210 ppm zu erkennen, die für eine membrandurchspannende Orientierung der TMH sprechen (siehe Abbildung 42 A). Im Lipidgemisch DPhPC / 5 % PE sind die Signale der TMH etwas geringer und deuten somit möglicherweise auf ein anteiliges „Herausflippen“ der TMH hin (siehe Abbildung 42 B). Zusammenfassend kann jedoch eine zusätzliche Konformationsänderung der TMH durch eine erhöhte N-terminale Ladungsdichte in diesen beiden Modellmembranen ausgeschlossen werden.

Eigentlich wäre zu erwarten gewesen, dass durch die überschüssigen Ladungen ein Eintauchen der TMH in Phytanoylmembranen stärker unterbunden wird, was jedoch nicht bestätigt werden konnte. Das Ergebnis, dass in DMPC-Membranen kein ausschlaggebender Effekt zu erkennen ist, lässt sich durch einen Vergleich der TMH-Längen mit der hydrophoben Membrandicke von 25,4 Å erklären. Die TMH der Ladungsmutanten besitzt analog zu TatA₂₋₄₅ eine Länge von 24,0 Å und somit eine passende Länge für eine stabile membrandurchspannende Orientierung, in der die überschüssigen N-terminalen Ladungen nicht in die hydrophobe Membranumgebung ragen.

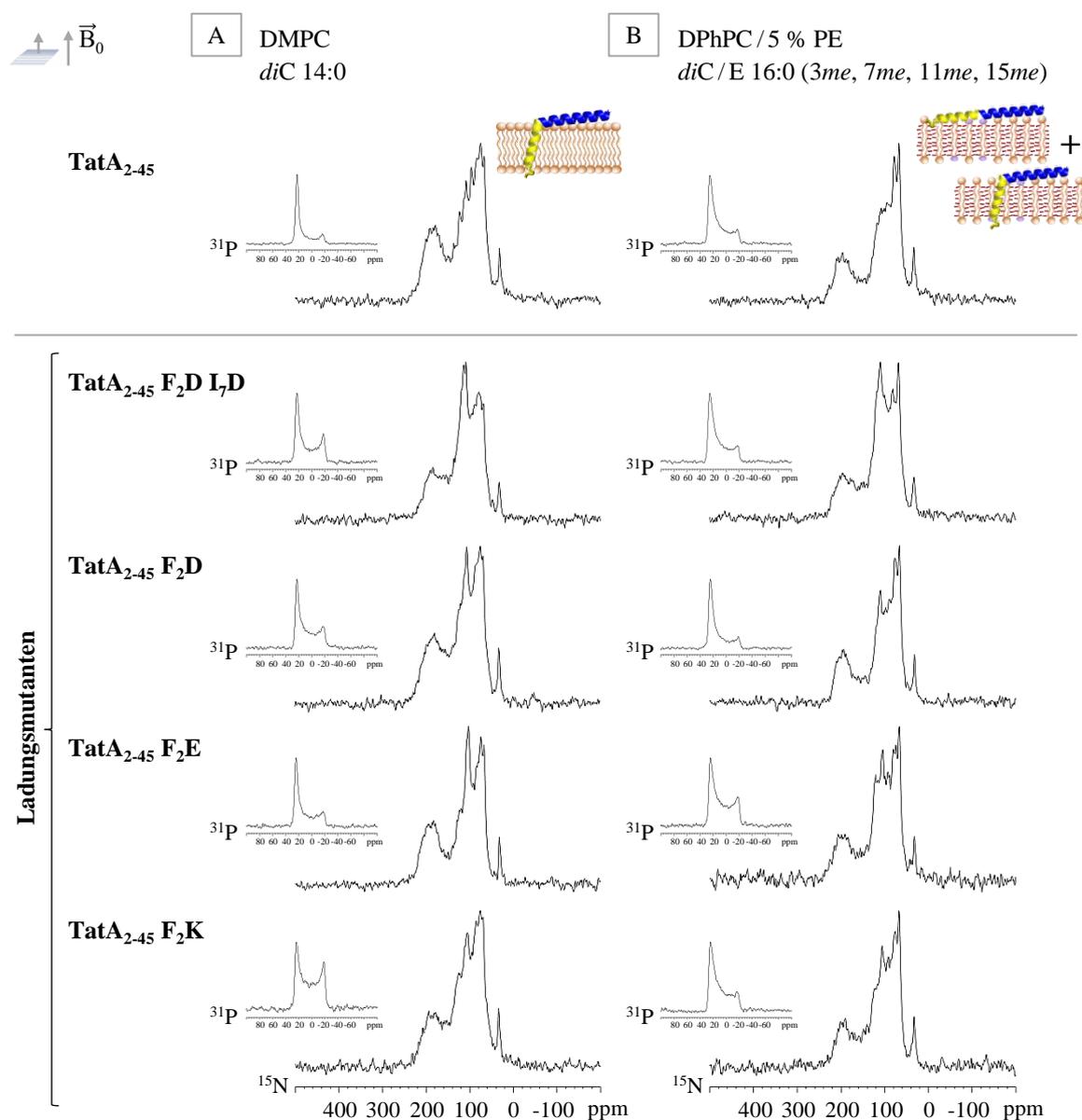


Abbildung 42 NMR-Spektren der Ladungsmutanten in DMPC und DPhPC/5 % PE

A: NMR-Spektren von TatA₂₋₄₅ und von den Ladungsmutanten in DMPC; T = 35 °C.

B: NMR-Spektren von TatA₂₋₄₅ und von den Ladungsmutanten in DPhPC/5 % PE; T = 22 °C.

Rekonstitutionsbedingungen: Lösungsmittel HFIP, pH 5–6, P : L = 1 : 75.

¹⁵N-NMR-Experimente: CP-RAMP-Echo, CP 35 kHz, Echo-Puls 40 kHz, Entkopplung 30 kHz.

Die Ladungsmutanten wurden auch in Abhängigkeit der Membrandicke mit Hilfe der NMR-Spektroskopie untersucht. Hierzu wurden die unverzweigten Phosphatidylcholinlipide mit unterschiedlicher Acylkettenlänge aus Tabelle 4 verwendet. Diese Messreihen führten in Analogie zur Messreihe von TatA₂₋₄₅ zu einer Konformationsänderung der TMH in Abhängigkeit der Membrandicke. In den kurzen Lipiden DOcPC und DDPC besitzt die TMH der Ladungsmutanten ebenfalls eine starke Neigung und richtet sich in den Lipiden DLPC bis DMPC mit zunehmender Membrandicke immer weiter auf. In dickeren Membranen zeigen die ¹⁵N-NMR-Spektren der Ladungsmutanten jedoch entscheidende

Unterschiede im Vergleich zu denen von TatA₂₋₄₅. Diese Unterschiede sind exemplarisch in Abbildung 43 durch einen NMR-Spektrenvergleich von TatA₂₋₄₅ und den zwei Mutanten TatA₂₋₄₅ F₂D und TatA₂₋₄₅ F₂D I₇D in den Lipiden DOPC, DEiPC und DErPC gezeigt.

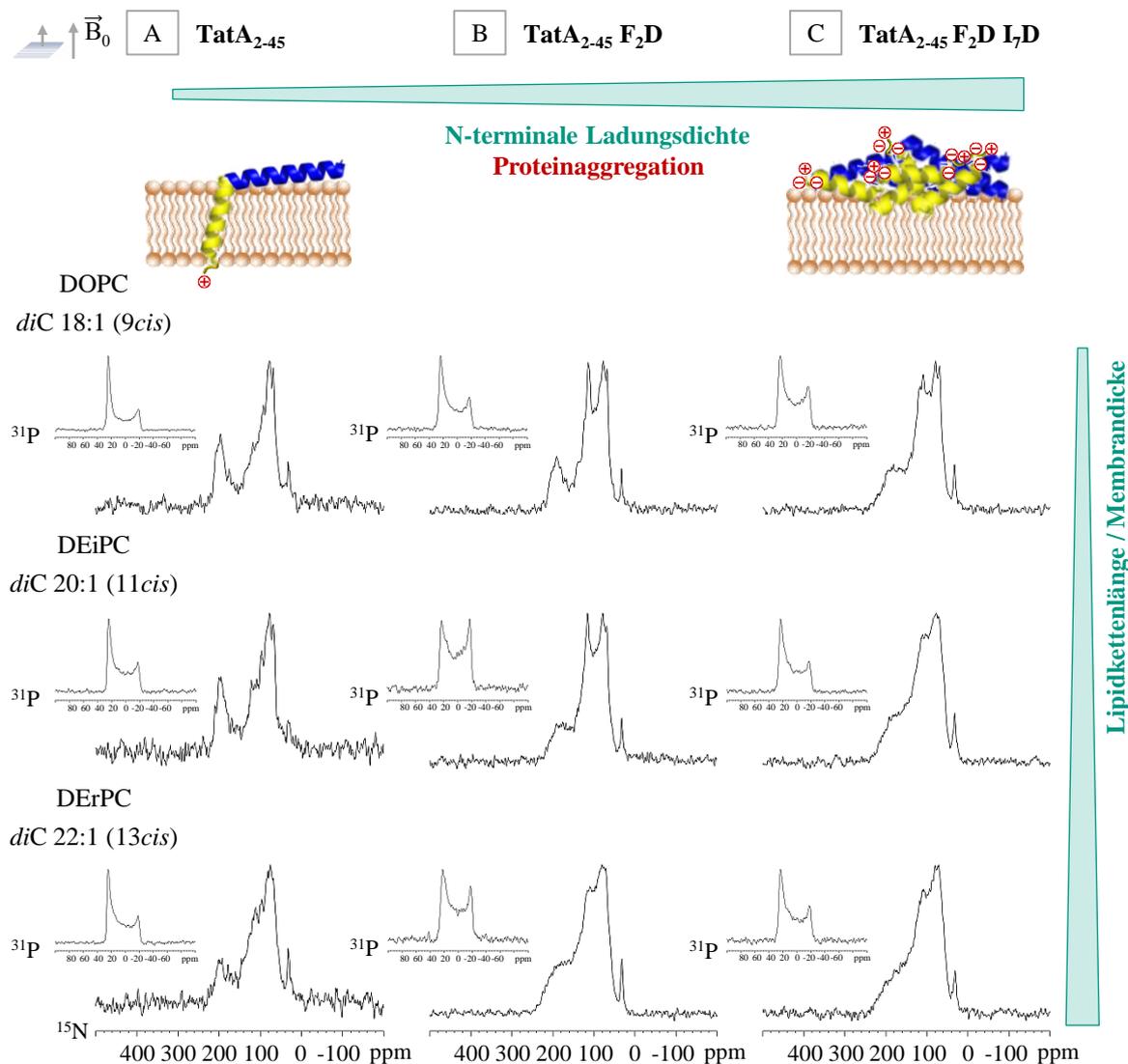


Abbildung 43 NMR-Spektren der Ladungsmutanten in dicken Membranen

A: NMR-Spektren von TatA₂₋₄₅ in den Lipiden DOPC, DEiPC und DErPC. **B:** NMR-Spektren der Mutante TatA₂₋₄₅ F₂D in den Lipiden DOPC, DEiPC und DErPC. **C:** NMR-Spektren der Mutante TatA₂₋₄₅ F₂D I₇D in den Lipiden DOPC, DEiPC und DErPC. Rekonstitutionsbedingungen: HFIP, pH 5–6, P : L = 1 : 75.

¹⁵N-NMR-Experimente: CP-RAMP-Echo, CP 35 kHz, Echo-Puls 40 kHz, Entkopplung 30 kHz, T = 35 °C.

Die ³¹P-NMR-Spektren der Ladungsmutanten zeigen im Vergleich zu denen von TatA₂₋₄₅ einen höheren Pulveranteil, woraus sich schließen lässt, dass die Orientierung der Lipidmoleküle durch die zusätzlichen Ladungen stark beeinträchtigt wird. Die ¹⁵N-NMR-Spektren von TatA₂₋₄₅ in den Lipiden DOPC und DEiPC zeigen noch eine gute Orientierung des Proteins. Erst ab dem Lipid DErPC ist ein hoher Pulveranteil zu erkennen, der sich auf eine mögliche Proteinaggregation zurückzuführen lässt (siehe Abbildung 43 A).

Dahingegen zeigt das ^{15}N -NMR-Spektrum von TatA₂₋₄₅ F₂D bereits im Lipid DEiPC und das ^{15}N -NMR-Spektrum von TatA₂₋₄₅ F₂D I₇D im Lipid DOPC einen hohen Pulveranteil (vergleiche Abbildung 43 B und 43 C). Daraus lässt sich schließen, dass eine zunehmende N-terminale Ladungsdichte schon in dünneren Membranen zu einer Proteinaggregation führt. Durch die energetisch ungünstigen, permanenten Ladungen, welche nicht durch eine Deprotonierung ausgelöscht werden können, wird eine stabile membranverankerte Orientierung der TMH unterbunden und möglicherweise ein „Herausflippen“ der TMH begünstigt, wobei jedoch die Proteine aggregieren.

3.3.6.2 Einfluss einer TMH-Verlängerung

Durch die NMR-Untersuchungen in Abhängigkeit der Membrandicke konnte experimentell belegt werden, dass sich die TMH von TatA₂₋₄₅ nur in Membranen annähernd senkrecht zur Membrannormalen orientiert, deren Dicke ungefähr mit der TMH-Länge übereinstimmt. In dünnen Membranen neigt sich hingegen die TMH, um sich der Membrandicke anzupassen und in dicken Membranen aggregiert wahrscheinlich das Protein. Die TatA₂₋₄₅-Mutanten mit einer TMH-Verlängerung dienten als Kontrollmutanten, deren TMHs um bis zu zwei Helixwindungen verlängert wurden. Durch diese Verlängerungen sollte einerseits eine Proteinaggregation in dicken Membranen verhindert werden und andererseits ein noch stärkerer Neigungseffekt in dünnen Membranen erzeugt werden. Um den Einfluss einer TMH-Verlängerung zu untersuchen, wurden die beiden Mutanten TatA₂₋₄₅ 3er LAL und TatA₂₋₄₅ 7er LAL in einigen unverzweigten Phosphatidylcholinlipiden mit unterschiedlicher Acylkettenlänge rekonstituiert und NMR-spektroskopisch untersucht (siehe Abbildung 44).

Das ^{15}N -NMR-Spektrum von TatA₂₋₄₅ 3er LAL im kürzesten Lipid DOcPC zeigt die Signale der TMH im Bereich von 130–160 ppm, welche für eine starke Neigung der Helix sprechen (siehe Abbildung 44 A). Zudem deutet das scharfe isotrope Signal bei 120 ppm auf flexible Proteinanteile hin. Im ^{31}P -NMR-Spektrum ist das isotrope Signal bei 0 ppm auch ein Anzeichen für eine mögliche micellenartige Lipidstruktur, in der das Protein keine gerichtete Orientierung annimmt. Im Lipid DDPC sind die Signale der TMH leicht hochfeldverschoben, was für ein leichtes Aufrichten der TMH spricht. In den Lipiden DMPC bis DNPC sind neben einem geringen Pulveranteil deutliche Signale der TMH im Bereich von 175–210 ppm zu erkennen. Demzufolge durchspannt die TMH anteilig diese Modellmembranen in einer annähernd senkrechten Orientierung. Die Daten belegen somit eindeutig, dass durch eine Verlängerung der TMH von nur drei Aminosäuren eine Protein-

aggregation in dicken Membranen teilweise verhindert wird und sich das Protein anteilig orientiert.

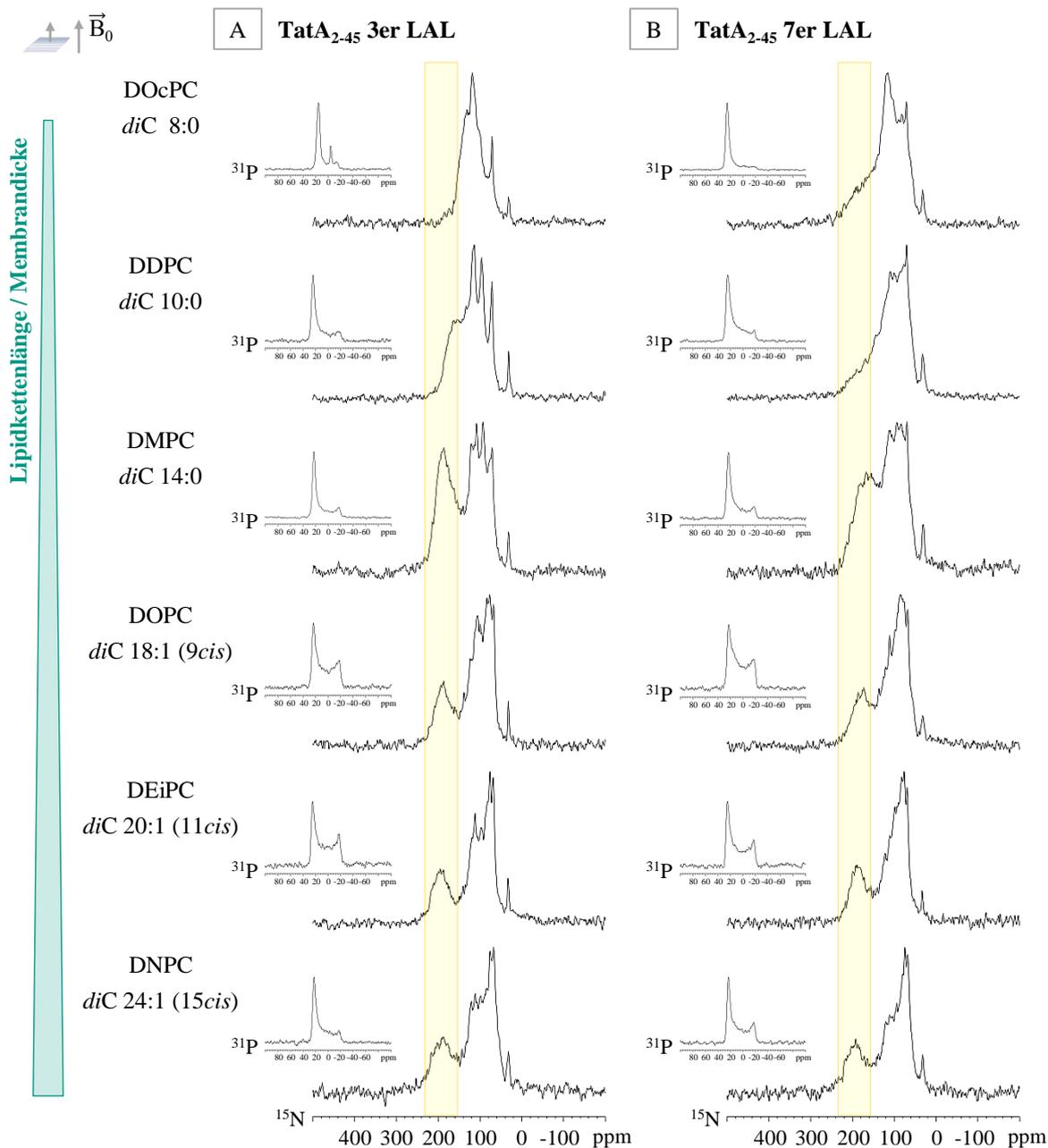


Abbildung 44 Vergleich der NMR-Spektren der Mutante $TatA_{2-45}$ 3er LAL und $TatA_{2-45}$ 7er LAL

A: NMR-Spektren der Mutante $TatA_{2-45}$ 3er LAL in Phosphatidylcholinlipiden mit unterschiedlicher Acylkettenlänge. **B:** NMR-Spektren der Mutante $TatA_{2-45}$ 7er LAL in Phosphatidylcholinlipiden mit unterschiedlicher Acylkettenlänge. Rekonstitutionsbedingungen: Lösungsmittel HFIP, pH 5–6, P:L = 1:75.

^{15}N -NMR-Experimente: CP-RAMP-Echo, CP 35 kHz, Echo-Puls 40 kHz, Entkopplung 30 kHz, T = 35 °C.

Die ^{15}N -NMR-Spektren von $TatA_{2-45}$ 7er LAL in den Lipiden DOcPC und DDPC zeigen neben einem hohen Pulveranteil Signale der TMH im Bereich von 130–160 ppm, welche auf eine starke Neigung der Helix schließen lassen (siehe Abbildung 44 B). Im Lipid DMPC sind die Signale der TMH hingegen etwas hochfeldverschoben und deuten auf ein

leichtes Aufrichten der TMH hin. Ein Vergleich der beiden Mutanten zeigt somit, dass in DMPC die TMH von TatA₂₋₄₅ 7er LAL geneigt vorliegt, wohingegen die TMH von TatA₂₋₄₅ 3er LAL eine annähernd senkrechte Orientierung besitzt. Diese unterschiedliche Orientierung lässt sich durch die unterschiedliche TMH-Länge der Mutanten erklären. Somit neigt sich die TMH in Abhängigkeit ihrer Länge, um sich der jeweiligen Membrandicke anzupassen. Im Lipid DOPC sind die ¹⁵N-NMR-Signale der TMH im Bereich von 150–200 ppm zu erkennen und deuten auf eine noch leicht geneigte Orientierung der Helix hin. In den Lipiden DEiPC bis DNPC zeigen die ¹⁵N-NMR-Spektren hingegen Signale der TMH im Bereich von 175 – 210 ppm. Demzufolge kann die TMH der Mutante TatA₂₋₄₅ 7er LAL auch dicke Membranen durchspannen und eine Proteinaggregation, wie sie bei TatA₂₋₄₅ beobachtet wurde, wird teilweise unterbunden.

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss einer TMH-Verlängerung auch in Abhängigkeit der Membranbeschaffenheit analysiert. Hierzu wurden die Mutanten mit einer verlängerten TMH im Lipid DMPC und im Lipidgemisch DPhPC/5 % PE rekonstituiert und NMR-spektroskopisch untersucht. Die erhaltenen NMR-Spektren sind in Abbildung 45 denen von TatA₂₋₄₅ gegenübergestellt.

Im Verlauf der ¹⁵N-NMR-Spektren verschieben sich die Signale der TMH im Lipid DMPC mit zunehmender TMH-Länge immer weiter in den Bereich von 140–190 ppm (siehe Abbildung 45 A). Diese Spektren belegen somit, dass die TMH von TatA₂₋₄₅ und von der Mutante TatA₂₋₄₅ 3er LAL die Membran noch annähernd senkrecht durchspannt, während die TMH der Mutanten TatA₂₋₄₅ 5er LAL, TatA₂₋₄₅ 5er A und TatA₂₋₄₅ 7er LAL eine geneigte Orientierung annimmt. Demzufolge neigt sich die TMH mit zunehmender Länge immer stärker in der Membran, um das hydrophobe Ungleichgewicht zwischen Membrandicke und TMH-Länge zu kompensieren.

Im Lipidgemisch DPhPC/5 % PE zeigen die ¹⁵N-NMR-Spektren der Mutanten mit einer TMH-Verlängerung stärkere Signale im Bereich von 175–210 ppm als das Spektrum von TatA₂₋₄₅ (siehe Abbildung 45 B). Diese erhöhte Signalintensität deutet darauf hin, dass durch eine Verlängerung der TMH eine membrandurchspannende Orientierung stabilisiert wird und das anteilige „Herausflippen“ der TMH in Phytanoylmembranen verhindert wird.

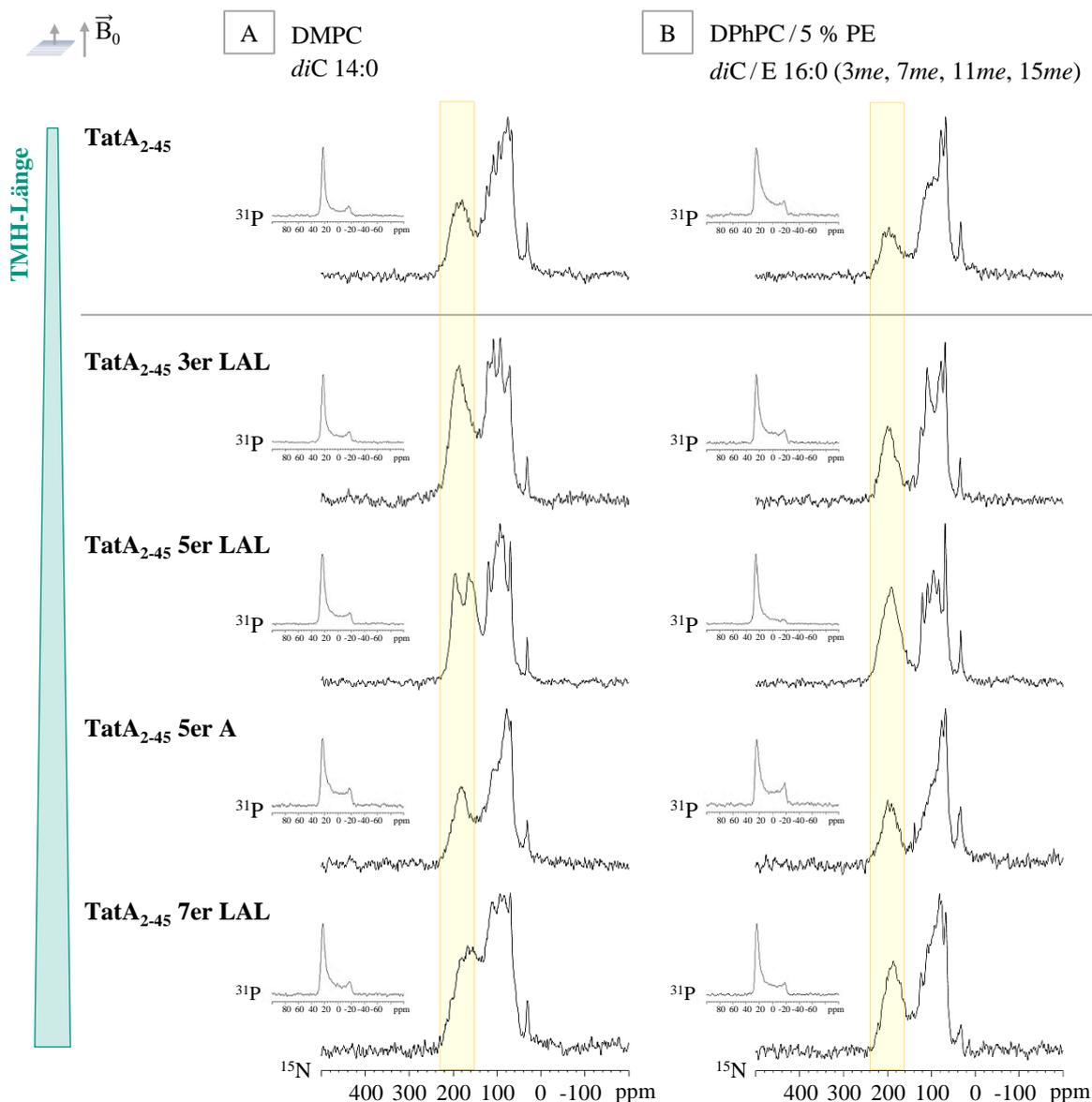


Abbildung 45 NMR-Spektren der Mutanten mit einer TMH-Verlängerung

A: NMR-Spektren der Mutanten mit einer TMH-Verlängerung in DMPC; T = 35 °C.

B: NMR-Spektren der Mutanten mit einer TMH-Verlängerung in DPhPC/5 % PE; T = 22 °C.

Rekonstitutionsbedingungen: Lösungsmittel HFIP, pH 5–6, P:L = 1:75.

¹⁵N-NMR-Experimente: CP-RAMP-Echo, CP 35 kHz, Echo-Puls 40 kHz, Entkopplung 30 kHz.

Um diese NMR-Daten zu unterlegen, wurde in weiteren Experimenten die Orientierung der Mutanten TatA₂₋₄₅ 3er LAL und TatA₂₋₄₅ 7er LAL im Lipid DMPC und im Lipidgemisch DPhPC/5 % PE auch mit Hilfe der SR-OCD-Spektroskopie analysiert. Die erhaltenen SR-OCD-Spektren sind in Abbildung 46 denen von TatA₂₋₄₅ gegenübergestellt.

Im Lipid DMPC verstärkt sich die Bande bei 208 nm mit zunehmender Länge der TMH (siehe Abbildung 46 A). Dies spricht für eine zunehmende Neigung der TMH mit ansteigender TMH-Länge und bekräftigt somit die NMR-Ergebnisse.

Im Lipidgemisch DPhPC/5 % PE ist die Bande bei 208 nm von TatA₂₋₄₅ 3er LAL und TatA₂₋₄₅ 7er LAL viel schwächer ausgeprägt als von TatA₂₋₄₅ (siehe Abbildung 46 B). Daraus lässt sich schließen, dass der oberflächengebundene Proteinanteil der Mutanten mit einer verlängerten TMH kleiner ist als der von TatA₂₋₄₅. Diese Daten bekräftigen somit ebenfalls die NMR-Ergebnisse und belegen, dass in Phytanoylmembranen ein „Herausflippen“ der TMH durch eine Verlängerung anteilig verhindert wird.

Dennoch zeigen diese Daten auch die Interpretationsgrenze von OCD-Spektren auf. Da bei einer Verschiebung der Bande bei 208 nm keine klare Unterscheidung getroffen werden kann, ob es sich um eine Neigung der Helix oder um ein anteiliges „Herausflippen“ der Helix handelt, lassen sich diese Daten nur unter Berücksichtigung der komplementären NMR-Daten interpretieren.

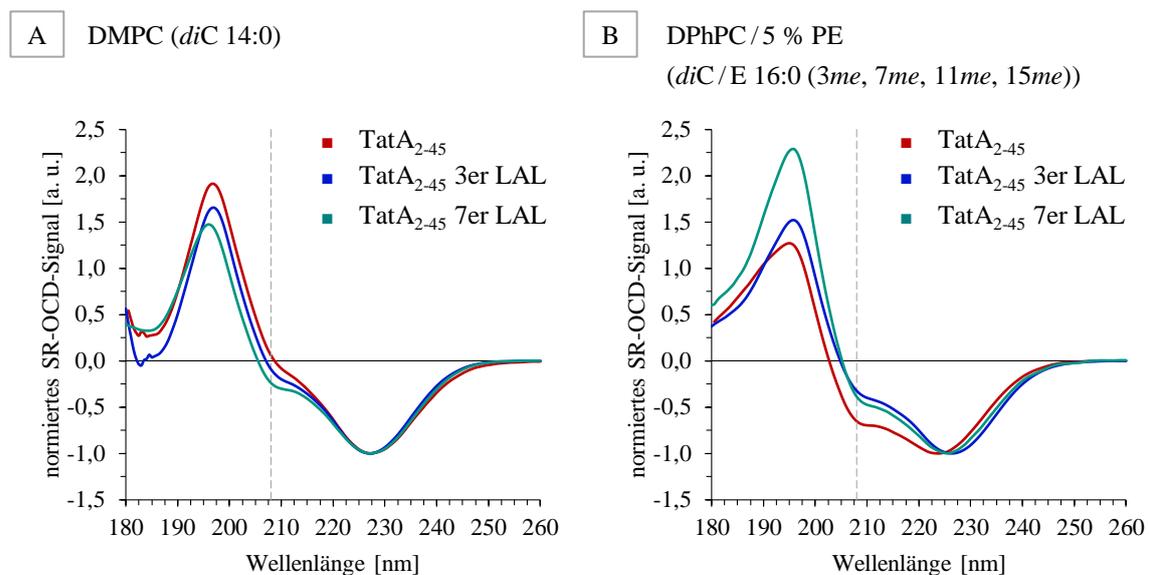


Abbildung 46 SR-OCD-Spektren der Mutanten mit einer TMH-Verlängerung

A: SR-OCD-Spektren von TatA₂₋₄₅, TatA₂₋₄₅ 3er LAL und TatA₂₋₄₅ 7er LAL in DMPC; T = 30 °C.

B: SR-OCD-Spektren von TatA₂₋₄₅, TatA₂₋₄₅ 3er LAL und TatA₂₋₄₅ 7er LAL in DPhPC/5 % PE; T = 30 °C.

Das globale Minimum der Spektren wurde auf den Wert -1 normiert. Die Messungen wurden von Frau M. Sc. Biol. Lena Steger (KIT) durchgeführt. Rekonstitution: Lösungsmittel HFIP, pH 5–6, P:L = 1:20.

3.3.6.3 Einfluss einer TMH-Verkürzung

Um den Einfluss einer TMH-Verkürzung zu untersuchen, wurde die Mutante TatA₂₋₄₅ ΔLIL dargestellt. Diese Mutante besitzt eine TMH von nur 13 Aminosäuren mit einer Länge von 19,5 Å. Die Darstellung dieser Mutante beruhte vorwiegend auf der Überlegung, die energetische Barriere einer „Flip-Reaktion“ durch eine Verkürzung der TMH zu minimieren. Basierend auf den bisherigen Ergebnissen, dass Phytanoylmembranen ein anteiliges „Herausflippen“ der TMH von TatA₂₋₄₅ induzieren, wurde auch diese Mutante im Lipidgemisch DPhPC/5 % PE rekonstituiert und NMR- sowie SR-OCD-

Messungen durchgeführt. Die NMR-Spektren sind in Abbildung 47 und die SR-OCD-Spektren in Abbildung 48 dargestellt und mit den jeweiligen Spektren von TatA₂₋₄₅ verglichen.

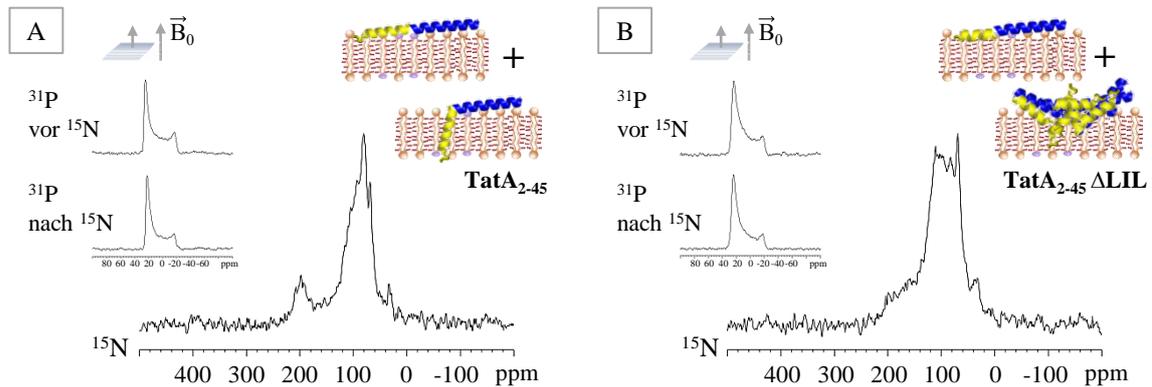


Abbildung 47 Vergleich der NMR-Spektren von TatA₂₋₄₅ und TatA₂₋₄₅ ΔLIL in DPhPC/5 % PE

A: NMR-Spektren von TatA₂₋₄₅ in DPhPC/5 % PE. ¹⁵N-NMR-Experiment: CP-RAMP-Echo, Entkopplung 30 kHz, CP 43 kHz, Echo-Puls 50 kHz, T = 35 °C. **B:** NMR-Spektren von TatA₂₋₄₅ ΔLIL in DPhPC/5 % PE. ¹⁵N-NMR-Experiment: CP-RAMP-Echo, Entkopplung 30 kHz, CP 35 kHz, Echo-Puls 40 kHz, T = 22 °C. Rekonstitutionsbedingungen: Lösungsmittel HFIP, pH 5–6, P:L = 1:75.

Der Vergleich der ¹⁵N-NMR-Spektren zeigt eindeutig, dass im Fall von TatA₂₋₄₅ noch ein schwaches Signal der TMH im Bereich von 175–210 ppm vorhanden ist, während es im Fall der Mutante TatA₂₋₄₅ ΔLIL nicht zu beobachten ist. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Signalintensität im Bereich von 80–120 ppm im ¹⁵N-NMR-Spektrum der Mutante TatA₂₋₄₅ ΔLIL zugenommen hat. Diese Signale stammen von der nun oberflächengebundenen TMH, der APH und neben Signalen der Argininseitenketten auch von einem gewissen Pulveranteil. Somit lässt sich aus diesen Daten schließen, dass durch eine Verkürzung der TMH um gerade mal drei Aminosäuren die energetische Barriere einer „Flip-Reaktion“ der TMH vollständig überwunden wird. Die TMH der Mutante TatA₂₋₄₅ ΔLIL taucht nicht in die Membran ein, sondern orientiert sich anteilig auf der Membranoberfläche.

Der Vergleich der SR-OCD-Spektren zeigt zudem, dass die Bande bei 208 nm im Fall von TatA₂₋₄₅ ΔLIL stärker ausgeprägt ist als im Fall von TatA₂₋₄₅ (siehe Abbildung 48 A). Somit belegen auch diese Daten, dass sich ein hoher Proteinanteil von TatA₂₋₄₅ ΔLIL oberflächengebunden orientiert und die TMH an die Membranoberfläche „flippt“. Der Vergleich mehrerer SR-OCD-Messungen der Mutante TatA₂₋₄₅ ΔLIL zeigt jedoch auch eine Absorptionsabflachung bei 190 nm, welche auf eine Proteinaggregation hindeuten kann (siehe Abbildung 48 B). Bei der Interpretation dieser Daten muss demnach berücksichtigt werden, dass bei einer Aggregation ohne Entfaltung des Proteins die Helices in allen Orientierungen vorliegen und zu einem isotropen α-helikalen CD-Spektrum führen. Ein

solches Spektrum kann nicht von einem OCD-Spektrum einer flach auf der Membran aufliegenden Helix unterschieden werden. Da jedoch auch das Spektrum ohne Absorptionsabflachung (Messung 1) eine deutlich ausgeprägte Bande bei 208 nm aufweist, scheint die mögliche Proteinaggregation das Ergebnis nicht zu verfälschen.

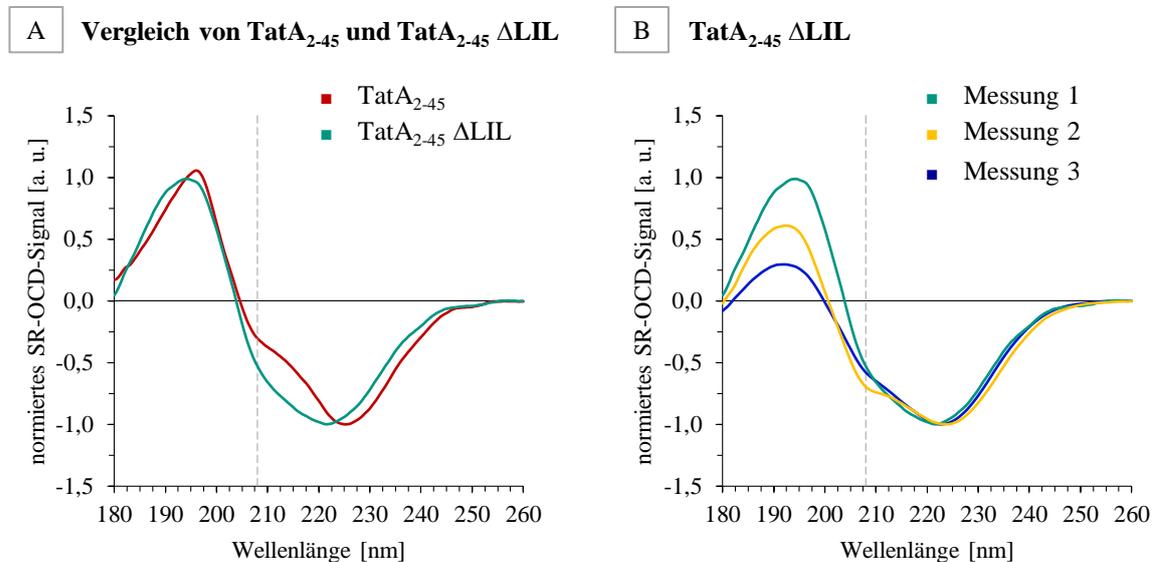


Abbildung 48 Vergleich der SR-OCD-Spektren von TatA₂₋₄₅ und TatA₂₋₄₅ ΔLIL in DPhPC/5 % PE

A: SR-OCD-Spektren von TatA₂₋₄₅ und der Mutante TatA₂₋₄₅ ΔLIL in DPhPC/5 % PE.

B: SR-OCD-Spektren mehrerer analoger Messungen von der Mutante TatA₂₋₄₅ ΔLIL in DPhPC/5 % PE.

Das globale Minimum der Spektren wurde auf den Wert -1 normiert. Die Messungen wurden von Frau M. Sc. Biol. Lena Steger (KIT) durchgeführt. Rekonstitution: Lösungsmittel HFIP, pH 5–6, P:L = 1:20.

Da Phytanoyllipide in natürlichen biologischen Membranen eher selten vorkommen, wurde zudem überprüft, ob das „Herausflippen“ der TMH der Mutante TatA₂₋₄₅ ΔLIL auch in unverzweigten Phosphatidylcholinlipiden beobachtet werden kann. Hierfür wurde das Protein in Abhängigkeit der Membrandicke untersucht und in ersten Experimenten der Einfluss der TMH-Verkürzung in dünnen Membranen erforscht. Für diese SR-OCD- und Festkörper-NMR-Untersuchungen wurde die Mutante TatA₂₋₄₅ ΔLIL in den Lipiden DOcPC bis DMPC der Phosphatidylcholinlipidserie aus Tabelle 4 rekonstituiert (siehe Abbildung 49). Vergleicht man die hydrophobe Dicke dieser Modellmembranen mit der TMH-Länge der Mutante TatA₂₋₄₅ ΔLIL, wäre eine stabile membrandurchspannende Orientierung des Proteins zu erwarten.

dadurch erklären, dass die sehr kurze TMH teilweise an der Membranoberfläche fluktuiert und nicht vollständig gefaltet ist. Des Weiteren deuten die Daten darauf hin, dass die TMH-Länge unabhängig von der Membrandicke einen entscheidenden Einfluss auf die Orientierung des Proteins besitzt und eine Tendenz zum „flippen“ aufgrund der sehr kurzen TMH entsteht.

Diese nicht übereinstimmenden Ergebnisse der NMR- und SR-OCD-Experimente könnten in den unterschiedlichen Messbedingungen und der damit verbundenen möglichen Dehydratation der Probe begründet liegen. SR-OCD-Messungen werden bei einer annähernd konstanten 97 % rH durchgeführt und deren Messdauer beträgt circa 1 h, wodurch eine Dehydratation der Probe ausgeschlossen werden kann. Die Messdauer von ^{15}N -NMR-Experimenten beträgt hingegen über 24 h und die Verpackungsart der NMR-Proben liefert auch keinen 100 %igen Schutz vor einer Dehydratation^[226]. Eine solche Dehydratation würde die Fluidität der Lipiddoppelschichten verringern und zu rigideren Membranen führen. Diese Rigidität könnte möglicherweise ein „Herausflippen“ der TMH von TatA₂₋₄₅ ΔLIL begünstigen und somit eine mögliche Erklärung der unerwarteten NMR-Ergebnisse liefern.

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss der verkürzten TMH in dicken Membranen erforscht. Für diese SR-OCD- und Festkörper-NMR-Untersuchungen wurde die Mutante TatA₂₋₄₅ ΔLIL in den Lipiden DOPC bis DNPC der Phosphatidylcholinlipidserie aus Tabelle 4 rekonstituiert (siehe Abbildung 50). Vergleicht man die hydrophobe Dicke dieser Modellmembranen mit der TMH-Länge der Mutante TatA₂₋₄₅ ΔLIL, wäre eine membran-durchspannende Orientierung des Proteins nicht mehr möglich, wodurch ein „Herausflippen“ der TMH zu erwarten wäre.

Die SR-OCD-Spektren von TatA₂₋₄₅ ΔLIL in DEiPC und DNPC zeigen eine starke Bande bei 208 nm, die für einen hohen oberflächengebundenen Proteinanteil spricht (siehe Abbildung 50 A). Zudem ist zu erkennen, dass die Bande bei 222 nm im Fall von TatA₂₋₄₅ ΔLIL in DNPC nach links verschoben ist, was auf zusätzliche unstrukturierte Proteinanteile hindeutet. Die ^{15}N -NMR-Spektren von TatA₂₋₄₅ ΔLIL in den Lipiden DOPC bis DNPC zeigen Signale im Bereich von 80–130 ppm, welche von der nun oberflächengebundenen TMH, der APH und neben Signalen der Argininseitenketten auch von einem gewissen Pulveranteil stammen (siehe Abbildung 50 B). Bei genauerer Betrachtung ist zudem zu erkennen, dass die ^{15}N -NMR-Spektren von TatA₂₋₄₅ ΔLIL in DEiPC, DErPC und DNPC einen geringeren Pulveranteil aufweisen. Die SR-OCD- und NMR-Daten liefern somit übereinstimmende Ergebnisse und belegen, dass die Mutante TatA₂₋₄₅ ΔLIL auch in unver-

zweigigen dicken Membranen anteilig in einer oberflächengebundenen Orientierung vorliegt und die TMH nicht in die Membran eintaucht.

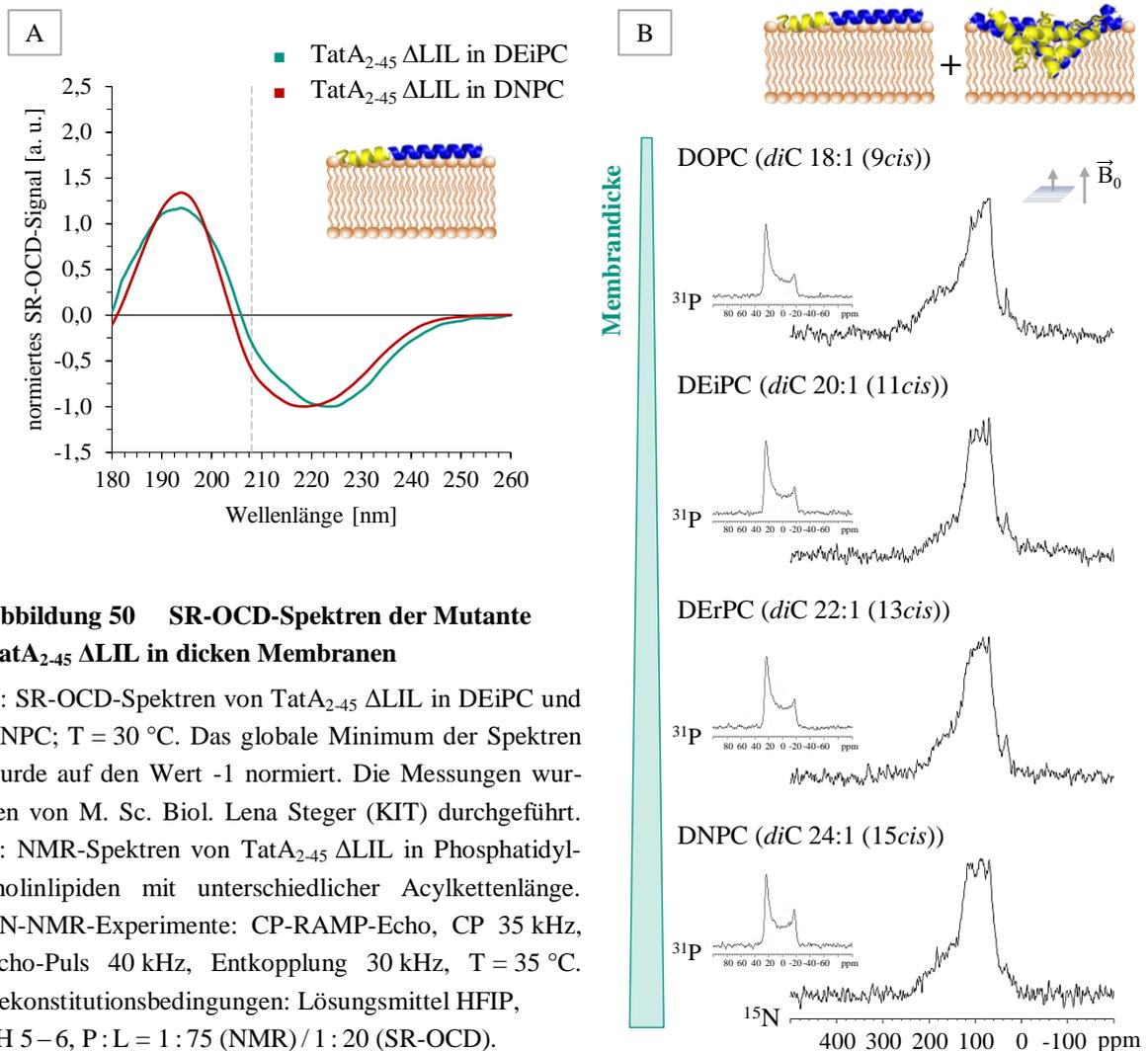


Abbildung 50 SR-OCD-Spektren der Mutante TatA₂₋₄₅ ΔLIL in dicken Membranen

A: SR-OCD-Spektren von TatA₂₋₄₅ ΔLIL in DEiPC und DNPC; T = 30 °C. Das globale Minimum der Spektren wurde auf den Wert -1 normiert. Die Messungen wurden von M. Sc. Biol. Lena Steger (KIT) durchgeführt.

B: NMR-Spektren von TatA₂₋₄₅ ΔLIL in Phosphatidylcholinlipiden mit unterschiedlicher Acylkettenlänge. ¹⁵N-NMR-Experimente: CP-RAMP-Echo, CP 35 kHz, Echo-Puls 40 kHz, Entkopplung 30 kHz, T = 35 °C. Rekonstitutionsbedingungen: Lösungsmittel HFIP, pH 5–6, P:L = 1:75 (NMR)/1:20 (SR-OCD).

Zusammenfassend konnte mit den hier vorgestellten NMR- und SR-OCD-Daten somit eine oberflächengebundene Orientierung der TMH von TatA nachgewiesen werden. Hierdurch ist es gelungen, einen ersten experimentellen Beweis für unseren neuen Translokationsmechanismus der Tat-abhängigen Proteintranslokation zu erbringen, nach welchem das Membranprotein TatC als eine Proteinflippase auf TatA wirkt.

4. Diskussion

4.1 Die lösliche Form von *B. subtilis* TatA_d

Die lösliche Form von TatA_d wurde bislang noch nicht weitreichend erforscht, wodurch auch nur wenig experimentelle Daten existieren. Dennoch konnte das Protein neben einer membrangebundenen Form auch zytoplasmatisch im Bakterium *B. subtilis* lokalisiert werden^[156,164]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass TatA_d in seiner löslichen Form zur oligomeren Komplexbildung neigt und mit dem Tat-abhängigen Substrat PhoD interagiert^[161,162]. Darauf basierend wurde in der vorliegenden Arbeit die lösliche Form von TatA_d *in vitro* charakterisiert.

Hierzu wurde das Protein rekombinant dargestellt, aufgereinigt und dessen Löslichkeitsverhalten in salzhaltigen Lösungen in Abhängigkeit des pH-Wertes analysiert. Diese SDS-PAGE-Daten führten zu dem Ergebnis, dass TatA_d eine hohe Löslichkeit in salzhaltigen Lösungen besitzt und nur im pH-Bereich von 3,5–5,5 unlöslich ist. Unter und oberhalb dieses pH-Bereichs steigt die Löslichkeit kontinuierlich an und ab pH 2,5 sowie pH 8,0 tritt eine vollständige Löslichkeit des Proteins ein. Anhand dieser Daten lässt sich einerseits die schlechte Löslichkeit von TatA_d in Milli-Q Wasser erklären, welches durch Kohlenstoffdioxid einen pH-Wert von 4,5–5,0 besitzt^[227] und somit im unlöslichen pH-Bereich von TatA_d liegt. Andererseits ist auch ein Einsalzeffekt des Proteins durch die salzhaltigen Lösungen zu beobachten, wodurch die Löslichkeit von TatA_d aufgrund der abgeschwächten Protein-Protein-Wechselwirkungen erhöht wird^[228]. Ein außergewöhnlicher Aspekt ist zudem die vollständige Löslichkeit bei pH 8,3. Dieser pH-Wert entspricht dem theoretisch berechneten isoelektrischen Punkt von TatA_d, bei welchem das Protein aufgrund seiner neutralen Nettoladung die geringste Löslichkeit aufweisen sollte. Weitere Experimente mittels isoelektrischer Fokussierung zeigen jedoch auch, dass eine starke Abweichung zwischen dem experimentell bestimmten und dem theoretisch berechneten isoelektrischen Punkt von TatA_d besteht. Um hierüber genauere Aussagen treffen zu können, sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich.

Die SDS-PAGE-Daten führten weiterhin zu dem Ergebnis, dass TatA_d nicht nur in membrangebundener Form, sondern auch in löslicher Form eine intrinsische Tendenz zur Homooligomerisierung besitzt. Ein charakteristisches Bandenmuster im Bereich von 15–50 kDa und 70–200 kDa spricht für die Existenz nieder- und hochmolekularer TatA_d-Oligomere. Diese Größenordnungen entsprechen umgerechnet einer Bildung von

Di- bis Hexameren im niedermolekularen Bereich und einer Homooligomerisierung von 10–20 Protomeren im hochmolekularen Bereich. Hierbei besteht die Möglichkeit, dass es sich bei den hochmolekularen Oligomeren um native Komplexe handelt, wohingegen die niedermolekularen Oligomere wahrscheinlich durch die denaturierenden Bedingungen hervorgerufen wurden. Ein genauer Vergleich der Oligomerbanden deutet auch darauf hin, dass ein saures Milieu die Komplexbildung in höherem Ausmaß fördert als ein basisches Milieu. Die schwache Intensität der Oligomerbanden belegt zudem eine sehr geringe Konzentration der TatA_d-Komplexe, was sich ebenfalls auf die denaturierenden Bedingungen zurückführen lässt. Für die Experimente wurde das ionische Detergens SDS verwendet, welches größtenteils die nichtkovalenten Protein-Protein-Wechselwirkungen zerstört. Die Detektion der Oligomerbanden, trotz überschüssiger Detergenzugabe und Hitzedenaturierung, spricht jedoch für eine hohe Komplexstabilität der Oligomere. Aufgereinigtes TatA_d wurde in einer vorangegangenen Studie auch mit Hilfe der BN-PAGE untersucht, wobei Oligomerbanden im Bereich von 50–170 kDa detektiert wurden^[152]. Bei dieser nativen Studie wurde das milde, nicht-ionische Detergens n-Dodecyl-β-D-maltosid (DDM) verwendet, wodurch die Oligomere nicht zerstört wurden und in hohen Konzentrationen vorlagen. Ein Vergleich mit diesen Daten zeigt eine weitgehende Übereinstimmung der hochmolekularen Oligomere im Größenbereich von ungefähr 70–170 kDa (siehe Abbildung 51). Daraus lässt sich schließen, dass SDS keine vollständig denaturierende Wirkung auf TatA_d besitzt und es in geringen Konzentrationen zu einer vergleichbaren Komplexbildung wie in DDM kommt.

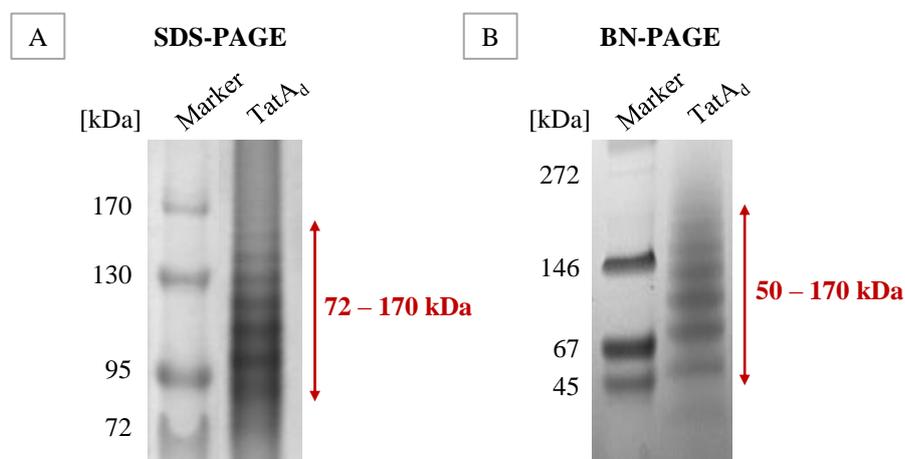


Abbildung 51 Vergleich der SDS- und BN-PAGE-Daten von *B. subtilis* TatA_d

A: SDS-Gel von aufgereinigtem *B. subtilis* TatA_d gelöst in AN/5 mM HCl (1 : 1) und gemischt mit SDS-Ladepuffer (5 % SDS) im Verhältnis 1 : 1. **B:** BN-Gel von aufgereinigtem *B. subtilis* TatA_d solubilisiert in BN-Ladepuffer (1 % DDM)^[152].

Des Weiteren wurde die Größe der löslichen TatA_d-Oligomere mit Hilfe verschiedener biophysikalischer Methoden auch unter nicht-denaturierenden Bedingungen bestimmt. Die Komplexgröße belief sich nach der Größenausschluss-Chromatographie auf etwa 250 kDa, was für eine Homooligomerisierung von ungefähr 35 TatA_d-Protomeren spricht. Größenausschluss-Chromatographiedaten von löslichem His₆-TatA_d belegen hingegen Komplexgrößen von nur 100–150 kDa ^[161]. Dichtegradientenzentrifugationsstudien stehen mit den hier gezeigten Daten jedoch im Einklang. Diese zeigen Komplexgrößen von aufgereinigtem His₆-TatA_d im Größenbereich von 150–250 kDa und führten bei der Untersuchung der zytoplasmatischen TatA_d-Fraktion zu Oligomeren mit einem noch höheren Molekulargewicht ^[161]. Die Daten der analytischen Ultrazentrifugation bekräftigen diese Befunde und belegen die Existenz löslicher TatA_d-Oligomere mit einer Größe von 200 kDa und ungefähr 400 kDa. Mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung konnte zudem ein mittlerer hydrodynamischer Durchmesser der TatA_d-Oligomere von 26,5 nm ermittelt werden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen mittels Negativkontrastierung von löslichen His₆-TatA_d-Komplexen, welche den Beweis runder und länglicher Partikel mit einem Durchmesser von 12 nm und 25 nm erbrachten ^[150]. Insgesamt deuten diese komplementären biophysikalischen Untersuchungen somit darauf hin, dass TatA_d nicht nur in seiner membrangebundenen Form Homooligomere mit variierender Größe bildet ^[153], sondern auch in seiner löslichen Form.

Zusammengefasst erbrachte die Charakterisierung der löslichen Form von TatA_d zum einen den bedeutenden Hinweis, dass das Protein eine auffallend hohe Löslichkeit in salzhaltigen Lösungen besitzt. Hierdurch kann in zukünftigen Studien das Oligomerisierungsverhalten von TatA_d sowie dessen lösliche Struktur beispielsweise mit Hilfe der NMR-Spektroskopie detailliert erforscht werden. Zum anderen belegen die Daten die Existenz großer löslicher TatA_d-Oligomere, welche eine hohe Komplexstabilität aufweisen, und stehen mit bereits postulierten Ansätzen im Einklang ^[156,161,162]. Um jedoch über die lösliche Proteinstruktur sowie die zytoplasmatische Interaktion mit dem Substrat PhoD Aussagen treffen zu können, sind weitere Untersuchungen erforderlich.

4.2 Die membrangebundene Form von *B. subtilis* TatA_d

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag darüber hinaus in einer detaillierten Untersuchung der membrangebundenen Form von TatA_d. Während das Protein zytoplasmatisch an der Substratbindung beteiligt ist, nimmt es hingegen in membrangebundener Form die porenbildende Funktion ein ^[12,85,111]. Die Initiierung des Translokationsprozesses soll durch eine Interaktion mit dem Membranprotein TatC_d erfolgen ^[12,85], dessen Mechanismus jedoch noch weitgehend ungeklärt ist. Zugrunde lag der vorliegenden Studie ein Translokationsmechanismus, welchen wir im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Anne S. Ulrich (KIT) erst kürzlich postulierten. Nach diesem völlig neuartigen Modell wirkt TatC initial als eine PMF-getriebene Proteinflippase auf die kurze TMH von TatA. Hierdurch „flippen“ die membranverankerten TMHs einer oligomeren TatA-Palisade an die zytoplasmatische Membranoberfläche, wodurch die TatA-Protomere in eine intermediäre oberflächengebundene Orientierung übergehen. Um für diesen initialen Schritt der Porenbildung einen ersten Beweis zu erbringen, sollte ein „Herausflippen“ der TMH von TatA mit Hilfe der Festkörper-NMR- und SR-OCD-Spektroskopie experimentell belegt werden. Eine besondere Schwierigkeit stellte hierbei die Tatsache dar, dass bei den durchgeführten Experimenten ein System ohne TatC-Flippase und ohne Protonengradient gewählt wurde. Aus diesem Grund musste durch geeignete Wahl der Systembedingungen oder durch minimale strukturelle Veränderungen des Proteins die intermediäre oberflächengebundene Orientierung der TMH induziert und fixiert werden.

Für diese Untersuchungen wurde der Wildtyp *B. subtilis* TatA_d und verschiedene TatA_d-Mutanten rekombinant uniform ¹⁵N-markiert dargestellt und aufgereinigt. Hierbei konnte durch Testexpressionen experimentell gezeigt werden, dass durch eine Veränderung der TMH-Länge oder durch eine Erhöhung der N-terminalen Ladungsdichte das Expressionsniveau nur leicht beeinflusst wird. Somit konnten die benötigten Proteine in ausreichend hoher Ausbeute und der gewünschten Reinheit gewonnen werden. Des Weiteren führte die Überprüfung verschiedener Rekonstitutionsmethoden letztendlich zu einer erfolgreichen Rekonstitution mit Hilfe des organischen Lösungsmittels HFIP, mit welcher in den meisten Fällen eine definierte Orientierung der Proteine in der Membran erzielt wurde.

Der Wildtyp TatA_d führte bei den darauf folgenden NMR-Experimenten grundsätzlich nur zu Spektren mit einem hohen Pulveranteil, welche keine Informationen über die Orientierung des Proteins lieferten. Dieses Ergebnis lässt sich damit begründen, dass entweder

die orientierten Proteinanteile durch die unstrukturierte C-terminale Region überdeckt werden, oder dass das vorhandene „Charge-Zipper“-Motiv^[184] zu einer Homooligomerisierung führt, was ebenfalls den hohen Pulveranteil der Spektren erklären würde. Aufgrund dieser unzureichenden Interpretierbarkeit der NMR-Daten von TatA_d wurden für die weiteren Untersuchungen verschiedene TatA₂₋₄₅-Mutanten verwendet, welche um die C-terminale Region verkürzt wurden, um eine mögliche Homooligomerisierung zu unterbinden. Mit den NMR- und SR-OCD-Untersuchungen dieser Mutanten konnte belegt werden, dass die Wahl der Systembedingungen sowie die strukturellen Merkmale der Proteine einen entscheidenden Einfluss auf die Orientierung in der Membran besitzen.

Durch eine Veränderung der Lipidkettenlänge konnte gezeigt werden, dass das Fragment TatA₂₋₄₅ in Abhängigkeit der Membrandicke seine Konformation ändert. In unverzweigten Phosphatidylcholinmembranen, deren Dicke ungefähr mit der TMH-Länge von TatA₂₋₄₅ übereinstimmt (Lipide DLPC–DEiPC), besitzt die TMH eine annähernd senkrechte, membrandurchspannende Orientierung und die APH orientiert sich auf der Membranoberfläche liegend. Somit besitzt das Protein in diesen orientierten Lipiddoppelschichten eine vergleichbare Orientierung, wie bereits in planaren Bicellen beobachtet wurde^[127]. In dünnen Membranen liegt die TMH hingegen geneigt vor (Lipid DOcPC und DDPC), was sich durch das hydrophobe Ungleichgewicht zwischen Membrandicke und TMH-Länge erklären lässt. In dicken Membranen tritt eine Proteinaggregation ein, welche sich damit begründen lässt, dass die TMH zu kurz für eine membrandurchspannende Orientierung ist (Lipid DErPC und DNPC). In diesem Fall „flipp“ möglicherweise die TMH an die Membranoberfläche, damit der geladene N-Terminus des Proteins nicht in die hydrophobe Membranumgebung ragt. Zudem belegen die NMR- und SR-OCD-Daten, dass auch die TMH-Länge einen ganz entscheidenden Einfluss auf die Orientierung des Proteins besitzt. Im Vergleich zu TatA₂₋₄₅ nehmen Mutanten mit einer verlängerten TMH in dicken Membranen eine stabile membrandurchspannende Orientierung ein und aggregieren nicht. In dünneren Membranen vergrößert sich der Neigungsgrad der TMH dieser Mutanten ebenfalls in Abhängigkeit der TMH-Länge.

Eine solche Orientierungsänderung von Transmembransegmenten in Abhängigkeit der Membrandicke konnte auch schon bei anderen Membranproteinen festgestellt werden. Ein Beispiel hierfür ist der Tyrosinkinase-Rezeptor PDGFR β (*Platelet-derived growth factor receptor*, PDGFR). Dieser Rezeptor besitzt im Gegensatz zu TatA_d eine sehr lange TMH aus 26 Aminosäuren mit einer entsprechenden Länge von 39 Å. NMR-Daten zeigen, dass sich die TMH dieses Rezeptors in Abhängigkeit der Membrandicke ebenfalls neigt und nur

in dicken Membranen eine stabile membrandurchspannende Orientierung annimmt. In dünnen Membranen aggregiert hingegen das Protein^[229,230].

Des Weiteren führten die *Monte-Carlo*-Simulationen von TatA₁₋₄₅ in impliziten Modellmembranen zu dem Ergebnis, dass der Protonierungsgrad des N-Terminus einen Einfluss auf die Membranorientierung des Proteins besitzen könnte. Diese Simulationen zeigen, dass eine Protonierung des N-Terminus eine „Flip-Reaktion“ der TMH induziert, wenn die Membran zu dick für eine membrandurchspannende Orientierung der TMH ist. Die NMR-Daten bestätigen diesen Einfluss und belegen zudem, dass die TMH von TatA₂₋₄₅ durch eine Deprotonierung des N-Terminus anteilig in dicke Membranen eintauchen kann. Außerdem zeigen die NMR-Spektren der Mutanten mit einer erhöhten N-terminalen Ladungsdichte, dass überschüssige Ladungen schon in dünneren Membranen zu einer Proteinaggregation führen und möglicherweise ein „Herausflippen“ der TMH an die Membranoberfläche begünstigen.

Bisher sind nur sehr wenig Membranproteine bekannt, deren TMHs von einer transmembranen in eine oberflächengebundene Orientierung „flippen“ können. Hierzu zählen Holine, Antiholine und Endolysine aus doppelstrangigen DNA-Phagen^[231] (siehe Abbildung 52). Diese Proteine sind an der Bakterienlyse beteiligt und werden nach dem Befall einer Wirtszelle zytoplasmatisch von den Phagen produziert. Holine sind kleine Membranproteine, die aus zwei oder drei TMHs bestehen und im aktiven Zustand ähnlich dem TatA-Protein homooligomere Poren in der Zytoplasmamembran bilden. Hierdurch ermöglichen sie es den Endolysinen die Membran zu passieren. Endolysine sind Peptidoglykan-Hydrolasen, die die Zellwand der Bakterien zerstören und hierdurch zur Lyse der Wirtszellen führen. Beispielsweise das Pinholin S²¹68 der lambdaoiden Phage 21 besteht im inaktiven Zustand aus zwei TMHs, wobei dessen erste TMH durch eine Aktivierung in den periplasmatischen Raum „flippen“ kann. Die Bezeichnung Pinholin liegt darin begründet, dass dieses Holin nur sehr kleine Ionenporen bildet, während das zugehörige Endolysin R²¹ durch einen Sec-abhängigen Transport über die Zytoplasmamembran exportiert wird. Es wird vermutet, dass das spontane „Herausflippen“ der ersten TMH durch eine Änderung des Membranpotential ausgelöst wird^[232]. Durch eine anschließende periplasmatische Interaktion der „herausgeflippten“ Helices zweier Pinholine soll es zu einer Dimerbildung kommen, wodurch die Homooligomerisierung zu einer Ionenpore initiiert wird. Durch den hierbei entstehenden Ionenfluss wird eine Membrandepolarisation erzeugt, wodurch das inaktive Endolysin R²¹, welches über eine N-terminale transmembrane SAR-Domäne (*signal anchor release*, SAR) in der Membran verankert ist, aktiviert wird^[233]. Bei dieser

Aktivierung „flippt“ die SAR-Domäne aus der Membran, wodurch das aktivierte Enzym ins Periplasma entlassen wird, um die Zellwand anzugreifen. Antiholine besitzen eine inhibitorische Wirkung auf die Holinaktivität und verlangsamen die Zelllyse durch eine inaktive Heterodimerbildung mit den Holinen. Sie besitzen im Gegensatz zu den Holinen eine zusätzliche positive Ladung am N-Terminus, die einen entscheidenden Einfluss auf die Membranorientierung der ersten TMH dieser Proteine besitzt. Durch die positive Ladung wird im Fall des Antiholins S107 der Phage λ die erste TMH an der Membranoberfläche fixiert und kann nicht in die Membran eintauchen. Im Fall des Antiholins S²¹⁷¹ der Phage 21 unterbindet diese positive Ladung hingegen ein „Herausflippen“ der ersten TMH und somit eine Aktivierung des Enzyms.

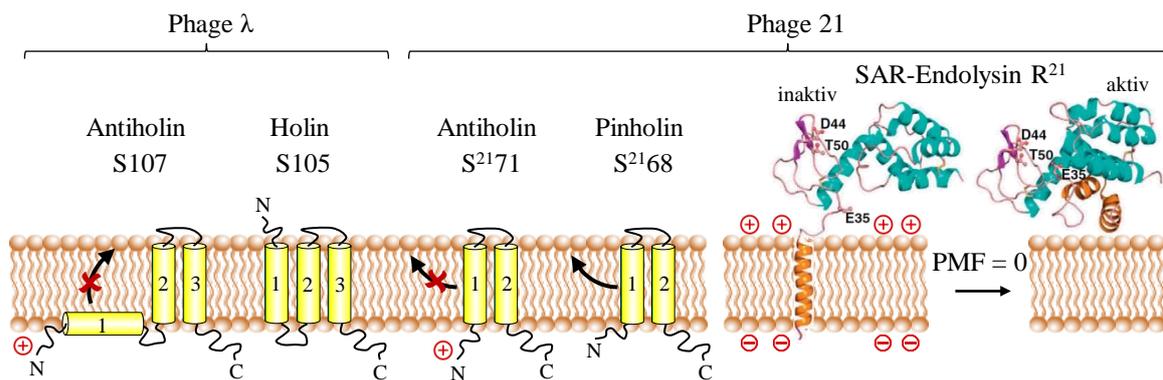


Abbildung 52 An der Bakterienlyse beteiligte Phagen-kodierte Membranproteine

Holine, Pinholine und Antiholine sind Phagen-kodierte, kleine Membranproteine, die an der Bakterienlyse beteiligt sind und aus zwei oder drei TMHs bestehen. Die erste TMH dieser Proteine (mit Ausnahme des Holins S105) kann je nach N-terminaler Ladungsdichte durch eine Konformationsänderung in die Membran insertieren oder aus der Membran „herausflippen“. Das Endolysin R²¹ ist ebenfalls ein Phagen-kodiertes Protein, welches im inaktiven Zustand über seine N-terminale SAR-Domäne in der Membran verankert ist. Durch eine Membrandepolarisation „flippt“ die SAR-Domäne aus der Membran und aktiviert das Enzym. Abbildung verändert übernommen aus ^[231].

Des Weiteren konnte durch die NMR- und SR-OCD-Daten gezeigt werden, dass die Membranbeschaffenheit in Form von verzweigten Phytanoyllipiden einen ganz entscheidenden Einfluss auf die Orientierung von TatA₂₋₄₅ besitzt. In solchen verzweigten Lipiddoppelschichten wird ein anteiliges „Herausflippen“ der TMH induziert, wodurch diese neben einer membrandurchspannenden Orientierung auch zum Teil eine oberflächen-gebundene Orientierung annimmt. Die verzweigten Acylketten erschweren wahrscheinlich der TMH das Eintauchen in die Membran und führen zu einer geringeren Packungsdichte der Lipiddoppelschicht. Hierdurch entsteht zusätzlicher Platz in der Kopfgruppenregion, welcher eine Anlagerung der TMH an der Membranoberfläche begünstigt. Zudem zeigen die Daten, dass in Phytanoylmembranen die Länge der TMH einen weitaus höheren Ein-

fluss auf die Membranorientierung besitzt, als die N-terminale Ladungsdichte. Während Mutanten mit zusätzlichen N-terminalen Ladungen sich in gleicher Weise orientieren wie TatA₂₋₄₅, besitzen Mutanten mit einer verlängerten TMH eine stabile membrandurchspannende Orientierung. Somit wird das „Herausflippen“ der TMH an die Membranoberfläche durch eine Verlängerung der TMH unterbunden. Durch eine Verkürzung der TMH um nur drei hydrophobe Aminosäuren wird hingegen die energetische Barriere einer „Flip-Reaktion“ der TMH vollständig überwunden. Die verkürzte Mutante TatA₂₋₄₅ ΔLIL nimmt größtenteils eine oberflächengebundene Orientierung ein und deren TMH taucht nicht in die Membran ein. Weitere Untersuchungen dieser Mutante führten zu der Erkenntnis, dass auch in dicken unverzweigten Membranen eine solche „Flip-Reaktion“ der TMH initiiert werden kann. Die TMH taucht auch in diese Lipiddoppelschichten nicht ein, sondern das Protein liegt anteilig aggregiert und anteilig in einer oberflächengebundenen Orientierung vor.

Zusammengefasst erbrachte diese NMR- und SR-OCD-Spektroskopiestudie somit, dass Systembedingungen wie die Membrandicke und die Membranbeschaffenheit entscheidende Einflussfaktoren sind, die die Orientierung des um die C-terminale Region verkürzten Fragments TatA₂₋₄₅ in der Membran bestimmen. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Protonierungsgrad des N-Terminus, zusätzliche Ladungen in der N-terminalen Region oder die Länge der TMH ebenfalls Auswirkungen darauf haben, ob die TMH eine stabile membrandurchspannende Orientierung annimmt oder sich an der Membranoberfläche orientiert. Somit konnte experimentell belegt werden, dass ein „Herausflippen“ der TMH von TatA_d durchaus möglich ist.

4.3 Bedeutung der Studie für den neuen Translokationsmechanismus

Nach dem hier erstmals publizierten neuen Translokationsmechanismus wirkt TatC, angetrieben durch den Protonengradienten, als eine Proteinflippase auf TatA. Bei diesem initialen Schlüsselschritt besitzt die ungewöhnlich kurze TMH von TatA eine bedeutende Rolle. Da diese gerade mal eine Länge von maximal 24 Å besitzt, kann sie eine typische Biomembran von 30 Å nur schwer durchspannen und könnte daher eher als ein Membrananker beschrieben werden. Da bekannt ist, dass der Tat-abhängige Transport durch die PMF angetrieben wird^[19,25,165,166], könnte der Translokationsprozess somit durch eine reversibel protonierbare geladene Komponente begleitet sein. Der freie N-Terminus von TatA stellt eine solche Komponente dar und ist vorzugsweise bei physiologischem

pH-Wert protoniert. Er kann jedoch auch ohne weiteres deprotoniert werden und in eine hydrophobe Membranumgebung eintauchen. Die NMR-Daten und *Monte-Carlo*-Simulationen eines um die C-terminale Region verkürzten TatA_d-Fragments erbrachten hierfür erste experimentelle Beweise, dass der Protonierungsgrad des N-Terminus einen ganz entscheidenden Einfluss darauf besitzt, ob die kurze TMH stabil in der Membran verankert ist oder sich aufgrund der energetisch ungünstigen Ladung an der Membranoberfläche befindet. Die Existenz einer löslichen Form von TatA_d bekräftigt ebenfalls die Annahme, dass die ungewöhnlich kurze TMH des Proteins eher einen amphiphilen Charakter besitzt. Des Weiteren deuten auch Aktivitätsstudien an *Providencia stuartii* TatA darauf hin, dass der N-Terminus von TatA eine bedeutende Funktion besitzt^[118,234]. Dieses TatA-Protein besitzt eine N-terminale Verlängerung und wird nur durch Abspaltung dieser Region aktiviert. Kürzlich veröffentlichte Translokationsstudien konnten auch zeigen, dass eine Verlängerung der TMH oder eine Erhöhung der N-terminalen Ladungsdichte von TatA_d zum Erliegen des Tat-abhängigen Transports führt^[152]. Die NMR- und SR-OCD-Daten liefern hierfür eine mögliche Erklärung, da sie zeigen, dass zusätzliche N-terminale Ladungen ein Eintauchen der TMH in die Membran verhindern und eine Verlängerung der TMH zu einer stabilen membrandurchspannenden Orientierung führt. Demzufolge wird durch diese strukturellen Veränderungen eine Insertion des N-Terminus von TatA_d in die Membranumgebung unterbunden. Dies hätte nach dem hier vorgestellten Mechanismus die Folge, dass eine Interaktion von TatA mit TatC nicht mehr möglich wäre und somit der Transport zum Erliegen kommen würde. Die NMR- und SR-OCD-Daten belegen zudem, dass ein anteiliges „Herausflippen“ der TMH durch geeignete Wahl der Systembedingungen induziert werden kann. Somit liefern sie einen ersten Nachweis einer oberflächen- gebundenen TMH von TatA und erbringen einen ersten experimentellen Beweis für unseren neuen Translokationsmechanismus. Da der Translokationsprozess durch die Interaktion von TatA mit TatC initiiert werden soll^[12,85,111,141], wäre es somit durchaus denkbar, dass TatC für diese Konformationsänderung die treibende Komponente ist. Eine solche „Flip-Reaktion“ der TMH von TatA würde auch die widersprüchliche zytoplasmatische Ausrichtung des N-Terminus von TatA erklären^[119] und des Weiteren begründen, weshalb die TMH von TatA gegen Mutationen tolerant ist, während die Gelenkregion eine hohe Empfindlichkeit aufweist^[105,112].

Erst kürzlich wurde von Kumazaki *et al.*^[235] auch ein Mechanismus der Membraninsertion einzelsträngiger Membranproteine durch das Protein YidC vorgeschlagen, der auf einem ähnlichen Prinzip wie der hier vorgestellte Mechanismus der Tat-abhängigen Translokase

beruht. YidC wirkt zum einen als Sec-unabhängige Insertase und ist zum anderen auch beim Sec-abhängigen Transport als Membranchaperon beteiligt ^[236–238]. Die Oberflächenstruktur des Proteins ähnelt stark der von TatC und gleicht ebenfalls einem konkaven „handförmigen“ Hohlraum, welcher eine positiv geladene hydrophile Tasche besitzt. Durch *in vivo*-Vernetzungsstudien konnte gezeigt werden, dass ein konserviertes Arginin in dieser konkaven Tasche eine funktionelle Bedeutung bei der Insertion von Membranproteinen besitzt. Mutationsstudien der negativ geladenen, N-terminalen Ladungen einiger einzelsträngiger Membranproteine führten zudem zu einer verringerten Insertionseffizienz durch YidC. Auf der Grundlage dieser strukturellen und funktionellen Analysen wurde ein Mechanismus vorgeschlagen, bei dem einzelsträngige Membranproteine über ihre negativ geladene, N-terminale Region mit dem konservierten Arginin R₇₂ in der konkaven hydrophilen Tasche von YidC interagieren (siehe Abbildung 53). Anschließend werden sie in die Membrenumgebung freigesetzt und translozieren auf die extrazelluläre Seite der Membran. Es wurde außerdem vorgeschlagen, dass die Substratfreisetzung durch das Membranpotential angetrieben wird, da durch die Insertion der einzelsträngigen Membranproteine die negative Ladung vom intra- zum extrazellulären Raum transportiert wird ^[239,240].

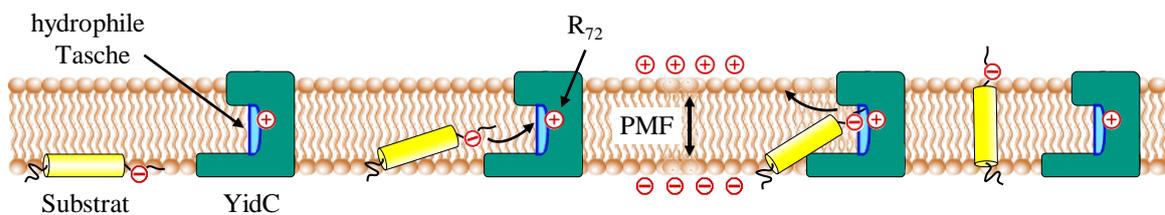


Abbildung 53 Membraninsertion einzelsträngiger Membranproteine durch das YidC-Protein

Einzelsträngige Membranproteine (gelb) binden über ihre negativ geladene, N-terminale Region an das konservierte Arginin R₇₂ in der konkaven hydrophilen Tasche von YidC (grün). Die Substratfreisetzung wird durch das Membranpotential angetrieben, wobei die N-terminale Ladung in Richtung der extrazellulären Seite gezogen wird. Abbildung verändert übernommen aus ^[235].

Der hier vorgestellte Mechanismus steht mit diesem Modell somit in vollem Einklang, beschreibt jedoch im Unterschied keine Membraninsertion, sondern eine inverse „Flip-Reaktion“ mehrerer TMHs einer oligomeren TatA-Palisade durch TatC. Hierbei werden für die Interaktion der TMHs mehrere Bindungsstellen an TatC vorgeschlagen, wodurch sich auch begründen lässt, weshalb Mutationen einiger postulierter, funktionell relevanter Aminosäuren von TatC geringe und teilweise ambivalente Auswirkungen auf die Proteinaktivität besitzen ^[132,134,140]. Um die räumliche Beziehung von TatC mit einer solchen TatA-Palisade zu veranschaulichen, wurde in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Wolfgang Wenzel (KIT) auch eine Molekulardynamik-Simulation mit zwölf TatA_d-Molekülen und

TatC_d durchgeführt. Der resultierende TatC_d/ [TatA_d]₁₂-Komplex veranschaulicht, dass die molekulare Dimension einer TatA-Palisade mit TatC perfekt zusammen passt (siehe Abbildung 54).

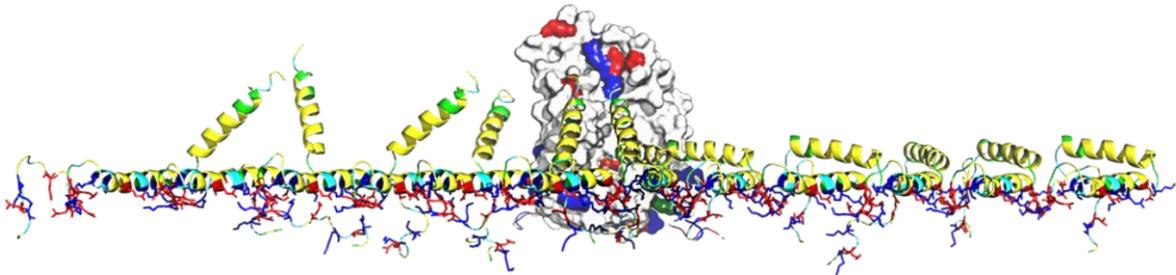


Abbildung 54 Molekulardynamik-Simulation eines TatC_d/ [TatA_d]₁₂-Komplexes

Molekulardynamik-Simulation von zwölf TatA_d-Molekülen mit TatC_d in einer impliziten Membran. Die TMHs der TatA_d-Moleküle flippen durch TatC_d an die Membranoberfläche (von links nach rechts). Bei der Simulation wurden die TatA_d-Moleküle durch zahlreiche Salzbrücken zusammengehalten^[184] und die paarweisen Wechselwirkungen zwischen den TatA_d-Molekülen und den funktionell relevanten Aminosäuren von TatC_d festgelegt. Molekulardynamik-Simulation wurde von Frau Dr. Julia Setzler (KIT) und Herrn Dr. Moritz Wolf (KIT) durchgeführt.

Dieser neue „TatC-Flippase“-Mechanismus steht auch mit einem weiteren Interaktionsmodell der Tat-Komponenten im Einklang, welches erst kürzlich von Rollauer *et al.* postuliert wurde^[129] (siehe Abbildung 55 A). Dieses beschreibt eine Interaktion der TMH von TatA im Zentrum der konkaven Tasche von TatC, während das Signalpeptid an der N-terminalen Region von TatC bindet und die TMH von TatB an die kurze fünfte TMH von TatC andockt. Um ebenfalls mit dem Signalpeptid interagieren zu können, orientiert sich die APH von TatB zytoplasmatisch entlang der Membranoberfläche. Ein weiteres Interaktionsmodell, welches von Ramasamy *et al.*^[130] postuliert wurde, beschreibt hingegen eine Insertion des Signalpeptids in die konkave Tasche von TatC (siehe Abbildung 55 B). Diese Insertion soll zu einer Neigung der beiden letzten N-terminalen TMHs von TatC führen, wodurch sich dessen große konkave Tasche an das kleine Signalpeptid angepasst. Durch diese Konformationsänderung von TatC sollen die Wechselwirkungen mit TatA und TatB beeinflusst werden, welche über ihre TMHs an die kurze fünfte TMH von TatC binden. Zudem wird vorgeschlagen, dass die Gelenkregion zwischen dem Signalpeptid und dem Substrat schleifenartig in Richtung Zytoplasma rückwandert, um mit TatB zu interagieren^[130]. Dieses Modell wurde auch kürzlich von Fröbel *et al.*^[241] experimentell bekräftigt, wobei belegt wurde, dass die Signalpeptidase-Erkennungssequenz des Signalpeptids durch TatC in Abwesenheit von TatB über die Membran transloziert werden kann und abgespalten wird. Basierend auf diesen Studien wurde vorgeschlagen, dass TatC das Signalpeptid in die Membranumgebung inseriert und TatB für die richtige Positio-

nierung des Signalpeptids verantwortlich ist. Der hier vorgestellte Mechanismus lässt sich mit diesem Modell nur so vereinen, dass möglicherweise die Signalpeptidinsertion durch TatC vor der Interaktion mit der TatA-Palisade erfolgt. Um jedoch genaue Aussagen darüber treffen zu können, ob nun TatA oder das Signalpeptid in die konkave Tasche von TatC bindet, sind noch weitere Untersuchungen erforderlich.

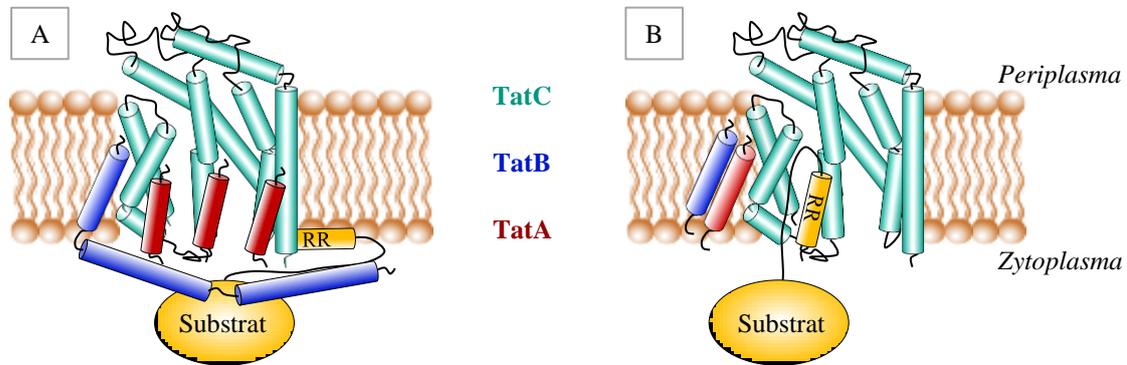


Abbildung 55 Interaktionsmodelle der Tat-Komponenten

A: Interaktionsmodell der Tat-Komponenten nach Rodriguez *et al.* ^[129]. Die TMHs von TatA (rot) binden im Zentrum der konkaven Tasche von TatC (grün), während sich das Signalpeptid des Substrates (gelb) an der N-terminalen Region von TatC orientiert und die TMH von TatB (blau) an die kurze fünfte TMH von TatC andockt. **B:** Interaktionsmodell der Tat-Komponenten nach Ramasamy *et al.* ^[130]. Das Signalpeptid inseriert in die konkave Tasche von TatC und die Gelenkregion des Substrates wandert schleifenartig in Richtung Zytoplasma zurück, um mit TatB zu interagieren. Die TMHs von TatA und TatB binden an die kurze fünfte TMH von TatC. Abbildungen verändert übernommen aus ^[129,130].

Nach der PMF-getriebenen „Flip-Reaktion“ der TatA-Protomere durch TatC wird nach unserem Modell die folgende Bildung des Translokationskanals durch eine kooperative „Flop-Reaktion“ der APH-DCR-Haarnadelschleifen ermöglicht, wobei diese in die Membran einklappen können. Eine Membraninsertion der APHs von TatA wurde schon mehrfach postuliert und würde auch die duale Topologie der APH von TatA erklären ^[119,120]. Hierdurch würde ein Translokationskanal mit hydrophiler Auskleidung entstehen, der sich dem Substratdurchmesser anpassen kann ^[120,167,184]. Unser postulierter Mechanismus lässt hierbei jedoch die Frage offen, welche Form der Translokationskanal besitzt. Die intermediären oberflächengebundenen TatA-Protomere könnten sich entweder spiralförmig um das Substrat anordnen (siehe Abbildung 56 A) oder es könnte eine zweite TatA-Palisade beteiligt sein. Diese zweite TatA-Palisade könnte mit einem weiteren TatC-Protein interagieren, was auch eine mögliche Dimerbildung von TatC erklären würde ^[122,242]. Durch eine „front-to-front“-Orientierung der beiden TatC/[TatA]_n-Komplexe könnte ein Translokationsspalt in der Membran entstehen (siehe Abbildung 56 B). In beiden Fällen könnte zudem die nicht abgesättigte erste APH-DCR-Haarnadelschleife des führenden TatA-Protomers mit dem Signalpeptid interagieren, welches am N-Terminus von TatC

gebunden ist ^[78]. Hierdurch würden die noch ungepaarten Ladungen absättigt werden, wodurch das Eintauchen der APH-DCR-Haarnadelschleife ermöglicht wird. Eine solche Interaktion würde sich auch damit vereinigen lassen, dass das Signalpeptid nur in Gegenwart der PMF mit TatA interagiert ^[243].

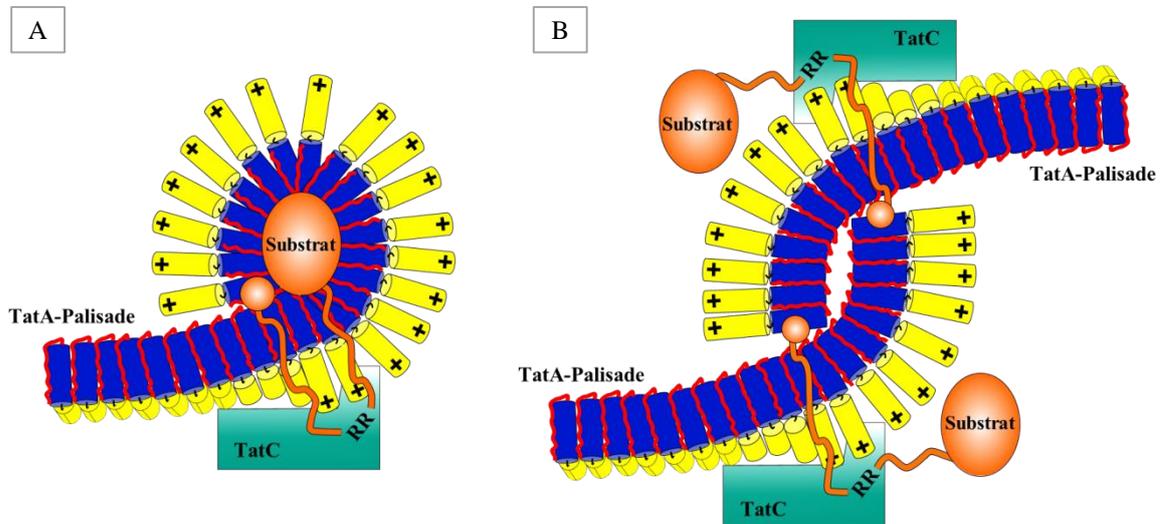


Abbildung 56 Bildung eines poren- oder spaltförmigen Translokationskanals

A: Nach der PMF-getriebenen „Flip-Reaktion“ der TatA-Palisade durch TatC (grün) könnten sich die oberflächengebundenen TatA-Protomere spiralförmig um das Substrat (orange) anordnen. **B:** Alternativ könnten auch zwei TatA-Palisaden mit zwei TatC-Proteinen interagieren und einen Translokationsspalt erzeugen. In beiden Fällen könnte die APH-DCR-Haarnadelschleife des führenden TatA-Protomers mit dem Signalpeptid des Substrates interagieren.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten neue Erkenntnisse über die lösliche und membran-gebundene Form des Proteins TatA_d erlangt werden, welches eine Komponente der TatA_d/TatC_d-Proteintranslokase im Gram-positiven Bakterium *B. subtilis* ist ^[156].

In ersten Löslichkeitsexperimenten konnte hierbei gezeigt werden, dass TatA_d für ein Membranprotein eine auffallend hohe Löslichkeit in salzhaltigen Lösungen besitzt und nur im pH-Bereich von 3,5 – 5,5 unlöslich ist. Des Weiteren konnte durch SDS-PAGE Studien belegt werden, dass TatA_d in seiner löslichen Form sehr stabile Oligomere bildet, die selbst unter denaturierenden Bedingungen in geringen Konzentrationen nachweisbar sind. Unter nicht-denaturierenden Bedingungen führte die Charakterisierung der löslichen Oligomere zu einem mittleren hydrodynamischen Durchmesser von 26,5 nm und zu Komplexgrößen von ungefähr 200 – 250 kDa.

Durch die Untersuchung der membrangebundenen Form von TatA_d sollte darüber hinaus ein erster Beweis für einen neuen Translokationsmechanismus erbracht werden, welchen wir im Arbeitskreis von Prof. Dr. Anne S. Ulrich (KIT) erst kürzlich postulierten. Nach diesem völlig neuartigen Modell wirkt das Membranprotein TatC, angetrieben durch den Protonengradienten, als eine Proteinflippase auf die kurze TMH von TatA, wodurch diese an die Membranoberfläche „flippt“. Hierdurch nimmt TatA eine flach gestreckte, oberflächengebundene Orientierung ein, bevor es die Translokationspore bildet. Um dieses Modell experimentell zu unterlegen, wurde durch geeignete Wahl der Systembedingungen und strukturelle Veränderungen der Proteinstruktur versucht, eine solche „Flip-Reaktion“ der TMH von TatA auch in Abwesenheit von TatC und ohne einen Protonengradienten zu induzieren. Die Orientierung des Proteins wurde hierbei mit Hilfe der Festkörper-NMR- und der SR-OCD-Spektroskopie in Membran-imitierenden Modellsystemen bestimmt. Mit dieser Studie konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass sich TatA_d in Phytanoylmembranen anteilig an der Membranoberfläche orientiert und somit eine „Flip-Reaktion“ der TMH induziert werden kann. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass strukturelle Veränderungen wie der Protonierungsgrad des N-Terminus, zusätzliche Ladungen in der N-terminalen Region oder die Länge der TMH ebenfalls Auswirkungen darauf haben, ob sich die TMH von TatA_d in der Membran verankert oder sich auf der Membranoberfläche orientiert. Somit konnte ein erster experimenteller Beweis für den hier vorgestellten neuen Translokationsmechanismus des Tat-abhängigen Transports erbracht werden.

6. Methoden

6.1 Mikrobiologische und proteinbiochemische Methoden

6.1.1 Steriltechnik

Alle Arbeiten, die sterile Bedingungen erfordern, werden unter einer Reinraumbank durchgeführt. Für die Herstellung der Medien, Puffer und Stammlösungen wird Milli-Q Wasser (Milli-Q H₂O) verwendet. Die Sterilisation der Medien erfolgt in einem Dampfdruckautoklaven für 20 min bei 120 °C und 1 bar. Liegen hitzeempfindliche Medien vor, werden Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm eingesetzt. Die Hitzesterilisation der Glasgeräte erfolgt in einem Trockenschrank für mindestens 2 h bei 180 °C. Zudem werden sterile Einwegmaterialien wie beispielsweise Petrischalen, Zentrifugenröhrchen oder Reaktionsgefäße verwendet.

6.1.2 Herstellung der Agarplatten

Für die Herstellung der Agarplatten werden 500 ml Vollmedium (0,5 % Hefeextrakt, 1 % Trypton, 1 % NaCl; pH 7,4) mit 8 g Agar versetzt und autoklaviert. Das Agar-Medium wird in einem Wasserbad auf 60 °C temperiert und anschließend mit 500 µl Kanamycin-Lösung (5 %) versetzt und durchmischt. Es werden jeweils 25 ml Agar-Medium in eine sterile Petrischale verteilt. Diese wird nach dem Aushärtungsprozess bis zur Verwendung bei -4 °C gelagert.

6.1.3 Hitzetransformation

Für die Proteinexpression wird der Vektor pET-28a(+) verwendet, in welchen im Vorfeld die DNA-Sequenz des Proteins inkloniert wird. Der mutierte Vektor wird mit Hilfe einer Hitzetransformation in hitzekompetente *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen transformiert. Hierbei werden 1 µl Plasmid-Lösung und 50 µl Zellen in ein vorgekühltes 15 ml-Zentrifugenröhrchen pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitze-Kälteschock erfolgt für 10 s bei 42 °C im Wärmebad und für 5 min auf Eis. Anschließend wird der Transformationsansatz mit 950 µl SOC-Medium (Zusammensetzung siehe Anhang) versetzt und zur Ausbildung der Kanamycinresistenz 1 h bei 37 °C und 220 rpm im Inkubationsschüttler inkubiert. Es werden 50–100 µl des Ansatzes auf einer kanamycinhaltigen Agarplatte ausplattiert und diese für 24 h bei 37 °C im Trockenschrank inkubiert.

6.1.4 Herstellung der Vor- und Glycerolkultur

Für die Herstellung einer Vorkultur werden 25 ml Vollmedium mit 25 µl Kanamycin-Lösung (5 %) in einem 100 ml-Erlenmeyerkolben gemischt und mit einer Bakterienkolonie beimpft. Anschließend wird die Vorkultur 24 h bei 37 °C und 220 rpm im Inkubationsschüttler inkubiert. Zur Herstellung der Glycerolkultur werden 500 µl Zellkultur mit 500 µl vorgekühlter Glycerol-Lösung (50 %) in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß vermischt und bei -80 °C gelagert. Um die Zellvitalität vor jeder Proteinexpression zu erneuern, wird eine Pipettenspitze Glycerolkultur auf einer kanamycinhaltigen Agarplatte (siehe Kapitel 6.1.2) ausgestrichen und diese 24 h bei 37 °C im Trockenschrank inkubiert. Mit den hierbei wachsenden Bakterienkolonien wird eine weitere Vorkultur analoger Zusammensetzung angesetzt, welche für die Proteinexpression verwendet wird.

6.1.5 Testexpression

Vor der Proteinexpression im großen Maßstab wird eine Testexpression durchgeführt, für welche M9-Minimalmedium (Zusammensetzung siehe Anhang) mit unmarkiertem anstatt ¹⁵N-markiertem Ammoniumchlorid (NH₄Cl; 1 mg/ml) verwendet wird. Es werden 30 ml M9-Minimalmedium mit 420 µl Vorkultur (siehe Kapitel 6.1.4) in einem 100 ml-Erlenmeyerkolben angeimpft und die Zellkultur bei 37 °C und 220 rpm im Schüttler inkubiert. Zur Erstellung einer Wachstumskurve werden stündlich 1 ml Proben entnommen und die OD₆₀₀ mit Hilfe eines UV/VIS-Spektrophotometers gemessen. Die Proteinexpression wird bei einer OD₆₀₀ von 0,6–0,8 a. u. mit 15 µl IPTG-Lösung (1 M) induziert. Ab diesem Zeitpunkt werden stündlich 100 µl Proben entnommen und diese aufgrund der zeitlich ansteigenden Zelldichte im Verhältnis 1:10 mit M9-Minimalmedium verdünnt, um einen Sättigungseffekt bei den Absorptionsmessungen zu vermeiden. Die Proben werden 5 min bei 20 °C und 13000 rpm zentrifugiert und die Zellpellets anschließend mit Hilfe einer SDS-PAGE analysiert (siehe Kapitel 6.2.1).

6.1.6 Proteinexpression und Zellernte

Für die Proteinexpression im großen Maßstab werden 500 ml Nährmedium mit 7 ml einer Vorkultur (siehe Kapitel 6.1.4) in einem 2 l-Erlenmeyerkolben angeimpft. Je nachdem ob es sich um eine Proteinexpression von unmarkiertem oder uniform ¹⁵N-markiertem Probenmaterial handelt, wird Voll- oder M9-Minimalmedium verwendet. Da das Vollmedium im Gegensatz zum M9-Minimalmedium keine Glucose oder Antibiotika enthält, wird es mit 2,5 ml Glucose-Lösung (40 %) und 500 µl Kanamycin-Lösung (5 %) versetzt.

Die Zellkultur wird bei 37 °C und 220 rpm im Inkubationsschüttler inkubiert und die Proteinexpression bei einer OD₆₀₀ von 0,6–0,8 a. u. mit 250 µl IPTG-Lösung (1 M) induziert. Die Expressionsdauer beträgt 20–24 h. Vor der Induktion wird eine 1 ml Probe und nach der Expression eine 100 µl Probe entnommen und deren OD₆₀₀ gemessen. Die 100 µl Probe wird hierfür im Verhältnis 1:10 mit dem jeweiligen Nährmedium verdünnt, um einen Sättigungseffekt bei der Absorptionmessung zu vermeiden. Die Proben werden 5 min bei 20 °C und 13000 rpm zentrifugiert und die Zellpellets anschließend mit Hilfe einer SDS-PAGE analysiert (siehe Kapitel 6.2.1). Bei der folgenden Zellernte wird die Zellkultur 15 min bei 4 °C und 6000 rpm pelletiert und das überstehende Lysat verworfen.

6.1.7 Zellaufschluss

Der Zellaufschluss erfolgt durch eine Ultraschallbehandlung. Hierfür wird das Zellpellet in 10–30 ml imidazolhaltigen *Binding*-Puffer (50 mM Imidazol, 20 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl; pH 7,4) resuspendiert und 2 µl Benzonase sowie eine Spatelspitze Lysozym unter Kühlung zugegeben. Pro 10 ml Aufschlussvolumen werden zusätzlich jeweils 100 µl der Proteaseinhibitoren Pefablock (20 mM), Benzamidin (478,8 mM) und Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF; 100 mM) zupipettiert. Das gekühlte Zelllysate wird in 3 min-Intervallen bei einer Leistung von 67 % unter intensiver Eiskühlung sonifiziert. Zur Abtrennung der Zelltrümmerfraktion wird der Rohaufschluß anschließend 20 min bei 4 °C und 6000 rpm zentrifugiert. Die Trennung der Membran- und Zellplasmafraktion erfolgt durch Zentrifugation des überstehenden Lysats für 1 h bei 4 °C und 40000 rpm. Für die anschließende Proteinaufreinigung werden die Zellpellets der Membran- und Zelltrümmerfraktion in 30 ml imidazolhaltigen *Binding*-Puffer, welcher mit 2 % NLS versetzt wird, durch mehrere Ultraschallzyklen bei einer Leistung von 95 % solubilisiert. Die Zellplasmafraktion wird ebenfalls mit 2 % NLS versetzt und resuspendiert. Um unlösliche Zellrückstände abzutrennen, werden die Fraktionen für 10 min bei 4 °C und 9000 rpm zentrifugiert.

6.1.8 Nickelchelate-Affinitätschromatographie

Aufgrund des verwendeten Expressionsvektors pET-28a(+) werden die Proteine mit einem N-terminal fusionierten His₆-Tag exprimiert und können über eine Nickelchelate-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Durch die selektive Anbindung der Histidine an das Säulenmaterial Nickel-Nitriloessigsäure erfolgt eine Abtrennung der Zellbestandteile und der unspezifischen Proteine. Die Aufreinigung wird mit einer FPLC-Anlage (*fast protein liquid chromatography*) durchgeführt. Es wird bei einer konstanten Flussrate von 5 ml/min, bei einem maximalen Druck von 5 bar und einer Temperatur von 20 °C gear-

beitet. Der Chromatographieverlauf wird als Funktion des Retentionsvolumens durch UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm detektiert. Als Puffersystem wird ein imidazolhaltiger *Binding*-Puffer (50 mM Imidazol, 20 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl; pH 7,4) und ein Elutionspuffer (500 mM Imidazol, 20 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl; pH 7,4) mit einer erhöhten Imidazolkonzentration eingesetzt. Diese Puffer werden vor der Verwendung filtriert, entgast und mit 0,1 % NLS versetzt, um eine Proteinpräzipitation auf der Säule zu verhindern.

Es werden HisTrap HP-Chromatographiesäulen mit einem Säulenvolumen von 5 ml verwendet. Diese Säulen werden vor jeder Aufreinigung neu beladen und gereinigt. Hierzu werden sie mit 10 Säulenvolumen *Stripping*-Puffer (50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 20 mM NaH₂PO₄; pH 7,4) gespült, um die Nickelionen zu komplexieren und von der Säule zu spülen. Die Reinigung erfolgt mit 600 ml NaOH-Lösung (1 M) und die Equilibrierung mit 10 Säulenvolumen imidazolhaltigen *Binding*-Puffer sowie 10 Säulenvolumen Milli-Q H₂O. Um die Säulen neu zu beladen, wird mit Nickelsulfat-Lösung (NiSO₄; 0,1 M) bei einer verminderten Flussrate von 0,5 ml/min gespült. Anschließend erfolgt eine weitere Equilibrierung mit 5 Säulenvolumen Milli-Q H₂O und 10 Säulenvolumen imidazolhaltigen *Binding*-Puffer.

Nach dem Zellaufschluss werden die solubilisierten Fraktionen über eine Probenschleife auf die Chromatographiesäulen (pro 2 l-Expressionsansatz eine Säule) aufgetragen. Während der Aufreinigung binden die His₆-Tag-Proteine an das Säulenmaterial, wohingegen unspezifische Proteine und andere Zellbestandteile im Durchfluss eluieren. Nach einer Waschphase werden die His₆-Tag-Proteine durch den Elutionspuffer aufgrund der erhöhten Imidazolkonzentration vom Säulenmaterial verdrängt und gesammelt. Die Proteinlösung wird anschließend gegen Milli-Q H₂O dialysiert (siehe Kapitel 6.1.9).

Der His₆-Tag der Proteine wird durch eine BrCN-Spaltung entfernt (siehe Kapitel 6.1.8) und anschließend durch eine subtraktive Nickelchelate-Affinitätschromatographie abgetrennt. Hierbei wird statt eines imidazolhaltigen *Binding*-Puffers ein imidazolfreier *Binding*-Puffer (500 mM NaCl, 20 mM NaH₂PO₄; pH 7,4) verwendet. Während dieser Aufreinigung binden His₆-Tag-Fraktionen an das Säulenmaterial, wohingegen gespaltenes Protein im Durchfluss eluiert. Die Proteinlösung wird anschließend nochmals gegen Milli-Q H₂O dialysiert (siehe Kapitel 6.1.9).

6.1.9 Dialyse

Nach den Proteinaufreinigungsschritten über eine Nickelchelate-Affinitätschromatographie werden die gesammelten Proteinfractionen gegen 4 l Milli-Q H₂O bei 4 °C dialysiert. Hierfür werden Dialyseschläuche mit einer Ausschlussgröße von 2,0 kDa verwendet. Bei diesem Vorgang werden Detergens-, Imidazol- und Salzkomponenten entfernt, wodurch das Protein nach 2–4 Wochen präzipitiert. Anschließend wird der Dialyseansatz 10 min bei 4 °C und 10000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Je nach weiterem Verfahrensschritt wird das Proteinpellet entweder bei der folgenden BrCN-Spaltung weiterverarbeitet (His₆-Tag-Protein) oder lyophilisiert und bei -20 °C gelagert (vollständig aufgereinigtes Protein).

6.1.10 Bromcyan-Spaltung

Der N-terminal fusionierte His₆-Tag der Proteine wird durch eine BrCN-Spaltung entfernt. Diese Spaltung führt zu einem Verlust des Startmethionins, da C-terminal vor Methionin gespalten wird^[187]. Für die Spaltung wird das Proteinpellet nach der Dialyse in 5 ml Tri-fluoressigsäure (50 %) gelöst. Anschließend wird die Proteinlösung mit 5–6 Spatelspitzen BrCN versetzt und 20 h im verdunkelten Abzug gerührt. Nach erfolgter Reaktion wird die Proteinlösung mit Milli-Q H₂O auf ein Volumen von 30 ml verdünnt und lyophilisiert. Um den abgespaltenen His₆-Tag vom Protein zu trennen, folgt ein Aufreinigungsschritt über eine subtraktive Nickelchelate-Affinitätschromatographie (siehe Kapitel 6.1.8). Hierfür wird das Proteinpulver in 30 ml *Binding*-Puffer (500 mM NaCl, 20 mM NaH₂PO₄; pH 7,4), welcher mit 2 % NLS versetzt wird, durch mehrere Ultraschallzyklen bei einer Leistung von 95 % solubilisiert. Um unlösliche Rückstände abzutrennen, wird die Lösung für 10 min bei 4 °C und 9000 rpm zentrifugiert.

6.2 Analytische Methoden

6.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE wird zur Bestimmung des Proteingehalts und zur Überprüfung der Proteinreinheit verwendet. Für diese elektrophoretischen Auftrennungen werden die Proteine in dem denaturierenden Detergens SDS solubilisiert, wobei die Eigenladung der Proteine durch die Anlagerung der anionischen Detergensmoleküle überdeckt wird. Aus diesem Grund werden die Proteine durch den Molekularsiebeffekt des Polyacrylamidgels entsprechend ihres Molekulargewicht aufgetrennt^[191].

Für die SDS-PAGE werden 16 %ige Tris-Tricin-Gele hergestellt, welche aus einem Sammel- und Trenngel unterschiedlicher Porengröße bestehen. Für die Herstellung der Gele werden die Komponenten des Trenn- und Sammelgels (siehe Tabelle 6) in zwei 50 ml-Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Nach Zugabe der beiden Komponenten Ammoniumperoxodisulfat (APS) und N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) startet die Polymerisation, weswegen die Lösung zügig durchmischt wird. Anschließend werden 3,5 ml der Trenngellösung in eine Gelkammer pipettiert und mit 1,5 ml Milli-Q H₂O überschichtet. Das Trenngel polymerisiert 20–25 min aus, bevor es mit 1,5 ml Sammelgellösung überschichtet wird. Zur Ausbildung der Probenaschen wird ein 15er-Gelkamm in die Gelkammern gesteckt, bevor das Sammelgel 30–45 min auspolymerisiert.

Sammelgel (2 Gele)		Trenngel (2 Gele)	
Milli-Q H ₂ O	3,20 ml	Milli-Q H ₂ O	600 µl
4x Tris-HCl-Puffer	1,29 ml	Tris-Cl-Puffer	3,30 ml
Acrylamid/ Bisacrylamid (37,5 : 1; 30 %)	670 µl	Acrylamid/ Bisacrylamid (37,5 : 1; 30 %)	5,20 ml
APS (20 %)	25 µl	Glycerol	1,50 ml
TEMED	2,5 µl	APS (20 %)	35 µl
		TEMED	3,5 µl

Tabelle 6 Zusammensetzung der 16 %igen Tris-Tricin-Polyacrylamidgele
Zusammensetzung der jeweiligen Puffer siehe Anhang

Die Proteinmenge der Expressionen wird mit Hilfe der SDS-PAGE analysiert (siehe Kapitel 6.1.5 und 6.1.6). Hierzu werden die Zellpelletproben mit einer definierten Menge SDS-Ladepuffer (Zusammensetzung siehe Anhang) versetzt, welche sich anhand der OD₆₀₀ nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{OD_{600}}{0,2} \cdot 30 = x [\mu\text{l}] \text{ SDS-Ladepuffer} \quad (6.1)$$

Lyophilisiertes Probenmaterial, welches auf Reinheit überprüft werden soll, wird in einer Konzentration von 2,5 mg/ml SDS-Ladepuffer angesetzt. Bereits gelöstes Probenmaterial, dessen Proteingehalt bestimmt werden soll, wird im Verhältnis 1 : 1 mit SDS-Ladepuffer gemischt.

Unabhängig vom jeweiligen Ansatz werden die zu analysierenden Proben nach Zugabe des SDS-Ladepuffers 5 min bei 95 °C im Wasserbad hitzedenaturiert und 5 min bei 20 °C und 13000 rpm zentrifugiert.

Die Gelelektrophoreseapparatur wird mit Anodenpuffer (200 mM Tris; pH 8,9) und Kathodenpuffer (200 mM Tris, 100 mM Tricin; 10 % SDS) bis zur Markierung befüllt und die Geltaschen mit 5–7 µl Probenmaterial beladen. Hierbei wird grundsätzlich in eine Tasche 5 µl eines Referenzmarkers (siehe Anhang) pipettiert, welcher bei der späteren Auswertung zur Molekulargewichtsbestimmung dient. Die Elektrophorese wird für 30 min bei einer konstanten Stromstärke von 15 mA pro Gel gestartet und anschließend die Stromstärke auf 30 mA pro Gel erhöht. Nachdem die Lauffront des blauen Coomassie-Farbstoffs die Unterkante des Gels erreicht hat, wird die Elektrophorese beendet. Das Gel wird mit Fixierlösung (50 % EtOH, 10 % Essigsäure) überschichtet und 20 min auf dem Schüttler inkubiert.

6.2.2 Coomassie- und Silberfärbung

Die Detektion der Proteinbanden erfolgt durch eine Coomassie-Färbung des SDS-Gels, welche eine Nachweisgrenze von 50–100 ng Protein pro mm² Bandenfläche besitzt ^[191]. Nach der Fixierung wird das Gel mit Färbelösung (0,1 % Coomassie Brilliant Blue G 250, 45 % EtOH, 10 % Essigsäure) überschichtet und für mindestens 2 h auf dem Schüttler inkubiert. Zur Entfärbung des Hintergrunds wird das Gel mit Entfärberlösung (5 % Essigsäure, 25 % EtOH) gewaschen und anschließend dokumentiert.

Zur Intensitätssteigerung der Proteinbanden wird im Anschluss eine Silberfärbung durchgeführt, welche eine höhere Nachweisgrenze von 0,1–1 ng Protein pro mm² Bandenfläche besitzt ^[191]. Vor dieser Färbung wird das Gel 10 min mit Milli-Q H₂O und ½ h mit EtOH (50 %) gewaschen, um den Essigsäuregehalt zu entfernen. Anschließend wird das Gel mit einem Gemisch aus 17,5 ml Färbelösung A (500 mM Na₂CO₃) und 33 ml Färbelösung B (0,2 % NH₄NO₃, 0,2 % AgNO₃, 1 % H₄[Si(W₃O₁₀)₄] · x H₂O, 1,4 % Formaldehyd) überschichtet und bis zur gewünschten Bandenintensität auf dem Schüttler inkubiert. Die Reaktion wird durch einen Waschvorgang mit Essigsäure (1 %) gestoppt und anschließend das Gel dokumentiert.

6.2.3 Western Blot-Verfahren und Immunodetektion

Das Western Blot-Verfahren mit anschließender Immunodetektion wird zum qualitativen Nachweis der Proteine verwendet. Bei dieser Methode werden die Proteine nach beendeter SDS-PAGE von einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch auf eine Trägermembran transferiert und durch geeignete Antikörper immunologisch detektiert. Als Trägermembran wird eine Nitrocellulosemembran mit einer Porengröße von 0,2 µm verwendet, an der sich die Proteine über hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen veran-

kern. Es wird ein Stapel aus puffergetränkten Filterpapieren (Größe: 7 cm · 9 cm), Nitrocellulosemembran (Größe: 6 cm · 9 cm) und Polyacrylamidgel in der Mitte einer Western Blot-Apparatur plaziert. Die verwendeten Puffer und die Anzahl der Filterpapiere sind in Tabelle 7 in der Reihenfolge von der Anode zur Kathode aufgelistet.

Western Blot	Puffer	Zusammensetzung
6 Lagen Filterpapier	Anodenpuffer I	300 mM Tris, 20 % MeOH; pH 10,4
3 Lagen Filterpapier	Anodenpuffer II	25 mM Tris, 20 % MeOH; pH 10,4
Nitrocellulosemembran	Anodenpuffer II	
Polyacrylamidgel	-	
9 Lagen Filterpapier	Kathodenpuffer	40 mM Aminocaprinsäure, 0,01 % SDS, 20 % MeOH; pH 7,6

Tabelle 7 Aufbau eines Western Blot-Experiments

Das elektrophoretische Blot-Verfahren erfolgt für 45 min bei einer konstanten Stromstärke von 150 mA. Anschließend wird das Polyacrylamidgel sowie die Filterpapiere entfernt und die Membran an der Luft getrocknet. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wird die Membran für 24 h bei 4 °C in Milchpulverlösung (5 % Milchpulver in Tween 20-haltigen PBS-Puffer) auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wird die Membran dreimal 5 min mit Tween 20-haltigen PBS-Puffer (77 mM Na₂HPO₄, 23 mM NaH₂PO₄, 160 mM NaCl, 0,05 % Tween 20; pH 7,2) gewaschen.

Für die Immunodetektion stehen zwei Primärantikörper zur Verfügung. Ein monoklonaler His₆-Tag-Antikörper und ein polyklonaler TatA_d-Antikörper. Die Membran wird mit dem jeweiligen Primärantikörper überschichtet und 1 h bei 20 °C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wird sie dreimal 5 min mit Tween 20-haltigen PBS-Puffer gewaschen, bevor die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 45 min bei 20 °C auf dem Schüttler erfolgt. Es wird ein Sekundärantikörper verwendet, der eine alkalische Phosphatase gebunden hat. Dieses Enzym setzt das Substratsystem Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)/5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat (BCIP) zu einem blauen unlöslichen NBT-Diformazan Endprodukt um, wodurch die Proteinbanden detektiert werden ^[244]. Vor der Detektion wird die Membran dreimal 5 min mit Tween 20-haltigen PBS-Puffer gewaschen und zweimal 10 min mit Entwicklungslösung (100 mM NaCl, 100 mM Tris, 50 mM MgCl₂; pH 9,5) behandelt. Anschließend erfolgt eine Inkubation mit Detektionslösung (BCIP, NBT) für 10 – 30 min bei 20 °C, wobei die Farbreaktion durch einen Waschvorgang mit Milli-Q H₂O gestoppt wird.

6.2.4 Proteinlöslichkeitstests

Für die Löslichkeitsexperimente wird lyophilisiertes Protein in einer Konzentration von 1 mg/ml in einem 2 ml-Reaktionsgefäß angesetzt. Es werden die biologischen Puffer Citrat, Bis-Tris, Tris und Natriumphosphat in einer Molarität von 20 mM verwendet und der pH-Wert mit einem pH-Meter eingestellt. Zudem werden HCl-Lösung (25 mM), NaOH-Lösung (25 mM) und ein AN/5 mM HCl (1 : 1)-Gemisch verwendet. Um das Protein im jeweiligen Lösungsmittel zu lösen, wird die Probe dreimal 1 min bei einer Leistung von 95 % sonifiziert. Zur Bestimmung der löslichen Proteinmenge wird die Probe 15 min bei 20 °C und 13000 rpm zentrifugiert und 20 µl vom Überstand entnommen. Dieser 20 µl Ansatz wird anschließend mit Hilfe einer SDS-PAGE analysiert (siehe Kapitel 6.2.1).

6.2.5 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die MALDI-TOF-Massenspektrometrie wird als Nachweismethode der aufgereinigten Proteine verwendet. Diese sehr schonende gepulste Ionisierungsmethode eignet sich zur Detektion von Peptiden und Proteinen im Bereich von 5 – 500 kDa^[4]. Die Probe wird mit einem 100–1000-fachen Überschuss einer Matrix vermischt und auf einem Objektträger kokristallisiert. Anschließend erfolgt ein Beschuss durch einen kurzwelligen Laser, bei dem das Matrixgitter verdunstet und die Matrix- und Probenmoleküle explosionsartig in einem Desorptionsprozess herausgeschlagen werden (siehe Abbildung 57).

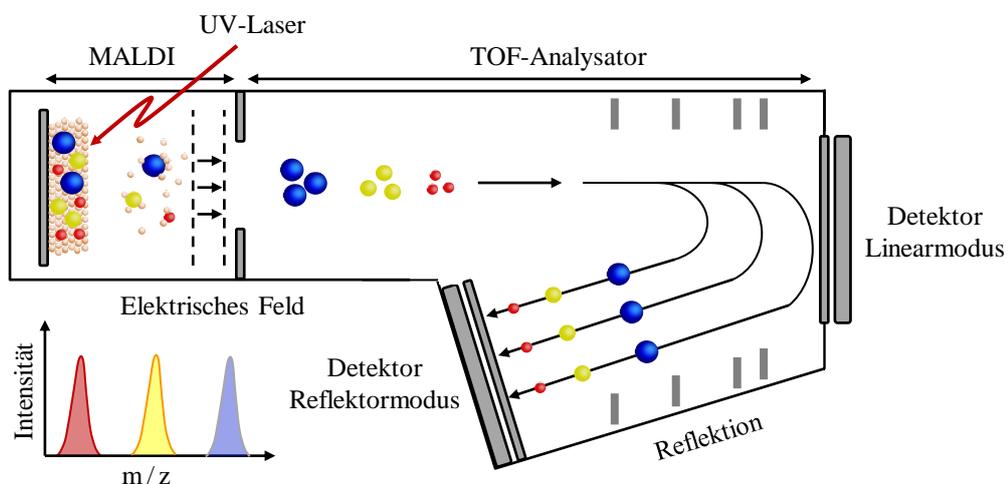


Abbildung 57 Prinzip der MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die Probe wird in ein Matrixgitter eingebettet und mit einem kurzwelligen Laser beschossen, wodurch die Proben- und Matrixmoleküle desorbieren und ionisieren. Sie werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und in einen TOF-Analysator entlassen, in welchem sie sich entsprechend ihres Masse-zu-Ladungsverhältnisses (m/z) trennen. Die Flugzeiten werden in einem linearen Modus oder in einem Reflektormodus detektiert und zu einem Massenspektrum ausgewertet. Abbildung verändert übernommen aus^[245].

Bei der darauf folgenden Ionisation lösen sich die Probenmoleküle in Form von einwertigen Ionen von den Matrixmolekülen. Die Ionen werden in einem elektrischen Feld zwischen Ionenquelle und geerdeter Elektrode im Hochvakuum beschleunigt und treten in einen TOF-Analysator ein. Dieser besteht aus einer feldfreien Flugröhre, in der die Ionen entsprechend ihres Masse-zu-Ladungsverhältnisses aufgetrennt werden. Die unterschiedlichen Flugzeiten werden von einem Detektor registriert und zu einem Massenspektrum ausgewertet ^[4,246].

Für die MALDI-TOF-Massenspektrometrie-Messungen wird 0,1 mg Protein in 30 μ l Matrixlösung (gesättigte 2,5-Dihydroxybenzoesäure-Lösung in 60 % AN/5 mM HCl) gelöst und 5 min bei 20 °C und 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend wird 1 μ l des Überstandes auf einen Objektträger aufgetragen und im Luftstrom getrocknet. Die Messungen werden an einem Autoflex III-Massenspektrometer der Firma Bruker durchgeführt.

6.2.6 Größenausschluss-Chromatographie

Die Größenausschluss-Chromatographie wird verwendet, um die Komplexgröße des Proteins zu bestimmen. Diese Methode basiert auf dem Prinzip der Gelfiltration, wobei Moleküle über eine wässrige mobile Phase durch eine poröse Gelmatrix nach der Größe ihres hydrodynamischen Volumens getrennt werden (siehe Abbildung 58). Kleine Moleküle eluieren bei diesem Trennverfahren zu einem späteren Zeitpunkt als große, da sie in die hydrophilen Poren der Gelmatrix eindringen können. Die Größe der Moleküle lässt sich anschließend durch Vergleich des Elutionsvolumens von Referenzmolekülen und der zu analysierenden Probe bestimmen ^[193].

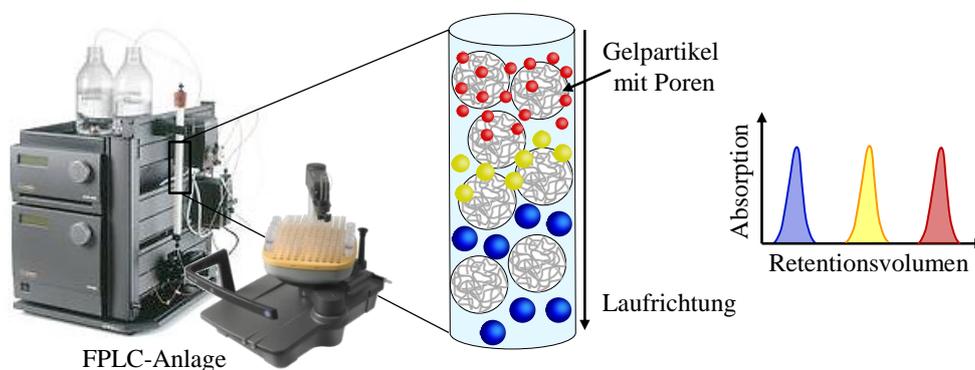


Abbildung 58 Trennprinzip der Größenausschluss-Chromatographie

Moleküle werden über eine wässrige mobile Phase durch eine poröse Gelmatrix nach der Größe ihres hydrodynamischen Volumens getrennt, wobei kleine Moleküle zu einem späteren Zeitpunkt als große eluieren, da sie in die hydrophilen Poren der Gelmatrix eindringen können. Der Chromatographieverlauf wird als Funktion des Retentionsvolumens gegen die UV-Absorption dargestellt. Abbildung verändert übernommen aus ^[193].

Die Größenausschluss-Chromatographie wird mit einer FPLC-Anlage durchgeführt, wobei ein SEC-Puffer (150 mM NaCl, 6 mM Na₂HPO₄, 14 mM NaH₂PO₄; pH 7,5) verwendet wird, welcher im Vorfeld filtriert und entgast wird. Es wird bei einer konstanten Flussrate von 0,5 ml/min, bei einem maximalen Druck von 5 bar und einer Temperatur von 20 °C gearbeitet. Der Chromatographieverlauf wird als Funktion des Retentionsvolumens durch UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm detektiert. Für die Experimente werden zwei Chromatographiesäulen mit unterschiedlichem Trennbereich und unterschiedlichem Säulenmaterial verwendet (siehe Tabelle 8). Die Säulen besitzen ein Volumen von 120 ml und werden vor der chromatographischen Auftrennung mit 60 ml Milli-Q H₂O und 240 ml SEC-Puffer equilibriert.

Chromatographiesäulen	Trennbereich	Säulenmaterial
HiPrep 16/60 Sepharyl S-100 High Resolution Säule	1 – 100 kDa	quervernetztes Polymer aus Allyldextran und N,N-Methylenbisacrylamid
HiLoad 16/60 Superdex 200 pg Säule	10 – 600 kDa	quervernetztes Polymer aus Agarose, welches kovalent mit Dextran verknüpft ist

Tabelle 8 Größenausschluss-Chromatographiesäulen

Für die chromatographische Auftrennung wird das Protein in einer Konzentration von 1 mg/ml Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,5) angesetzt. Um das Protein zu lösen, wird die Probe dreimal 1 min bei einer Leistung von 95 % sonifiziert. Die Proteinlösung wird steril filtriert und über eine Probenschleife auf die jeweilige Chromatographiesäule aufgetragen. Als Referenzproben werden Cytochrom c, BSA und 250 kDa-Dextran eingesetzt und diese ebenfalls in einer Konzentration von 1 mg/ml in Milli-Q H₂O oder Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,5) gelöst. Nach beendeter chromatographischer Auftrennung werden die Chromatographiesäulen mit 480 ml Milli-Q H₂O und 480 ml EtOH (20 %) gespült.

6.2.7 Dynamische Lichtstreuung

Mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung wird die Komplexgröße des Proteins bestimmt. Bei dieser hochauflösenden Laserstreulicht-Methode wird ein linear polarisierter Laserstrahl beim Durchtritt durch eine Probe gestreut und in einem Streuwinkel θ detektiert. Proteinkomplexe unterliegen in Lösung der Brown'schen Molekularbewegung und diffundieren in Abhängigkeit ihrer Größe mit variierender Diffusionsgeschwindigkeit in alle Raumrichtungen. Bei der Streuung kommt es zur Überlagerung der gestreuten Lichtwellen und somit zur destruktiven oder konstruktiven Interferenz.

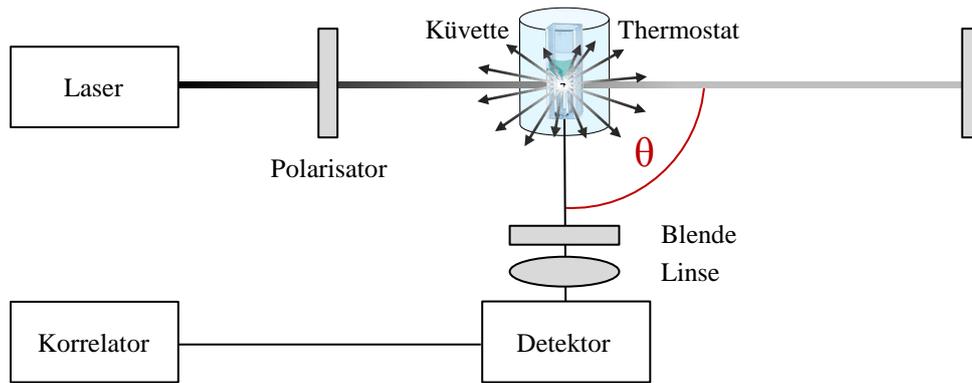


Abbildung 59 Aufbau der dynamischen Lichtstreuapparatur

Ein Laser dient als kohärente Lichtquelle und wird auf eine temperaturregulierte Probe fokussiert. Die dispergierten Makromoleküle streuen das Licht in alle Raumrichtungen und die Fluktuationen der Streulichtintensität werden im Streuwinkel θ detektiert und korreliert. Abbildung verändert übernommen aus ^[195,196]

Diese Fluktuationen der Streulichtintensität werden zeitabhängig detektiert und zu einer Autokorrelationsfunktion $G(t)$ gemittelt. Diese Funktion steht in Beziehung zum Streuvektor q und zum Diffusionskoeffizient D der Probe, wodurch der mittlere hydrodynamische Radius R_h der Proteinkomplexe über die Stokes-Einstein-Gleichung bestimmt werden kann (siehe Gleichung 6.2–6.4) ^[194].

$$G(t) = \exp(-q^2 D t) \quad (6.2)$$

$$q = \frac{4 \pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2} \quad (6.3)$$

$$R_h = \frac{k_B T}{6 \pi \eta_0 D} \quad (6.4)$$

$G(t)$ = Autokorrelationsfunktion; q = Streuvektor; D = Diffusionskoeffizient; t = Korrelationszeit; θ = Streuwinkel; λ = Wellenlänge des Lasers; n = Brechungsindex der Probe; T = Temperatur; η_0 = Viskosität des Lösungsmittels; R_h = hydrodynamischer Radius; k_B = Boltzmann-Konstante.

Für die Messungen wird das Protein in einer Konzentration von 1 mg/ml Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,5) angesetzt. Um das Protein zu lösen, wird die Probe dreimal 1 min bei einer Leistung von 95 % sonifiziert. Als Referenzproben werden Cytochrom c, BSA und 250 kDa-Dextran verwendet und diese ebenfalls in einer Konzentration von 1 mg/ml in Milli-Q H₂O oder Natriumphosphatpuffer (20 mM; pH 7,5) gelöst. Die Proteinlösungen werden vor den Messungen steril filtriert und es wird mit einem Probenvolumen von 500 μ l pro Messküvette gearbeitet. Jede Probe wird dreimal zu je 30 Scans bei einer Temperatur von 20 °C gemessen und die Daten werden anschließend gemittelt. Die Scandauer beträgt 30 s und zwischen den Messungen wird eine Dauer von 60 s einge-räumt.

6.2.8 Analytische Ultrazentrifugation

Um die Komplexgröße des Proteins zu bestimmen, wird ein Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiment mit Hilfe einer analytischen Ultrazentrifugation durchgeführt. Bei einer solchen Sedimentation wandern lösliche Teilchen durch ein angelegtes Zentrifugalfeld entsprechend ihrer Größe und Form in Richtung Zellboden, wobei sich eine Sedimentationsfront ausbildet. Um hierbei zu verhindern, dass die Teilchen an die Zellwand stoßen, wird eine sektorförmige Messzelle verwendet (siehe Abbildung 60 A). Die Teilchen sind bei einer solchen Sedimentation der Zentrifugalkraft F_Z , der Auftriebskraft F_A und der Reibungskraft F_R ausgesetzt (siehe Gleichung 6.5).

$$F = F_A + F_R - F_Z \quad (6.5)$$

$$F = (\omega^2 r V \rho_0) + (f v) - (m \omega^2 r)$$

F = Kraft; F_A = Antriebskraft; F_R = Reibungskraft; F_Z = Zentrifugalkraft; ω = Winkelgeschwindigkeit des Rotors; r = radialer Abstand des Teilchens von der Rotationsachse; V = Volumen des Teilchens; ρ_0 = Dichte des Lösungsmittels; f = Reibungskoeffizient; v = Geschwindigkeit des Teilchens; m = Masse des Teilchens.

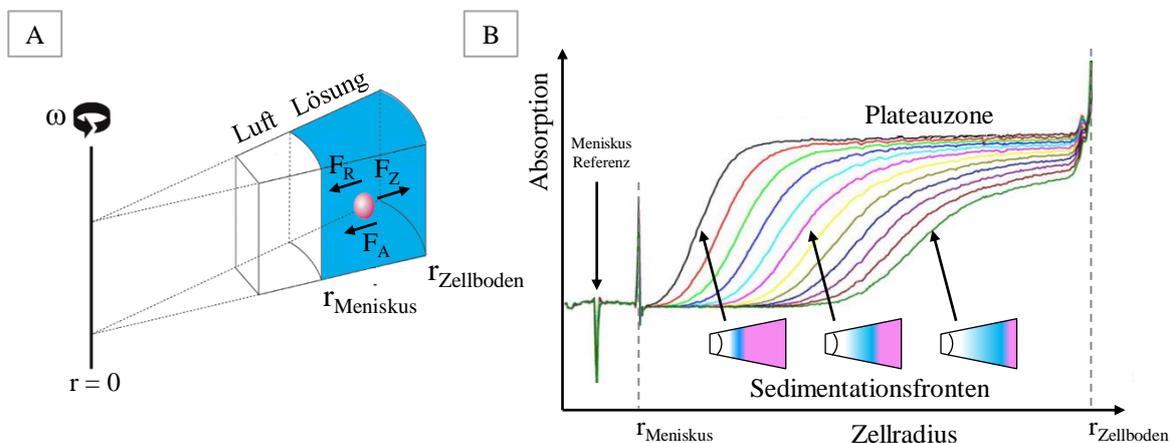


Abbildung 60 Prinzip eines Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiments

A: Sektorförmige Messzelle einer analytischen Ultrazentrifugation. **B:** Sedimentationsprofil, bei welchem zeitabhängig das orts aufgelöste Konzentrationsprofil innerhalb der Messzelle detektiert wird. In einer Doppelsektorzelle wird die Absorption der Probe gegen eine Referenz gemessen. Abbildungen verändert übernommen aus ^[247].

Bei einem Geschwindigkeitsexperiment wird eine so hohe Rotationsgeschwindigkeit gewählt, dass innerhalb kürzester Zeit ($< 10^{-6}$ s) ein Kräftegleichgewicht entsteht und die Teilchen mit konstanter Geschwindigkeit in Richtung Zellboden wandern. Die Rückdiffusion der am Boden angereicherten Teilchen kann hierbei aufgrund der hohen Zentrifugalbeschleunigung vernachlässigt werden. Die Teilchenkonzentration wird als Funktion des radialen Abstandes von der Rotationsachse in festen Zeitabständen durch ein optisches UV-Absorptionssystem detektiert. Es wird ein Sedimentationsprofil erstellt, wobei die

Sedimentationsfronten den Wendepunkten der Absorptionskurven entsprechen (siehe Abbildung 60 B). Da die Moleküle durch die sektorförmige Messzelle in ein größeres Volumenelement wandern, kommt es zu einem Verdünnungseffekt und somit zu einer abnehmenden Teilchenkonzentration. In radialer Richtung bleibt hingegen die Teilchenkonzentration konstant, wodurch sich eine Plateauzone ausbildet^[197,198,248]. Anschließend wird das Sedimentationsprofil durch numerische Integration in eine differentielle Sedimentationskoeffizienten-Verteilung umgerechnet, wobei eine kumulative Verteilung $c(s)$ der Teilchenkonzentration mit Sedimentationskoeffizienten zwischen s und $s + ds$ erhalten wird^[199]. Der Sedimentationskoeffizient s leitet sich aus Gleichung 6.5 ab und beschreibt das Verhältnis der Sedimentationsgeschwindigkeit zur Zentrifugalbeschleunigung (siehe Gleichung 6.6). Er wird in der Svedberg-Einheit [S] angegeben, welche als 10^{-13} s definiert ist. Da der Sedimentationskoeffizient von der Viskosität des Lösungsmittels ρ_0 abhängt, wird er auf die Dichte und die Viskosität von Wasser bei 20 °C umgerechnet und als $s_{20,w}$ angegeben. Unter Berücksichtigung der Einstein-Beziehung lässt sich Gleichung 6.6 zur Svedberg-Gleichung umformen, mit der das Molekulargewicht M_r der Teilchen bestimmt wird^[197,198] (siehe Gleichung 6.7).

$$s \equiv \frac{v}{\omega^2 r} = \frac{m (1 - \tilde{V}_2 \rho_0)}{f} \quad (6.6)$$

$$M_r = \frac{s R T}{D (1 - \tilde{V} \rho_0)} \quad (6.7)$$

s = Sedimentationskoeffizient; v = Geschwindigkeit des Teilchens; ω = Winkelgeschwindigkeit des Rotors; r = radialer Abstand des Teilchens von der Rotationsachse; m = Masse des Teilchens; \tilde{V} = spezifisches Volumen des Teilchens = $1 / \rho$; ρ = Dichte des Teilchens; ρ_0 = Dichte des Lösungsmittels; M_r = Molekulargewicht der Teilchen; R = Gaskonstante; T = Temperatur; D = Diffusionskoeffizient.

Für das Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiment wird das Protein in einer Konzentration von 1 mg/ml Natriumphosphatpuffer (10 mM; pH 7,5) angesetzt. Um das Protein zu lösen, wird die Probe dreimal 1 min bei einer Leistung von 95 % sonifiziert. Das Experiment wird bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 40000 rpm durchgeführt.

6.2.9 Synchrotron-Zirkulardichroismus-Spektroskopie

Die isotrope SR-CD-Spektroskopie wird verwendet, um die globale Sekundärstruktur des Proteins zu bestimmen. Für diese Methode wird zirkular polarisiertes Licht benötigt, welches aus zwei senkrecht zueinander stehenden elektromagnetischen Wellen besteht. Die Wellen besitzen eine gleiche Amplitude, eine gleiche Wellenlänge und eine Phasenverschiebung um 90°. Es wird abwechselnd links (E_L) und rechts (E_R) zirkular polarisiertes

Licht eingestrahlt, wobei beim Durchgang durch eine chirale Probe diese Komponenten unterschiedlich stark absorbiert werden, wodurch das Licht elliptisch polarisiert wird (siehe Abbildung 61 A und 61 C). Durch die optische Aktivität der Probe kann es auch zu einer Drehung der optischen Achse kommen, worauf die optische Rotationsdispersion (ORD) beruht. Diese entsteht, wenn die Probe einen unterschiedlichen Brechungsindex für links und rechts zirkular polarisiertes Licht besitzt und sich daher unterschiedliche Ausbreitungsgeschwindigkeiten der beiden Wellen ergeben.

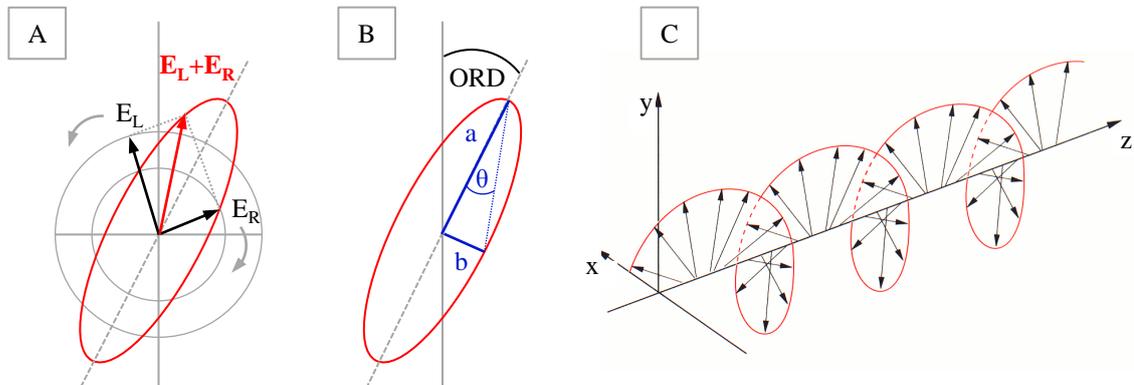


Abbildung 61 Elliptisch zirkular polarisiertes Licht

A: Entstehung von elliptisch zirkular polarisiertem Licht. Beim Durchgang von zirkular polarisiertem Licht durch ein chirales Molekül kommt es zum Absorptionsunterschied der links (E_L) und rechts (E_R) zirkular polarisierten Komponenten, wodurch das Licht elliptisch polarisiert. **B:** Definition der Elliptizität θ . Große und kleine Halbachse (a und b) bilden die Katheten eines rechtwinkligen Dreiecks, in welchem der Tangentialwinkel als Elliptizität definiert ist. Durch die Optische Rotationsdispersion (ORD) wird eine Drehung der optischen Achse erzeugt. **C:** Darstellung einer elliptisch zirkular polarisierten elektromagnetischen Welle. Abbildungen verändert übernommen aus ^[206,249,250].

Der entstehende Absorptionsunterschied, welcher als molarer Zirkulardichroismus $\Delta\varepsilon$ bezeichnet wird, ist die Messgröße der isotropen SR-CD-Spektroskopie (siehe Gleichung 6.8). Das CD-Signal wird als Elliptizität des Lichts θ in tausendstel Winkelgraden [mdeg] angegeben und ist als Arkustangens des Verhältnisses von kleiner zu großer Halbachse der Polarisationsellipse definiert (siehe Gleichung 6.9 und Abbildung 61 B).

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R = \frac{\Delta A}{c d} \quad (6.8)$$

$$\theta = \tan^{-1} \frac{b}{a} \quad (6.9)$$

$\Delta\varepsilon$ = molarer Zirkulardichroismus; ε_L = molarer Extinktionskoeffizient des links polarisierten Lichts; ε_R = molarer Extinktionskoeffizient des rechts polarisierten Lichts; ΔA = Extinktion; c = Proteinkonzentration; d = optische Schichtdicke; θ = Elliptizität; b und a = Halbachsen der Ellipse.

Moleküle müssen zwei Eigenschaften besitzen, um mit Hilfe der isotropen CD-Spektroskopie analysiert werden zu können. Zum einen müssen sie chiral sein und zum anderen müssen sie einen im Absorptionsbereich messbaren Chromophor besitzen. Proteine erfüllen diese Eigenschaften, da sie aufgrund ihrer Aminosäuren viele Chiralitätszentren besitzen und die Amidbindung des Proteinrückgrats im fernen UV-Bereich (180–260 nm) absorbiert. Die nichtbindenden π -Elektronen der Amidbindung (π_{nb} - π^* -Übergang; 193 nm) und die ungepaarten Elektronen des Sauerstoffs (n - π^* -Übergang; 222 nm) werden hierbei jeweils in das antibindende π -Orbital angeregt. Da die Intensität der Elektronenübergänge von den Torsionswinkeln φ und ψ der Peptidbindung und daher von der Proteinsekundärstruktur abhängen, werden charakteristische Absorptionsbanden für Sekundärstrukturelemente erzeugt^[206,207].

Für die SR-CD-Messungen werden die Proteine in Lipidvesikeln rekonstituiert. Hierfür wird 0,1 mg Protein in HFIP gelöst und mit einer in HFIP gelösten Lipidlösung im molaren P:L-Verhältnis von 1:50 gemischt. Das Lösungsmittel wird anschließend in einem Stickstoffstrom abgedampft und die Probe für 24 h unter Vakuum gehalten. Der trockene Protein-Lipid-Film wird mit 50 μ l Milli-Q H₂O aufgenommen und dreimal 1 min bei einer Leistung von 95 % sonifiziert. Um jegliche HFIP-Rückstände zu entfernen, wird ein weiteres Mal lyophilisiert und der Protein-Lipid-Film mit 25 μ l Milli-Q H₂O aufgenommen. Es folgen sechs Gefrier-Tau-Zyklen für 10 min bei -196 °C in flüssigem Stickstoff und 10 min bei 40 °C im Wasserbad, wobei die Probe zwischen den Zyklen stark resuspendiert wird. Um kleine unilamellare Proteoliposome herzustellen, wird die Probe viermal 1 min bei einer Leistung von 95 % sonifiziert. Anschließend werden 4 μ l der Proteoliposomsuspension in eine Calciumfluorid-Küvette mit einer Schichtdicke von 12,4 μ m pipettiert.

Die SR-CD-Messungen werden an der UV-CD12-Strahlröhre in der Angströmquelle Karlsruhe (ANKA) durchgeführt. Die Spektren werden bei 35 °C in 0,5 nm Intervallen im Bereich von 170–270 nm aufgenommen. Es werden jeweils drei Messungen bei einer Scangeschwindigkeit von 19 nm/min gemittelt. Als Referenz wird ein Spektrum einer reinen Vesikelprobe aufgenommen und dieses vom Probenspektrum subtrahiert. Für eine quantitative Auswertung wird prinzipiell das CD-Signal in die mittlere molare Elliptizität pro Peptidbindung $[\theta]_{MRE}$ umgerechnet, wofür die genaue Proteinkonzentration bekannt sein muss (siehe Gleichung 6.10 und 6.11).

$$[\theta]_{\text{MRE}} = \frac{\theta}{10 C_r d} \quad (6.10)$$

$$C_r = \frac{n c_g}{M_r} \quad (6.11)$$

$[\theta]_{\text{MRE}}$ = mittlere molare Elliptizität pro Peptidbindung [deg cm²/decimol]; θ = Elliptizität; C_r = molare Konzentration pro Peptidbindung; d = optische Schichtdicke; n = Anzahl der Peptidbindungen; c_g = Proteinkonzentration; M_r = Molekulargewicht des Proteins.

Aufgrund fehlender UV-absorbierender aromatischer Aminosäuren der in dieser Arbeit verwendeten Proteine kann die Proteinkonzentration nicht genau ermittelt werden, weswegen das CD-Signal nicht in die $[\theta]_{\text{MRE}}$ umgerechnet wird. Die Spektren werden nur geglättet und die Basislinien korrigiert. Zur qualitativen Auswertung werden die Spektren mit Basisspektren reiner Sekundärstrukturelemente verglichen ^[206] (siehe Abbildung 30 A).

6.2.10 Orientierte Synchrotron-Zirkulardichroismus-Spektroskopie

Mit Hilfe der SR-OCD-Spektroskopie wird die Orientierung der Proteine in Modellmembranen bestimmt. Diese Methode ist eine spezielle Variante der CD-Spektroskopie, wobei im Gegensatz zur isotropen CD-Spektroskopie Aussagen über die räumliche Orientierung einer α -Helix in einer orientierten Lipiddoppelschicht getroffen werden können. Die Bindungselektronen der Peptidbindung werden durch zirkular polarisiertes Licht angeregt. Für diese Übergänge existieren Übergangsdipolmomente, die entweder senkrecht oder parallel zur Helixachse ausgerichtet sind, wodurch die Absorptionsstärke von der Orientierung einer α -Helix zum einfallenden Lichtstrahl abhängt. Der n - π^* -Übergang erzeugt unabhängig von der Orientierung der α -Helix eine negative Bande bei 222 nm. Beim π - π^* -Übergang kommt es hingegen zu einer dreifachen Aufspaltung der Energieniveaus. Der π_{nb} - π^* -Übergang, dessen Übergangsdipolmoment parallel zur Helixachse ausgerichtet ist, erzeugt bei einer parallel zur Membranoberfläche orientierten α -Helix eine negative Bande bei 208 nm. Die α -Helix liegt in diesem Fall senkrecht zum einfallenden Licht, wodurch es zu einer starken Wechselwirkung zwischen dem elektrischen Feldvektor und dem Übergangsdipolmoment kommt. Somit ist es möglich durch die An- und Abwesenheit der Bande bei 208 nm zwischen einer oberflächengebundenen und einer membrandurchspannenden α -Helix zu unterscheiden. Die beiden π_{nb} - π^* -Übergänge, deren Übergangsdipolmomente senkrecht zur Helixachse ausgerichtet sind, können nicht unterschieden werden und erzeugen eine Bande bei 190 nm ^[251–253].

Für die SR-OCD-Messungen werden die Proteine in orientierten Lipiddoppelschichten rekonstituiert. Hierbei wird eine Lipidmenge von 150 µg/Probe konstant gehalten und ein molares P:L-Verhältnis von 1:20 verwendet. Für die Rekonstitution werden Protein und Lipid in HFIP gelöst und in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß gemischt. Anschließend werden 20 µl der Probe auf einen Quarzglasprobenträger pipettiert und im Luftstrom getrocknet. Um das Lösungsmittel zu entfernen, wird der Träger für 2 h im Exsikkator unter Vakuum gehalten. Der getrocknete Protein-Lipid-Film wird 24 h bei 30 °C und einer 97 % rH (gesättigte K₂SO₄-Lösung) hydratisiert, wodurch sich orientierte Lipiddoppelschichten auf dem Träger ausbilden. Die orientierte Probe wird senkrecht zum einfallenden Lichtstrahl in die OCD-Messzelle eingebaut.

Die SR-OCD-Messungen werden an der UV-CD12-Strahlröhre in der Angströmquelle Karlsruhe (ANKA) durchgeführt. Die Spektren werden bei 30 °C in 0,5 nm Intervallen im Bereich von 175–280 nm aufgenommen. Durch Rotation der OCD-Messzelle um den Lichtstrahl wird die Probe unter acht verschiedenen Winkeln (0°, 45°, 90°, 135°, 180°, 225°, 270°, 325°) gemessen. Anschließend wird über alle Winkel gemittelt, um auftretende Artefakte durch Lineardichroismus und Doppelbrechung abzuschwächen. Als Referenz wird ein Spektrum einer reinen Lipidprobe aufgenommen und dieses vom Probenspektrum subtrahiert. Aufgrund fehlender UV-absorbierender aromatischer Aminosäuren kann die genaue Proteinkonzentration nicht genau ermittelt werden, weswegen das OCD-Signal nicht in die $[\theta]_{\text{MRE}}$ umgerechnet wird. Die Spektren werden geglättet, die Basislinien korrigiert und das globale Minimum auf den Wert -1 normiert.

6.2.11 Festkörper-Kernspinresonanz-Spektroskopie

Mit Hilfe der Festkörper-NMR-Spektroskopie ist die Strukturuntersuchung von Biomolekülen möglich, da diese NMR-aktive Atomkerne mit einem Kernspin $I \neq 0$ (¹H, ²H, ¹³C, ¹⁴N, ¹⁵N, ¹⁷O und ³¹P) besitzen. Diese Atomkerne weisen einen Drehimpuls (Spin) auf und besitzen somit ein magnetisches Moment. Die Festkörper-NMR-Spektroskopie beruht auf der Wechselwirkung dieser magnetischen Momente mit externen und internen lokalen Magnetfeldern. Während in der Flüssig-NMR-Spektroskopie Wechselwirkungen mit dem äußeren statischen Magnetfeld (Zeemann-Aufspaltung), mit internen Feldern der Elektronenhüllen (isotrope chemische Verschiebung) und skalare Spin-Spin-Wechselwirkungen (J-Kopplung) von Bedeutung sind, spielen bei der Festkörper-NMR-Spektroskopie darüber hinaus anisotrope (richtungsabhängige) Wechselwirkungen eine wichtige Rolle. Hierzu zählen Kopplungen mit der lokalen Umgebung (anisotrope chemische Verschiebung,

Quadrupolwechselwirkung bei Kernen mit einem Kernspin von $I > 1/2$) sowie Kopplungen mit benachbarten Kernspins (homo- und heteronukleare Dipol-Dipol-Wechselwirkungen). Die Stärke der Spinwechselwirkungen wird durch das gyromagnetische Verhältnis γ des jeweiligen Atomkerns angegeben und drückt dessen Empfindlichkeit aus ^[254].

Insbesondere der ¹⁵N-Kern eignet sich besonders gut zur Strukturuntersuchung von Proteinen, da er einen Kernspin von $I = 1/2$ besitzt und in der Amidbindung des Peptidrückgrats isoliert vorliegt. Aufgrund seiner geringen natürlichen Häufigkeit von nur 0,37 % ^[255] wird er jedoch meistens durch eine Vollmarkierung im Protein angereichert, um eine höhere Signalintensität zu erzielen. Der ³¹P-Kern wird hingegen meist genutzt, um Zellmembranen zu untersuchen, da diese unter anderem aus Phosphoglyceriden bestehen, welche eine Phosphatgruppe in ihrer Kopfgruppe tragen. Der ³¹P-Kern besitzt ebenfalls einen Kernspin von $I = 1/2$ und eine natürliche Häufigkeit von 100 %, wodurch er ein sehr sensitiver Kern für NMR-Messungen ist ^[255]. Aus diesem Grund eignen sich statische ¹⁵N-NMR- und ³¹P-NMR-Experimente sehr gut, um die Orientierung eines Proteins in Membran-imitierenden Modellsystemen zu untersuchen.

Durch den Zeeman-Effekt in einem äußeren statischen Magnetfeld B_0 nehmen die Kernspins eine bestimmte Orientierung ein und deren zuvor entartete Energiezustände spalten sich in diskrete Energieniveaus auf. Die Energiedifferenz ΔE wird durch die Magnetfeldstärke und durch das gyromagnetische Verhältnis γ der Kerne beeinflusst. Die Spinverteilung der Energieniveaus lässt sich durch die Boltzmann-Verteilung beschreiben (siehe Gleichung 6.12).

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{\frac{\Delta E}{k_B T}} \approx 1 - \frac{\gamma \hbar B_0}{k_B T} \quad (6.12)$$

N_α = Zahl der Kerne im Grundzustand; N_β = Zahl der Kerne im angeregten Zustand; ΔE = Energiedifferenz; k_B = Boltzmann-Konstante; T = Temperatur; γ = gyromagnetisches Verhältnis; B_0 = Magnetfeld; \hbar = reduziertes Planksches Wirkungsquantum = $h/2\pi$.

Die Kernspins führen eine Präzessionsbewegung um die Feldrichtung aus und rotieren mit der Larmorfrequenz ω_0 . Durch Einstrahlung mit einem oszillierenden Hochfrequenzfeld B_1 senkrecht zum Magnetfeld B_0 werden Übergänge der Kernspins in das nächsthöhere Energieniveau induziert. Zur Anregung der Kernspins muss die eingestrahlte Strahlung der Larmorfrequenz entsprechen und demnach folgende Resonanzbedingung erfüllen:

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0 = \hbar \omega_0 \quad (6.13)$$

ΔE = Energiedifferenz; γ = gyromagnetisches Verhältnis; B_0 = Magnetfeld; ω_0 = Larmorfrequenz; \hbar = reduziertes Planksches Wirkungsquantum = $h/2\pi$.

Durch diesen 90° -Anregungspuls entsteht eine oszillierende Magnetisierung in der x,y-Ebene, welche eine Spannung in der Empfängerspule erzeugt und als NMR-Signal registriert wird. Die Magnetisierung kehrt durch Relaxationsprozesse wieder in den Grundzustand zurück. Durch die Spin-Gitter-Relaxation (longitudinale T_1 -Relaxation) relaxieren die Kernspins in ihren Grundzustand zurück und durch die Spin-Spin-Relaxation (transversale T_2 -Relaxation) geht die Phasenkohärenz der Kernspins verloren. Das resultierende FID-Signal (*free induction decay*) wird anschließend durch Fourier-Transformation in ein NMR-Spektrum umgerechnet. Die Wiederholungsrate der Datenakkumulation wird durch die longitudinale T_1 -Relaxationszeit bestimmt, da die Spin-Gitter-Relaxation in Festkörpern meist deutlich langsamer als die Spin-Spin-Relaxation ist.

Die Elektronen, die die Atomkerne umgeben, treten ebenfalls mit dem äußeren Magnetfeld in Wechselwirkung und induzieren lokale Magnetfelder. Hierdurch wird das äußere Magnetfeld am Ort des Kerns je nach Molekülgeometrie und Elektronendichte verstärkt oder abgeschwächt, was zu einer Verschiebung der Resonanzfrequenzen der Kernspins führt. Dieser Effekt, welchen man als chemische Verschiebung bezeichnet, ist in Flüssigkeiten aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung der Moleküle richtungsunabhängig. In Festkörpern besitzt er hingegen eine Richtungsabhängigkeit und wird als Anisotropie der chemischen Verschiebung (*chemical shift anisotropy*; CSA) bezeichnet. Durch die eingeschränkte Beweglichkeit der Moleküle beinhaltet das entsprechende NMR-Spektrum die Summe der Signale aller Orientierungen. Mathematisch lässt sich dieser Effekt durch einen CSA-Tensor beschreiben, der durch ein Ellipsoid mit drei Tensorelementen σ_{xx} , σ_{yy} und σ_{zz} in einem molekülbezogenen Koordinatensystem (*principal axis system*, PAS) dargestellt werden kann^[256] (siehe Abbildung 62 A). In einem NMR-Spektrum ergibt sich durch die Überlagerung aller möglichen Orientierungen im Raum ein charakteristisches Pulverspektrum im Frequenzbereich, an dem die Tensorelemente abgelesen werden können (siehe Abbildung 62 B). Durch Verwendung orientierter Proben kann das Spektrum vereinfacht werden, wodurch schärfere Signale entstehen. Hierfür kann das zu untersuchende Membranprotein in orientierten Lipiddoppelschichten rekonstituiert werden. Wenn das Protein eine α -helikale Faltung annimmt, liegt der Vektor der NH-Bindung nahezu parallel zur Helixachse. Da das σ_{zz} -Element des CSA-Tensors sich in diesem Fall entlang der NH-Bindung orientiert und parallel zur Helixachse ausgerichtet ist, ist anhand der chemischen Verschiebung somit eine qualitative Bestimmung der Orientierung der Helix möglich.

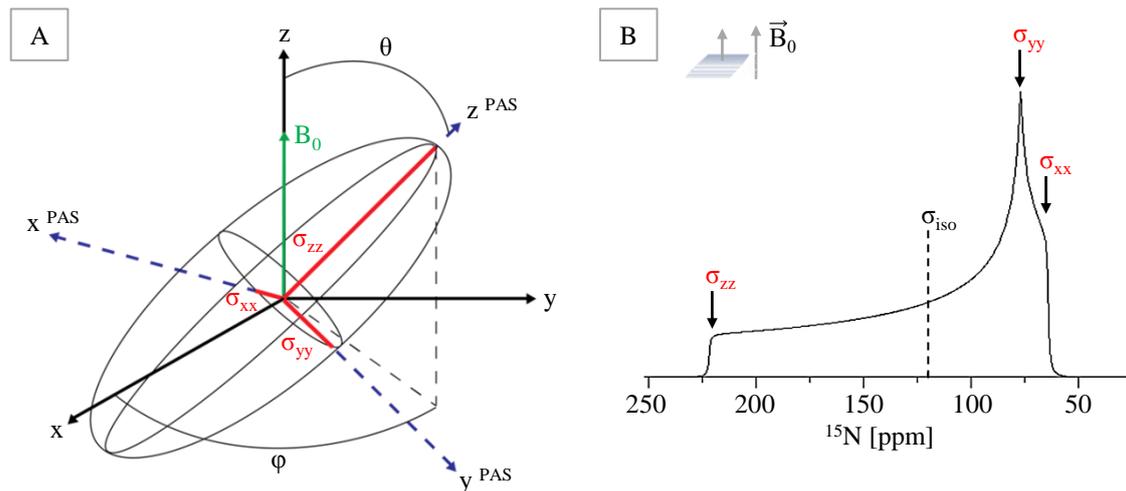


Abbildung 62 Ellipsoider CSA-Tensor und ^{15}N -Festkörper-NMR-Pulverspektrum

A: Ellipsoid als Modell für einen CSA-Tensor. Die Orientierung des Tensors bezüglich des Magnetfeldes B_0 ist durch die Winkel θ und φ gegeben. **B:** Typische Linienform eines ^{15}N -Festkörper-NMR-Pulverspektrums. Abbildungen verändert übernommen aus ^[257].

6.2.11.1 Rekonstitutionsmethoden

Die Proteine werden für die NMR-Messungen in orientierten Lipiddoppelschichten auf Glasplättchen rekonstituiert. Hierbei werden unterschiedliche Rekonstitutionsmethoden angewendet, wobei eine Lipidmenge von 18,9 mg/Probe konstant gehalten wird. Für das Protein TatA₂₋₇₀ wird ein molares P:L-Verhältnis von 1:100 gewählt und für die TatA₂₋₄₅-Mutanten ein molares P:L-Verhältnis von 1:75.

Bei der HFIP-vermittelten Rekonstitution werden Protein und Lipid in HFIP gelöst und in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß gemischt, wobei die Probe ein Endvolumen von 500 μl besitzt.

Bei der Detergens-vermittelten Rekonstitution werden Protein und Lipid in 1,5 ml NLS-Lösung (1,5 %) in einem 2 ml-Reaktionsgefäß solubilisiert. Anschließend erfolgt eine Entfernung des Detergenses durch eine Bio-BeadsTM (SM-2) Behandlung, wodurch sich große unilamellare Proteoliposome bilden. Hierfür werden die Bio-BeadsTM im Vorfeld mehrmals mit Methanol (MeOH) und Milli-Q H₂O gewaschen. Der Rekonstitutionsansatz wird oberhalb der Phasenübergangstemperatur der Lipide temperiert und unter Rühren stündlich eine Spatelspitze Bio-BeadsTM zugegeben. Nach 5 h wird die Proteoliposomsuspension durch Glaswolle filtriert, um die Bio-BeadsTM abzutrennen. Anschließend wird der pH-Wert mit Hilfe einer Micro-pH-Elektrode eingestellt.

Für die Rekonstitution über Lipidvesikel wird das Lipid in 1,7 ml Milli-Q H₂O aufgenommen und oberhalb der Phasenübergangstemperatur des Lipids temperiert. Die Lipidsuspension wird dreimal 1 min bei einer Leistung von 95 % sonifiziert, wodurch sich kleine

unilamellare Lipidvesikel bilden. Das Protein wird in 100 μl Natriumphosphatpuffer (10 mM; pH 7,5) durch mehrere Ultraschallzyklen bei einer Leistung von 95 % gelöst. Anschließend wird die Vesikelsuspension mit der Proteinlösung gemischt.

Für die Herstellung der orientierten Lipiddoppelschichten wird die Probe unabhängig vom jeweiligen Rekonstitutionsansatz anschließend gleichmäßig auf 20 Glasplättchen (Größe: 7,5 mm \cdot 12 mm) pipettiert. Danach werden die Glasplättchen im Luftstrom getrocknet, für 24 h im Exsikkator unter Vakuum gehalten und gestapelt. Zur Bildung der orientierten Lipiddoppelschichten wird der Glasplättchenstapel 24 h bei 48 °C und einer 97 % rH (gesättigter K_2SO_4 -Lösung) hydratisiert und anschließend mit Parafilm und einer Polyethylenfolie luftdicht verpackt.

Alkalische NMR-Proben werden neben der Detergens-vermittelten Rekonstitution auch über einen weiteren Ansatz hergestellt. Hierbei wird das Protein über HFIP rekonstituiert und die Glasplättchen nach der Trocknung im Exsikkator jeweils mit 60 μl CHES-Puffer (5 mM; pH 9,5) überschichtet und im Luftstrom getrocknet. Anschließend wird der pH-Wert auf einem getrockneten Glasplättchen durch Zugabe von 10 μl Milli-Q H_2O und mit Hilfe eines Kontakt-pH-Meters überprüft, bevor der Glasplättchen gestapelt, rehydratisiert und verpackt wird.

6.2.11.2 Festkörper-NMR-Messungen

Für die Festkörper-NMR-Messungen wird ein Tripleresonanz-($^1\text{H}/\text{X}/\text{Y}$)-Probenkopf oder ein Doppelresonanz-($^1\text{H}/^{15}\text{N}$)-LowE-Probenkopf der Firma Bruker verwendet. Beide Probenköpfe sind mit einer horizontalen Flachspule ausgestattet, wobei die Spule des Tripleresonanz-($^1\text{H}/\text{X}/\text{Y}$)-Probenkopfes manuell getauscht werden kann. Hierdurch ist es möglich, die Probe auch in einer 90°-Orientierung relativ zum Magnetfeld zu messen. Die Messungen werden an einem 500 MHz-Spektrometer der Firma Bruker durchgeführt. Die Orientierung der Proteine wird durch ^{15}N -NMR-Experimente bestimmt und die Orientierung der Lipidmoleküle vor und nach den ^{15}N -NMR-Messungen durch ein ^{31}P -NMR-Experiment überprüft.

Die heteronukleare Dipol-Dipol-Kopplung zwischen den Protonen und den zu beobachtenden NMR-aktiven Kernen (^{15}N und ^{31}P) führt prinzipiell in Festkörper-NMR-Spektren zu einer sehr starken Linienverbreiterung. Aus diesem Grund wird bei allen Messungen während der Detektion des FID-Signals (Akquisitionszeit) heteronuklear ^1H -entkoppelt. Hierzu wird auf dem Protonenkanal permanent mit einem oszillierenden Hochfrequenzfeld B_1 der ^1H -Resonanzfrequenz eingestrahlt, wodurch die Übergänge der Protonenspins

gesättigt und die dipolaren Spinwechselwirkungen mit den Kernen ^{15}N und ^{31}P aufgehoben werden. Da die Flachspule der Probenköpfe sowohl zum Einstrahlen des Impulses als auch zum Empfang des FID-Signals verwendet wird, entsteht eine gewisse Zeitspanne τ_{Tod} , in der die Konsole von Senden auf Empfang umstellt. Da das FID-Signal somit erst verspätet aufgezeichnet wird, gehen Signalanteile verloren und dephasierte Signale entstehen. Um diesem Effekt entgegenzuwirken, werden Hahn-Echo-Experimente durchgeführt ^[258]. Nach der transversalen Magnetisierung durch einen 90° -Anregungspuls wird das FID-Signal durch einen 180° -Puls nach der Zeit τ_{Echo} refokussiert, um die zeitliche Dephasierung zu invertieren. Die Detektion wird erst beim Maximum des Echos nach der Zeit $2 \tau_{\text{Echo}}$ gestartet. In Abbildung 63 ist die Hahn-Echo-Pulssequenz der ^{31}P -NMR-Experimente gezeigt, welche mit einer 90° -Pulslänge von $7 \mu\text{s}$ durchgeführt werden. Zur Hochleistungsentkopplung (HP) wird eine SPINAL-Pulssequenz (*small phase incremental alternation*) ^[259,260] mit einer ^1H -Entkopplungsfeldstärke von 30 kHz gewählt.

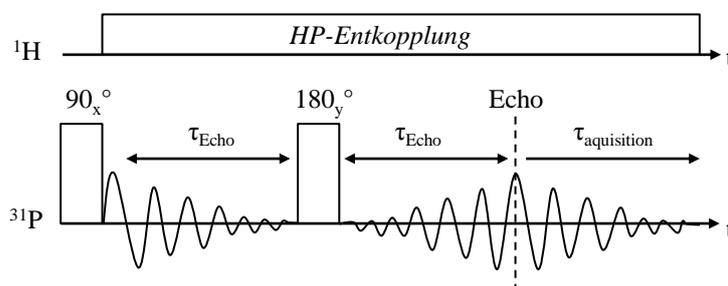


Abbildung 63 Hahn-Echo-Pulssequenz der ^{31}P -NMR-Experimente

Durch einen 90° -Anregungspuls wird eine transversale Magnetisierung erzeugt. Anschließend wird das FID-Signal durch einen 180° -Puls refokussiert und die Detektion beim Maximum des Echos gestartet. Nach der Anregung wird auf dem Protonenkanal eingestrahlt und heteronuklear ^1H -entkoppelt. Abbildung verändert übernommen aus ^[258].

Da die Gesamtmagnetisierung vom Betrag des gyromagnetischen Verhältnisses der NMR-aktiven Atomkerne abhängt, sind Isotope mit großem gyromagnetischem Verhältnis viel stärker polarisiert. ^1H -Kerne besitzen das größte gyromagnetische Verhältnis von $2,6752 \cdot 10^8 \text{ Ts}^{-1}$ und eine relative Empfindlichkeit von 100 %. Im Gegensatz dazu, liegt das gyromagnetische Verhältnis des ^{15}N -Kerns nur bei $-2,7108 \cdot 10^7 \text{ Ts}^{-1}$ und der Kern besitzt nur eine relativ Empfindlichkeit von 0,1 % ^[255]. Um die Signalintensität zu verstärken, werden daher mehrere Scans durchgeführt und das FID-Signal aufsummiert. Hierdurch steigt das Signal-zu-Rausch-Verhältnis und die Zeitspanne zweier aufeinanderfolgender Pulssequenzen (*recycle delay*) muss beachtet werden. Da die Spin-Gitter-Relaxationszeiten für ^{15}N -Kerne im Minutenbereich liegen, führt dies zu extrem langen nicht realisierbaren Messzeiten. Um die Signalintensität des ^{15}N -Kerns zu erhöhen und die

Messzeit zu verkürzen, werden daher Kreuzpolarisationsexperimente (*cross polarization*; CP) durchgeführt^[261,262]. Durch diese Doppelresonanz-Technik wird Magnetisierung vom ¹H-Kern auf den ¹⁵N-Kern übertragen. Hierbei wird zuerst durch einen 90°-Anregungspuls eine transversale Magnetisierung auf dem Protonenkanal erzeugt. Anschließend wird ein Kontaktpuls nachgeschaltet, der auf beiden Kanälen mit zwei Hochfrequenzfeldern mit der Kontaktdauer τ_{CP} einstrahlt, wodurch die Spins festgehalten und energetisch gekoppelt werden. Für einen Magnetisierungstransfer müssen die Hartmann-Hahn Bedingung erfüllt wird^[262] (siehe Gleichung 6.14).

$$\gamma_{1H} B_{1,1H} = \gamma_{15N} B_{1,15N} \quad (6.14)$$

γ_{1H} = gyromagnetisches Verhältnis des ¹H-Atomkerns; γ_{15N} = gyromagnetisches Verhältnis des ¹⁵N-Atomkerns; $B_{1,1H}$ und $B_{1,15N}$ = Hochfrequenzfelder, mit denen im Protonen- und Stickstoffkanal eingestrahlt wird.

Da nur ein sehr schmales spektrales Fenster für die Erfüllung der Hartmann-Hahn Bedingung existiert, wird zusätzlich die RAMP-(CP)-Technik (*ramped-amplitude cross-polarisation*)^[263–265] angewendet. Während des Magnetisierungstransfers wird die Stärke des Magnetfeldes, welches auf den Protonenkanal eingestrahlt wird, durch eine monoton ansteigende Rampe von 80 % zeitlich gesteigert, wodurch die Wahrscheinlichkeit die Hartmann-Hahn Bedingung zu treffen, erhöht wird. Nach Abschalten des Kontaktpulses erfolgt die Detektion bei entkoppelten ¹H-Spins nach einem Echo-Puls, um die Effekte der heteronuklearen Dipol-Dipol-Kopplung auf die Linienbreite zu minimieren. Die entsprechende CP-RAMP-Pulssequenz^[265] der ¹⁵N-NMR-Experimente ist in Abbildung 64 gezeigt.

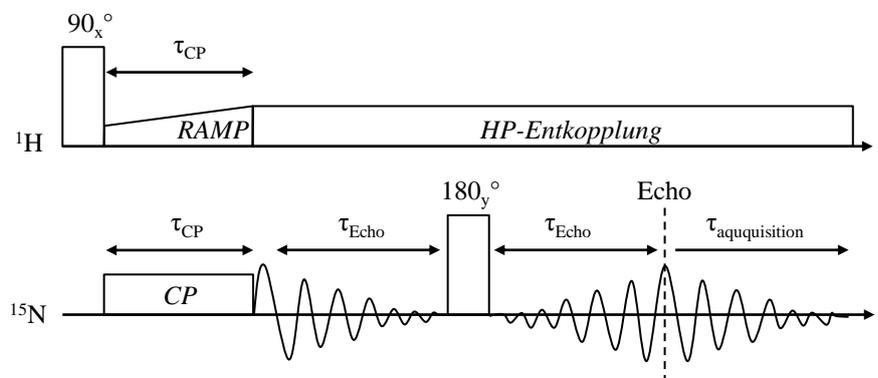


Abbildung 64 Kreuzpolarisations-Pulssequenz mit Rampe der ¹⁵N-NMR-Experimente

Durch einen 90°-Anregungspuls wird eine transversale Magnetisierung auf dem Protonenkanal erzeugt. Es wird ein Kontaktpuls auf beiden Kanälen nachgeschaltet, wodurch die Spins energetisch gekoppelt werden und Magnetisierung vom ¹H-Kern auf den ¹⁵N-Kern übertragen wird. Während des Magnetisierungstransfers wird die Magnetfeldstärke, welche auf den Protonenkanal einstrahlt wird, durch eine monoton ansteigende Rampe zeitlich gesteigert. Nach Abschalten des Kontaktpulses erfolgt die Detektion bei entkoppelten ¹H-Spins nach einem Echo-Puls. Abbildung verändert übernommen aus^[263–265].

Es wird eine Kontaktdauer τ_{CP} von 1 ms und eine Zeitspanne zweier aufeinanderfolgender Pulssequenzen von 6–8 s eingeräumt. Die ^1H -Pulslänge und die Hartmann-Hahn Bedingungen werden direkt an der Probe bestimmt und die Feldhomogenität an der Wasserlinie optimiert. Die ^{15}N -NMR-Spektren werden in der ^{15}N -Dimension auf 26,8 ppm für festes ^{15}N -markiertes Ammoniumsulfat referenziert, was einer Referenzierung auf 0 ppm für flüssigen Ammoniak entspricht ^[266]. Nach erfolgter Messung werden die Spektren indirekt über die ^1H -Dimension auf 4,7 ppm für H_2O bei 42 °C referenziert.

Literatur- und Quellenverzeichnis

- [1] L. Stryer; "Biochemie"; *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg, **1996**, 4. Auflage.
- [2] W. Müller-Esterl; "Biochemie"; *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg, **2011**, 2. Auflage.
- [3] K. A. Dill, S. Bromberg, K. Yue, K. M. Fiebig, D. P. Yee, P. D. Thomas, H. S. Chan; "Principles of protein folding - A perspective from simple exact models"; *Protein Sci*, **1995**, *4*, 561 - 602.
- [4] D. Voet, A. Beck-Sickinger, J. G. Voet, C. W. Pratt; "Lehrbuch der Biochemie"; *Wiley-VCH Verlag*, Weinheim, **2010**, 2. Auflage.
- [5] G. Blobel, B. Dobberstein; "Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma"; *J Cell Biol*, **1975**, *67*, 835 - 851.
- [6] J. P. Müller; "Export gefalteter Proteine - Tat-abhängige Proteintranslokation in Bakterien"; *Biospektrum*, **2002**, *4*, 360 - 364.
- [7] A. J. Driessen, N. Nouwen; "Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane"; *Annu Rev Biochem*, **2008**, *77*, 643 - 667.
- [8] A. M. Settles, A. Yonetani, A. Baron, D. R. Bush, K. Cline, R. Martienssen; "Sec-independent protein translocation by the maize Hcf106 protein"; *Science*, **1997**, *278*, 1467 - 1470.
- [9] T. Palmer, B. C. Berks; "Moving folded proteins across the bacterial cell membrane"; *Microbiology*, **2003**, *149*, 547 - 556.
- [10] P. Fekkes, A. J. Driessen; "Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane"; *Microbiol Mol Biol Rev*, **1999**, *63*, 161 - 173.
- [11] J. H. Weiner, P. T. Bilous, G. M. Shaw, S. P. Lubitz, L. Frost, G. H. Thomas, J. A. Cole, R. J. Turner; "A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins"; *Cell*, **1998**, *93*, 93 - 101.
- [12] B. C. Berks, T. Palmer, F. Sargent; "Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway"; *Curr Opin Microbiol*, **2005**, *8*, 174 - 181.
- [13] J. M. van Dijl, P. G. Braun, C. Robinson, W. J. Quax, H. Antelmann, M. Hecker, J. Müller, H. Tjalsma, S. Bron, J. D. Jongbloed; "Functional genomic analysis of the *Bacillus subtilis* Tat pathway for protein secretion"; *J Biotechnol*, **2002**, *98*, 243 - 254.
- [14] B. C. Berks, T. Palmer, F. Sargent; "The Tat protein translocation pathway and its role in microbial physiology"; *Adv Microb Physiol*, **2003**, *47*, 187 - 254.
- [15] M. Müller, R. B. Klösgen; "The Tat pathway in bacteria and chloroplasts (review)"; *Mol Membr Biol*, **2005**, *22*, 113 - 121.
- [16] B. C. Berks, F. Sargent, T. Palmer; "The Tat protein export pathway"; *Mol Microbiol*, **2000**, *35*, 260 - 274.
- [17] R. G. Gerlach, M. Hensel; "Protein secretion systems and adhesins the molecular armory of Gram-negative pathogens"; *Int J Med Microbiol*, **2007**, *297*, 401 - 415.
- [18] B. C. Berks; "The twin-arginine protein translocation pathway"; *Annu Rev Biochem*, **2014**, 843 - 864.
- [19] R. M. Mould, C. Robinson; "A proton gradient is required for the transport of two luminal oxygen-evolving proteins across the thylakoid membrane"; *J Biol Chem*, **1991**, *266*, 12189 - 12193.

- [20] E. G. Bogsch, F. Sargent, N. R. Stanley, B. C. Berks, C. Robinson, T. Palmer; "An essential component of a novel bacterial protein export system with homologues in plastids and mitochondria"; *J Biol Chem*, **1998**, *273*, 18003 - 18006.
- [21] F. Sargent, E. G. Bogsch, N. R. Stanley, M. Wexler, C. Robinson, B. C. Berks, T. Palmer; "Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway"; *EMBO J*, **1998**, *17*, 3640 - 3650.
- [22] G. W. Hutcheon, A. Bolhuis; "The archaeal twin-arginine translocation pathway"; *Biochem Soc Trans*, **2003**, *31*, 686 - 689.
- [23] W. Pett, D. V. Lavrov; "The twin-arginine subunit C in *Oscarella*: Origin, evolution, and potential functional significance"; *Integr Comp Biol*, **2013**, *53*, 495 - 502.
- [24] A. M. Chaddock, A. Mant, I. Karnauchov, S. Brink, R. G. Herrmann, R. B. Klösgen, C. Robinson; "A new type of signal peptide: Central role of a twin-arginine motif in transfer signals for the delta pH-dependent thylakoidal protein translocase"; *EMBO J*, **1995**, *14*, 2715 - 2722.
- [25] H. Mori, K. Cline; "A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid Δ pH / Tat translocase"; *J Cell Biol*, **2002**, *157*, 205 - 210.
- [26] M. P. DeLisa, D. Tullman, G. Georgiou; "Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin-arginine translocation pathway"; *Proc Natl Acad Sci USA*, **2003**, *100*, 6115 - 6120.
- [27] S. M. Musser, S. M. Theg; "Characterization of the early steps of OE17 precursor transport by the thylakoid Δ pH / Tat machinery"; *Eur J Biochem*, **2000**, *267*, 2588 - 2598.
- [28] C. F. Matos, C. Robinson, A. Di Cola; "The Tat system proofreads FeS protein substrates and directly initiates the disposal of rejected molecules"; *EMBO J*, **2008**, *27*, 2055 - 2063.
- [29] A. Rodrigue, A. Chanal, K. Beck, M. Müller, L. F. Wu; "Co-translocation of a periplasmic enzyme complex by a hitchhiker mechanism through the bacterial Tat pathway"; *J Biol Chem*, **1999**, *274*, 13223 - 13228.
- [30] C. Sanders, N. Wethkamp, H. Lill; "Transport of cytochrome c derivatives by the bacterial Tat protein translocation system"; *Mol Microbiol*, **2001**, *41*, 241 - 246.
- [31] E. de Buck, L. Vranckx, E. Meyen, L. Maes, L. Vandersmissen, J. Anné, E. Lammertyn; "The twin-arginine translocation pathway is necessary for correct membrane insertion of the Rieske Fe / S protein in *Legionella pneumophila*"; *FEBS Lett*, **2007**, *581*, 259 - 264.
- [32] J. Bachmann, B. Bauer, K. Zwicker, B. Ludwig, O. Anderka; "The Rieske protein from *Paracoccus denitrificans* is inserted into the cytoplasmic membrane by the twin-arginine translocase"; *FEBS J*, **2006**, *273*, 4817 - 4830.
- [33] S. Meloni, L. Rey, S. Sidler, J. Imperial, T. Ruiz-Argüeso, J. M. Palacios; "The twin-arginine translocation (Tat) system is essential for *Rhizobium-legume* symbiosis"; *Mol Microbiol*, **2003**, *48*, 1195 - 1207.
- [34] B. S. Pickering, I. J. Oresnik; "The twin arginine transport system appears to be essential for viability in *Sinorhizobium meliloti*"; *J Bacteriol*, **2010**, *192*, 5173 - 5180.
- [35] A. M. Albinia, J. Baglieri, C. Robinson; "Targeting of lumenal proteins across the thylakoid membrane"; *J Exp Bot*, **2012**, *63*, 1689 - 1698.

- [36] S. Molik, I. Karnauchoy, C. Weidlich, R. G. Herrmann, R. B. Klösgen; "The Rieske Fe/S protein of the cytochrome b6 / f complex in chloroplasts missing link in the evolution of protein transport pathways in chloroplasts?"; *J Biol Chem*, **2001**, 276, 42761 - 42766.
- [37] N. R. Stanley, K. Findlay, B. C. Berks, T. Palmer; "Escherichia coli strains blocked in Tat-dependent protein export exhibit pleiotropic defects in the cell envelope"; *J Bacteriol*, **2001**, 183, 139 - 144.
- [38] U. A. Ochsner, A. Snyder, A. I. Vasil, M. L. Vasil; "Effects of the twin-arginine translocase on secretion of virulence factors, stress response, and pathogenesis"; *Proc Natl Acad Sci USA*, **2002**, 99, 8312 - 8317.
- [39] Z. Ding, P. J. Christie; "Agrobacterium tumefaciens twin-arginine-dependent translocation is important for virulence, flagellation, and chemotaxis but not type IV secretion"; *J Bacteriol*, **2003**, 185, 760 - 771.
- [40] B. Ize, N. R. Stanley, G. Buchanan, T. Palmer; "Role of the Escherichia coli Tat pathway in outer membrane integrity"; *Mol Microbiol*, **2003**, 48, 1183 - 1193.
- [41] N. R. Stanley, T. Palmer, B. C. Berks; "The twin arginine consensus motif of Tat signal peptides is involved in Sec-independent protein targeting in Escherichia coli"; *J Biol Chem*, **2000**, 275, 11591 - 11596.
- [42] T. G. Bernhardt, de Boer, P. A.; "The Escherichia coli amidase AmiC is a periplasmic septal ring component exported via the twin-arginine transport pathway"; *Mol Microbiol*, **2003**, 48, 1171 - 1182.
- [43] E. de Buck, E. Lammertyn, J. Anné; "The importance of the twin-arginine translocation pathway for bacterial virulence"; *Trends Microbiol*, **2008**, 16, 442 - 453.
- [44] N. Pradel, C. Ye, V. Livrelli, J. Xu, B. Joly, L. F. Wu; "Contribution of the twin arginine translocation system to the virulence of enterohemorrhagic Escherichia coli O157 : H7"; *Infect Immun*, **2003**, 71, 4908 - 4916.
- [45] T. Palmer, B. C. Berks; "The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway"; *Nat Rev Microbiol*, **2012**, 10, 483 - 496.
- [46] K. Cline, M. McCaffery; "Evidence for a dynamic and transient pathway through the TAT protein transport machinery"; *EMBO J*, **2007**, 26, 3039 - 3049.
- [47] R. W. Rose, T. Brüser, J. C. Kissinger, M. Pohlschröder; "Adaptation of protein secretion to extremely high-salt conditions by extensive use of the twin-arginine translocation pathway"; *Mol Microbiol*, **2002**, 45, 943 - 950.
- [48] K. Dilks, R. W. Rose, E. Hartmann, M. Pohlschröder; "Prokaryotic utilization of the twin-arginine translocation pathway: A genomic survey"; *J Bacteriol*, **2003**, 185, 1478 - 1483.
- [49] D. A. Widdick, K. Dilks, G. Chandra, A. Bottrill, M. Naldrett, M. Pohlschröder, T. Palmer; "The twin-arginine translocation pathway is a major route of protein export in Streptomyces coelicolor"; *Proc Natl Acad Sci USA*, **2006**, 103, 17927 - 17932.
- [50] M. V. Joshi, S. G. Mann, H. Antelmann, D. A. Widdick, J. K. Fyans, G. Chandra, M. I. Hutchings, I. Toth, M. Hecker, R. Loria, T. Palmer; "The twin arginine protein transport pathway exports multiple virulence proteins in the plant pathogen Streptomyces scabies"; *Mol Microbiol*, **2010**, 77, 252 - 271.
- [51] A. Bolhuis; "Protein transport in the halophilic archaeon Halobacterium sp. NRC-1: A major role for the twin-arginine translocation pathway?"; *Microbiology*, **2002**, 148, 3335 - 3346.

- [52] M. Pohlschröder, M. I. Giménez, K. F. Jarrell; "Protein transport in Archaea: Sec and twin arginine translocation pathways"; *Curr Opin Microbiol*, **2005**, 8, 713 - 719.
- [53] F. Sargent, N. R. Stanley, B. C. Berks, T. Palmer; "Sec-independent protein translocation in Escherichia coli: A distinct and pivotal role for the TatB protein"; *J Biol Chem*, **1999**, 274, 36073 - 36082.
- [54] S. Tottey, K. J. Waldron, S. J. Firbank, B. Reale, C. Bessant, K. Sato, T. R. Cheek, J. Gray, M. J. Banfield, C. Dennison, N. J. Robinson; "Protein-folding location can regulate manganese-binding versus copper- or zinc-binding"; *Nature*, **2008**, 455, 1138 - 1142.
- [55] C. Ranquet, S. Ollagnier-de-Choudens, L. Loiseau, F. Barras, M. Fontecave; "Cobalt stress in Escherichia coli. The effect on the iron-sulfur proteins"; *J Biol Chem*, **2007**, 282, 30442 - 30451.
- [56] B. C. Berks; "A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors?"; *Mol Microbiol*, **1996**, 22, 393 - 404.
- [57] R. J. Turner, A. L. Papish, F. Sargent; "Sequence analysis of bacterial redox enzyme maturation proteins (REMPs)"; *Can J Microbiol*, **2004**, 50, 225 - 238.
- [58] I. J. Oresnik, C. L. Ladner, R. J. Turner; "Identification of a twin-arginine leader-binding protein"; *Mol Microbiol*, **2001**, 40, 323 - 331.
- [59] J. Pommier, V. Méjean, G. Giordano, C. Iobbi-Nivol; "TorD, a cytoplasmic chaperone that interacts with the unfolded trimethylamine N-oxide reductase enzyme (TorA) in Escherichia coli"; *J Biol Chem*, **1998**, 273, 16615 - 16620.
- [60] K. Hatzixanthis, T. A. Clarke, A. Oubrie, D. J. Richardson, R. J. Turner, F. Sargent; "Signal peptide-chaperone interactions on the twin-arginine protein transport pathway"; *Proc Natl Acad Sci USA*, **2005**, 102, 8460 - 8465.
- [61] S.-Y. Li, B.-Y. Chang, S.-C. Lin; "Coexpression of TorD enhances the transport of GFP via the TAT pathway"; *J Biotechnol*, **2006**, 122, 412 - 421.
- [62] R. L. Jack, G. Buchanan, A. Dubini, K. Hatzixanthis, T. Palmer, F. Sargent; "Coordinating assembly and export of complex bacterial proteins"; *EMBO J*, **2004**, 23, 3962 - 3972.
- [63] D. Sambasivarao, R. J. Turner, J. L. Simala-Grant, G. Shaw, J. Hu, J. H. Weiner; "Multiple roles for the twin arginine leader sequence of dimethyl sulfoxide reductase of Escherichia coli"; *J Biol Chem*, **2000**, 275, 22526 - 22531.
- [64] F. M. A. Valente, P. M. Pereira, S. S. Venceslau, M. Regalla, A. V. Coelho, I. A. C. Pereira; "The [NiFeSe] hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough is a bacterial lipoprotein lacking a typical lipoprotein signal peptide"; *FEBS Lett*, **2007**, 581, 3341 - 3344.
- [65] A. Dubini, F. Sargent; "Assembly of Tat-dependent [NiFe] hydrogenases identification of precursor-binding accessory proteins"; *FEBS Lett*, **2003**, 549, 141 - 146.
- [66] K. Schaerlaekens, E. Lammertyn, N. Geukens, S. de Keersmaecker, J. Anné, L. van Mellaert; "Comparison of the Sec and Tat secretion pathways for heterologous protein production by *Streptomyces lividans*"; *J Biotechnol*, **2004**, 112, 279 - 288.
- [67] M. A. Kolkman, R. van der Ploeg, M. Bertels, M. van Dijk, J. van der Laan, J. M. van Dijl, E. Ferrari; "The twin-arginine signal peptide of *Bacillus subtilis* YwbN can direct either Tat- or Sec-dependent secretion of different cargo proteins: Secretion of active subtilisin via the *B. subtilis* Tat pathway"; *Environ Microbiol*, **2008**, 74, 7507 - 7513.

- [68] D. G. Kang, G.-B. Lim, H. J. Cha; "Functional periplasmic secretion of organophosphorous hydrolase using the twin-arginine translocation pathway in *Escherichia coli*"; *J Biotechnol*, **2005**, *118*, 379 - 385.
- [69] R. Gerlach, O. Pop, J. P. Müller; "Tat dependent export of *E. coli* phytase AppA by using the PhoD-specific transport system of *Bacillus subtilis*"; *J Basic Microbiol*, **2004**, *44*, 351 - 359.
- [70] L. Zhang, Z. Zhu, H. Jing, J. Zhang, Y. Xiong, M. Yan, S. Gao, L. F. Wu, J. Xu, B. Kan; "Pleiotropic effects of the twin-arginine translocation system on biofilm formation, colonization, and virulence in *Vibrio cholerae*"; *BMC Microbiol*, **2009**, *9*, 114.
- [71] M. Lavander, S. K. Ericsson, J. E. Bröms, A. Forsberg; "Twin arginine translocation in *Yersinia*"; *Adv Exp Med Biol*, **2007**, *603*, 258 - 267.
- [72] R. Voulhoux, G. Ball, B. Ize, M. L. Vasil, A. Lazdunski, L. F. Wu, A. Filloux; "Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway"; *EMBO J*, **2001**, *20*, 6735 - 6741.
- [73] J. W. Izard, D. A. Kendall; "Signal peptides: Exquisitely designed transport promoters"; *Mol Microbiol*, **1994**, *13*, 765 - 773.
- [74] G. von Heijne; "Signal sequences. The limits of variation"; *J Mol Biol*, **1985**, *184*, 99 - 105.
- [75] G. von Heijne; "The signal peptide"; *J Membr Biol*, **1990**, *115*, 195 - 201.
- [76] U. K. Bageshwar, N. Whitaker, F.-C. Liang, S. M. Musser; "Interconvertibility of lipid- and translocon-bound forms of the bacterial Tat precursor pre-Sufl"; *Mol Microbiol*, **2009**, *74*, 209 - 226.
- [77] A. Shanmugham, H. W. Wong Fong Sang, Y. J. Bollen, H. Lill; "Membrane binding of twin arginine preproteins as an early step in translocation"; *Biochemistry*, **2006**, *45*, 2243 - 2249.
- [78] M. J. Klein, S. L. Grage, C. Muhle-Goll, J. Bürck, S. Afonin, A. S. Ulrich; "Structure analysis of the membrane-bound PhoD signal peptide of the Tat translocase shows an N-terminal amphiphilic helix"; *Biochim Biophys Acta*, **2012**, *1818*, 3025 - 3031.
- [79] G. J. de Vrije, A. M. Batenburg, J. A. Killian, B. de Kruijff; "Lipid involvement in protein translocation in *Escherichia coli*"; *Mol Microbiol*, **1990**, *4*, 143 - 150.
- [80] G. Buchanan, F. Sargent, B. C. Berks, T. Palmer; "A genetic screen for suppressors of *Escherichia coli* Tat signal peptide mutations establishes a critical role for the second arginine within the twin-arginine motif"; *Arch Microbiol*, **2001**, *177*, 107 - 112.
- [81] D. Halbig, T. Wiegert, N. Blaudeck, R. Freudl, G. A. Sprenger; "The efficient export of NADP-containing glucose-fructose oxidoreductase to the periplasm of *Zymomonas mobilis* depends both on an intact twin-arginine motif in the signal peptide and on the generation of a structural export signal induced by cofactor binding"; *Eur J Biochem*, **1999**, *263*, 543 - 551.
- [82] S. Cristóbal, de Gier, J. W., H. Nielsen, G. von Heijne; "Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in *Escherichia coli*"; *EMBO J*, **1999**, *18*, 2982 - 2990.
- [83] G. von Heijne; "How signal sequences maintain cleavage specificity"; *J Mol Biol*, **1984**, *173*, 243 - 251.
- [84] H. Tjalsma, A. Bolhuis, J. D. Jongbloed, S. Bron, J. M. van Dijk; "Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: A genome-based survey of the secretome"; *Microbiol Mol Biol Rev*, **2000**, *64*, 515 - 547.
- [85] T. Palmer, F. Sargent, B. C. Berks; "Export of complex cofactor-containing proteins by the bacterial Tat pathway"; *Trends Microbiol*, **2005**, *13*, 175 - 180.

- [86] H. Mori, E. J. Summer, X. Ma, K. Cline; "Component specificity for the thylakoidal Sec and Δ pH-dependent protein transport pathways"; *J Cell Biol*, **1999**, *146*, 45 - 56.
- [87] H. Mori, E. J. Summer, K. Cline; "Chloroplast TatC plays a direct role in thylakoid Δ pH-dependent protein transport"; *FEBS Lett*, **2001**, *501*, 65 - 68.
- [88] M. R. Yen, Y. H. Tseng, E. H. Nguyen, L. F. Wu, M. H. Saier Jr.; "Sequence and phylogenetic analyses of the twin-arginine targeting (Tat) protein export system"; *Arch Microbiol*, **2002**, *177*, 441 - 450.
- [89] R. L. Jack, F. Sargent, B. C. Berks, G. Sawers, T. Palmer; "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*, 1801 - 1804.
- [90] J. Baglieri, D. Beck, N. Vasisht, C. J. Smith, C. Robinson; "Structure of TatA paralog, TatE, suggests a structurally homogeneous form of Tat protein translocase that transports folded proteins of differing diameter"; *J Biol Chem*, **2012**, *287*, 7335 - 7344.
- [91] A. Chanal, C. Santini, L. Wu; "Potential receptor function of three homologous components, TatA, TatB and TatE, of the twin-arginine signal sequence-dependent metalloenzyme translocation pathway in Escherichia coli"; *Mol Microbiol*, **1998**, *30*, 674 - 676.
- [92] M. Wexler, F. Sargent, R. L. Jack, N. R. Stanley, E. G. Bogsch, C. Robinson, B. C. Berks, T. Palmer; "TatD is a cytoplasmic protein with DNase activity. No requirement for TatD family proteins in Sec-independent protein export"; *J Biol Chem*, **2000**, *275*, 16717 - 16722.
- [93] J. Qiu, J.-H. Yoon, B. Shen; "Search for apoptotic nucleases in yeast: Role of Tat-D nuclease in apoptotic DNA degradation"; *J Biol Chem*, **2005**, *280*, 15370 - 15379.
- [94] R. C. Centore, R. Lestini, S. J. Sandler; "XthA (exonuclease III) regulates loading of RecA onto DNA substrates in log phase Escherichia coli cells"; *Mol Microbiol*, **2008**, *67*, 88 - 101.
- [95] C. F. Matos, A. Di Cola, C. Robinson; "TatD is a central component of a Tat translocon-initiated quality control system for exported FeS proteins in Escherichia coli"; *EMBO reports*, **2009**, *10*, 474 - 479.
- [96] U. Lindenstrauss, C. F. Matos, W. Graubner, C. Robinson, T. Brüser; "Malformed recombinant Tat substrates are Tat-independently degraded in Escherichia coli"; *FEBS Lett*, **2010**, *584*, 3644 - 3648.
- [97] R. Freudl; "Leaving home ain't easy: Protein export systems in Gram-positive bacteria"; *Res Microbiol*, **2013**, *164*, 664 - 674.
- [98] O. Pop, U. Martin, C. Abel, J. P. Müller; "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*, 3268 - 3273.
- [99] J. D. Jongbloed, U. Grieger, H. Antelmann, M. Hecker, R. Nijland, S. Bron, J. M. van Dijl; "Two minimal Tat translocases in Bacillus"; *Mol Microbiol*, **2004**, *54*, 1319 - 1325.
- [100] L. F. Wu, B. Ize, A. Chanal, Y. Quentin, G. Fichant; "Bacterial twin-arginine signal peptide-dependent protein translocation pathway: Evolution and mechanism"; *J Mol Microbiol Biotechnol*, **2000**, *2*, 179 - 189.
- [101] J. D. Jongbloed, R. van der Ploeg, J. M. van Dijl; "Bifunctional TatA subunits in minimal Tat protein translocases"; *Trends Microbiol*, **2006**, *14*, 2 - 4.

- [102] J. P. Barnett, R. T. Eijlander, O. P. Kuipers, C. Robinson; "A minimal Tat system from a Gram-positive organism: A bifunctional TatA subunit participates in discrete TatAC and TatA complexes"; *J Biol Chem*, **2008**, *283*, 2534 - 2542.
- [103] R. T. Eijlander, M. A. Kolbusz, E. M. Berendsen, O. P. Kuipers; "Effects of altered TatC proteins on protein secretion efficiency via the twin-arginine translocation pathway of *Bacillus subtilis*"; *Microbiology*, **2009**, *155*, 1776 - 1785.
- [104] N. Blaudeck, P. Kreutzenbeck, M. Müller, G. A. Sprenger, R. Freudl; "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*, 3426 - 3432.
- [105] M. G. Hicks, E. de Leeuw, I. Porcelli, G. Buchanan, B. C. Berks, T. Palmer; "The *Escherichia coli* twin-arginine translocase: Conserved residues of TatA and TatB family components involved in protein transport"; *FEBS Lett*, **2003**, *539*, 61 - 67.
- [106] Y. Hu, E. Zhao, H. Li, B. Xia, C. Jin; "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*, 15942 - 15944.
- [107] F. Rodriguez, S. L. Rouse, C. E. Tait, J. Harmer, A. de Riso, C. R. Timmel, M. S. Sansom, B. C. Berks, J. R. Schnell; "Structural model for the protein-translocating element of the twin-arginine transport system"; *Proc Natl Acad Sci USA*, **2013**, *110*, E1092 - 101.
- [108] I. Porcelli, E. de Leeuw, R. Wallis, E. van den Brink-van der Laan, B. de Kruijff, B. A. Wallace, T. Palmer, B. C. Berks; "Characterization and membrane assembly of the TatA component of the *Escherichia coli* twin-arginine protein transport system"; *Biochemistry*, **2002**, *41*, 13690 - 13697.
- [109] J. Fröbel, P. Rose, M. Müller; "Twin-arginine-dependent translocation of folded proteins"; *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci*, **2012**, *367*, 1029 - 1046.
- [110] P. A. Lee, G. Buchanan, N. R. Stanley, B. C. Berks, T. Palmer; "Truncation analysis of TatA and TatB defines the minimal functional units required for protein translocation"; *J Bacteriol*, **2002**, *184*, 5871 - 5879.
- [111] P. A. Lee, D. Tullman-Ercek, G. Georgiou; "The bacterial twin-arginine translocation pathway"; *Annu Rev Microbiol*, **2006**, *60*, 373 - 395.
- [112] N. P. Greene, I. Porcelli, G. Buchanan, M. G. Hicks, S. M. Schermann, T. Palmer, B. C. Berks; "Cysteine scanning mutagenesis and disulfide mapping studies of the TatA component of the bacterial twin arginine translocase"; *J Biol Chem*, **2007**, *282*, 23937 - 23945.
- [113] M. G. Hicks, P. A. Lee, G. Georgiou, B. C. Berks, T. Palmer; "Positive selection for loss-of-function tat mutations identifies critical residues required for TatA activity"; *J Bacteriol*, **2005**, *187*, 2920 - 2925.
- [114] C. M. Barrett, J. E. Mathers, C. Robinson; "Identification of key regions within the *Escherichia coli* TatAB subunits"; *FEBS Lett*, **2003**, *537*, 42 - 46.
- [115] P. A. Lee, G. L. Orriss, G. Buchanan, N. P. Greene, P. J. Bond, C. Punginelli, R. L. Jack, M. S. P. Sansom, B. C. Berks, T. Palmer; "Cysteine-scanning mutagenesis and disulfide mapping studies of the conserved domain of the twin-arginine translocase TatB component"; *J Biol Chem*, **2006**, *281*, 34072 - 34085.

- [116] S. Koch, M. J. Fritsch, G. Buchanan, T. Palmer; "Escherichia coli TatA and TatB proteins have N-out, C-in topology in intact cells"; *J Biol Chem*, **2012**, *287*, 14420 - 14431.
- [117] C. Aldridge, A. Storm, K. Cline, C. Dabney-Smith; "The chloroplast twin arginine transport (Tat) component, Tha4, undergoes conformational changes leading to Tat protein transport"; *J Biol Chem*, **2012**, *287*, 34752 - 34763.
- [118] L. G. Stevenson, K. Strisovsky, K. M. Clemmer, S. Bhatt, M. Freeman, P. N. Rather; "Rhomboid protease AarA mediates quorum-sensing in *Providencia stuartii* by activating TatA of the twin-arginine translocase"; *Proc Natl Acad Sci USA*, **2007**, *104*, 1003 - 1008.
- [119] C. S. Chan, M. R. Zlomislic, D. P. Tieleman, R. J. Turner; "The TatA subunit of *Escherichia coli* twin-arginine translocase has an N-in topology"; *Biochemistry*, **2007**, *46*, 7396 - 7404.
- [120] K. Gouffi, F. Gérard, C. L. Santini, L. F. Wu; "Dual topology of the *Escherichia coli* TatA protein"; *J Biol Chem*, **2004**, *279*, 11608 - 11615.
- [121] K. Gouffi, C. L. Santini, L. F. Wu; "Topology determination and functional analysis of the *Escherichia coli* TatC protein"; *FEBS Lett*, **2002**, *525*, 65 - 70.
- [122] C. Punginelli, B. Maldonado, S. Grahl, R. Jack, M. Alami, J. Schröder, B. C. Berks, T. Palmer; "Cysteine scanning mutagenesis and topological mapping of the *Escherichia coli* twin-arginine translocase TatC component"; *J Bacteriol*, **2007**, *189*, 5482 - 5494.
- [123] J. Behrendt, K. Standar, U. Lindenstrauss, T. Brüser; "Topological studies on the twin-arginine translocase component TatC"; *FEMS Microbiol Lett*, **2004**, *234*, 303 - 308.
- [124] K. J. Jeong, Y. Kawarasaki, J. Gam, B. R. Harvey, B. L. Iverson, G. Georgiou; "A periplasmic fluorescent reporter protein and its application in high-throughput membrane protein topology analysis"; *J Mol Biol*, **2004**, *341*, 901 - 909.
- [125] D. Drew, D. Sjöstrand, J. Nilsson, T. Urbig, C. N. Chin, J. W. de Gier, G. von Heijne; "Rapid topology mapping of *Escherichia coli* inner-membrane proteins by prediction and PhoA / GFP fusion analysis"; *Proc Natl Acad Sci USA*, **2002**, *99*, 2690 - 2695.
- [126] C. Lange, S. Müller, T. H. Walther, J. Bürck, A. S. Ulrich; "Structure analysis of the protein translocating channel TatA in membranes using a multi-construct approach"; *Biochim Biophys Acta*, **2007**, *1768*, 2627 - 2634.
- [127] T. H. Walther, S. L. Grage, N. Roth, A. S. Ulrich; "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*, 15945 - 15956.
- [128] Y. Zhang, L. Wang, Y. Hu, C. Jin; "Solution structure of the TatB component of the twin-arginine translocation system"; *Biochim Biophys Acta*, **2014**, *1838*, 1881 - 1888.
- [129] S. E. Rollauer, M. J. Tarry, J. E. Graham, M. Jääskeläinen, F. Jäger, S. Johnson, M. Krehenbrink, S. M. Liu, M. J. Lukey, J. Marcoux, M. A. McDowell, F. Rodriguez, P. Roversi, P. J. Stansfeld, C. V. Robinson, M. S. Sansom, T. Palmer, M. Högbom, B. C. Berks, S. M. Lea; "Structure of the TatC core of the twin-arginine protein transport system"; *Nature*, **2012**, *492*, 210 - 214.
- [130] S. Ramasamy, R. Abrol, C. J. Suloway, W. M. Clemons Jr.; "The glove-like structure of the conserved membrane protein TatC provides insight into signal sequence recognition in twin-arginine translocation"; *Structure*, **2013**, *21*, 777 - 788.

- [131] S. C. Allen, C. M. Barrett, N. Ray, C. Robinson; "Essential cytoplasmic domains in the Escherichia coli TatC protein"; *J Biol Chem*, **2002**, *277*, 10362 - 10366.
- [132] G. Buchanan, E. de Leeuw, N. R. Stanley, M. Wexler, B. C. Berks, F. Sargent, T. Palmer; "Functional complexity of the twin-arginine translocase TatC component revealed by site-directed mutagenesis"; *Mol Microbiol*, **2002**, *43*, 1457 - 1470.
- [133] C. M. L. Barrett, D. Mangels, C. Robinson; "Mutations in subunits of the Escherichia coli twin-arginine translocase block function via differing effects on translocation activity or Tat complex structure"; *J Mol Biol*, **2005**, *347*, 453 - 463.
- [134] E. Holzapfel, G. Eisner, M. Alami, C. M. Barrett, G. Buchanan, I. Lüke, J. M. Betton, C. Robinson, T. Palmer, M. Moser, M. Müller; "The entire N-terminal half of TatC is involved in twin-arginine precursor binding"; *Biochemistry*, **2007**, *46*, 2892 - 2898.
- [135] M. Alami, I. Luke, S. Deitermann, G. Eisner, H. G. Koch, J. Brunner, M. Müller; "Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in Escherichia coli"; *Mol Cell*, **2003**, *12*, 937 - 946.
- [136] K. Cline, H. Mori; "Thylakoid Δ pH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport"; *J Cell Biol*, **2001**, *154*, 719 - 729.
- [137] F. Lausberg, S. Fleckenstein, P. Kreutzenbeck, J. Frobel, P. Rose, M. Müller, R. Freudl; "Genetic evidence for a tight cooperation of TatB and TatC during productive recognition of twin-arginine (Tat) signal peptides in Escherichia coli"; *PloS one*, **2012**, *7*, e39867.
- [138] P. Kreutzenbeck, C. Kröger, F. Lausberg, N. Blaudeck, G. A. Sprenger, R. Freudl; "Escherichia coli twin arginine (Tat) mutant translocases possessing relaxed signal peptide recognition specificities"; *J Biol Chem*, **2007**, *282*, 7903 - 7911.
- [139] E. M. Strauch, G. Georgiou; "Escherichia coli tatC mutations that suppress defective twin-arginine transporter signal peptides"; *J Mol Biol*, **2007**, *374*, 283 - 291.
- [140] H. Kneuper, B. Maldonado, F. Jäger, M. Krehenbrink, G. Buchanan, R. Keller, M. Müller, B. C. Berks, T. Palmer; "Molecular dissection of TatC defines critical regions essential for protein transport and a TatB-TatC contact site"; *Mol Microbiol*, **2012**, *85*, 945 - 961.
- [141] S. Zoufaly, J. Fröbel, P. Rose, T. Flecken, C. Maurer, M. Moser, M. Müller; "Mapping precursor-binding site on TatC subunit of twin arginine-specific protein translocase by site-specific photo cross-linking"; *J Biol Chem*, **2012**, *287*, 13430 - 13441.
- [142] X. Ma, K. Cline; "Mapping the signal peptide binding and oligomer contact sites of the core subunit of the pea twin arginine protein translocase"; *Plant Cell*, **2013**, *25*, 999 - 1015.
- [143] C. M. L. Barrett, C. Robinson; "Evidence for interactions between domains of TatA and TatB from mutagenesis of the TatABC subunits of the twin-arginine translocase"; *FEBS J*, **2005**, *272*, 2261 - 2275.
- [144] J. Oates, C. M. Barrett, J. P. Barnett, K. G. Byrne, A. Bolhuis, C. Robinson; "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*, 295 - 305.
- [145] A. Bolhuis, J. E. Mathers, J. D. Thomas, C. M. Barrett, C. Robinson; "TatB and TatC form a functional and structural unit of the twin-arginine translocase from Escherichia coli"; *J Biol Chem*, **2001**, *276*, 20213 - 20219.

- [146] G. L. Orriss, M. J. Tarry, B. Ize, F. Sargent, S. M. Lea, T. Palmer, B. C. Berks; "TatBC, TatB, and TatC form structurally autonomous units within the twin arginine protein transport system of *Escherichia coli*"; *FEBS Lett*, **2007**, *581*, 4091 - 4097.
- [147] F. Gérard, K. Cline; "Efficient twin arginine translocation (Tat) pathway transport of a precursor protein covalently anchored to its initial cpTatC binding site"; *J Biol Chem*, **2006**, *281*, 6130 - 6135.
- [148] H. Kneuper, B. Maldonado, F. Jäger, M. Krehenbrink, G. Buchanan, R. Keller, M. Müller, B. C. Berks, T. Palmer; "Molecular dissection of TatC defines critical regions essential for protein transport and a TatB-TatC contact site"; *Mol Microbiol*, **2012**, *85*, 945 - 961.
- [149] M. J. Tarry, E. Schäfer, S. Chen, G. Buchanan, N. P. Greene, S. M. Lea, T. Palmer, H. R. Saibil, B. C. Berks; "Structural analysis of substrate binding by the TatBC component of the twin-arginine protein transport system"; *Proc Natl Acad Sci USA*, **2009**, *106*, 13284 - 13289.
- [150] F. Sargent, U. Gohlke, E. de Leeuw, N. R. Stanley, T. Palmer, H. R. Saibil, B. C. Berks; "Purified components of the *Escherichia coli* Tat protein transport system form a double-layered ring structure"; *Eur J Biochem*, **2001**, *268*, 3361 - 3367.
- [151] U. Gohlke, L. Pullan, C. A. McDevitt, I. Porcelli, E. de Leeuw, T. Palmer, H. R. Saibil, B. C. Berks; "The TatA component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter"; *Proc Natl Acad Sci USA*, **2005**, *102*, 10482 - 10486.
- [152] C. Gottselig; "Struktur- und Funktionsuntersuchungen der Tat-abhängigen Translokase aus *Bacillus Subtilis*"; *Dissertation*, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe, **2014**.
- [153] D. Beck, N. Vasisht, J. Baglieri, C. G. Monteferrante, van Dijn, J. M., C. Robinson, C. J. Smith; "Ultrastructural characterisation of *Bacillus subtilis* TatA complexes suggests they are too small to form homooligomeric translocation pores"; *Biochim Biophys Acta*, **2013**, *1833*, 1811 - 1819.
- [154] M. C. Leake, N. P. Greene, R. M. Godun, T. Granjon, G. Buchanan, S. Chen, R. M. Berry, T. Palmer, B. C. Berks; "Variable stoichiometry of the TatA component of the twin-arginine protein transport system observed by in vivo single-molecule imaging"; *Proc Natl Acad Sci USA*, **2008**, *105*, 15376 - 15381.
- [155] E. de Leeuw, I. Porcelli, F. Sargent, T. Palmer, B. C. Berks; "Membrane interactions and self-association of the TatA and TatB components of the twin-arginine translocation pathway"; *FEBS Lett*, **2001**, *506*, 143 - 148.
- [156] O. I. Pop, M. Westermann, R. Volkmer-Engert, D. Schulz, C. Lemke, S. Schreiber, R. Gerlach, R. Wetzker, J. P. Müller; "Sequence-specific binding of prePhoD to soluble TatAd indicates protein-mediated targeting of the Tat export in *Bacillus subtilis*"; *J Biol Chem*, **2003**, *278*, 38428 - 38436.
- [157] F. Berthelmann, D. Mehner, S. Richter, U. Lindenstrauß, H. Lünsdorf, G. Hause, T. Brüser; "Recombinant expression of tatABC and tatAC results in the formation of interacting cytoplasmic TatA tubes in *Escherichia coli*"; *J Biol Chem*, **2008**, *283*, 25281 - 25289.
- [158] S. de Keersmaecker, L. van Mellaert, K. Schaerlaekens, W. van Dessel, K. Vrancken, E. Lammertyn, J. Anné, N. Geukens; "Structural organization of the twin-arginine translocation system in *Streptomyces lividans*"; *FEBS Lett*, **2005**, *579*, 797 - 802.
- [159] K. Dilks, M. I. Giménez, M. Pohlschröder; "Genetic and biochemical analysis of the twin-arginine translocation pathway in halophilic archaea"; *J Bacteriol*, **2005**, *187*, 8104 - 8113.

- [160] S. Frielingsdorf, M. Jakob, R. B. Klösigen; "A stromal pool of TatA promotes Tat-dependent protein transport across the thylakoid membrane"; *J Biol Chem*, **2008**, *283*, 33838 - 33845.
- [161] M. Westermann, O. I. Pop, R. Gerlach, T. R. Appel, W. Schlörmann, S. Schreiber, J. P. Müller; "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*, 443 - 451.
- [162] S. Schreiber, R. Stengel, M. Westermann, R. Volkmer-Engert, O. I. Pop, J. P. Müller; "Affinity of TatCd for TatAd elucidates its receptor function in the Bacillus subtilis twin arginine translocation (Tat) translocase system"; *J Biol Chem*, **2006**, *281*, 19977 - 19984.
- [163] S. de Keersmaecker, K. Vrancken, L. van Mellaert, J. Anné, N. Geukens; "The Tat pathway in Streptomyces lividans: Interaction of Tat subunits and their role in translocation"; *Microbiology*, **2007**, *153*, 1087 - 1094.
- [164] J. Taubert, B. Hou, H. J. Risselada, D. Mehner, H. Lünsdorf, H. Grubmüller, T. Brüser; "TatBC-independent TAtA / Tat substrate interactions contribute to transport efficiency"; *PloS one*, **2015**, *10*, e0119761.
- [165] K. Cline, W. F. Ettinger, S. M. Theg; "Protein-specific energy requirements for protein transport across or into thylakoid membranes"; *J Biol Chem*, **1992**, *267*, 2688 - 2696.
- [166] T. L. Yahr, W. T. Wickner; "Functional reconstitution of bacterial Tat translocation in vitro"; *EMBO J*, **2001**, *20*, 2472 - 2479.
- [167] C. Dabney-Smith, H. Mori, K. Cline; "Oligomers of Tha4 organize at the thylakoid Tat translocase during protein transport"; *J Biol Chem*, **2006**, *281*, 5476 - 5483.
- [168] C. Dabney-Smith, K. Cline; "Clustering of C-terminal stromal domains of Tha4 homo-oligomers during translocation by the Tat protein transport system"; *Mol Biol Cell*, **2009**, *20*, 2060 - 2069.
- [169] X. Ma; "Precursors bind to specific sites on thylakoid membranes prior to transport on the delta pH protein translocation system"; *J Biochem*, **2000**, *275*, 10016 - 10022.
- [170] M. Alami, D. Trescher, L. F. Wu, M. Müller; "Separate analysis of twin-arginine translocation (Tat)-specific membrane binding and translocation in Escherichia coli"; *J Biol Chem*, **2002**, *277*, 20499 - 20503.
- [171] F. Alcock, M. A. Baker, N. P. Greene, T. Palmer, M. I. Wallace, B. C. Berks; "Live cell imaging shows reversible assembly of the TatA component of the twin-arginine protein transport system"; *Proc Natl Acad Sci USA*, **2013**, *110*, E3650 - 9.
- [172] P. Rose, J. Fröbel, P. L. Graumann, M. Müller; "Substrate-dependent assembly of the Tat translocase as observed in live Escherichia coli cells"; *PloS one*, **2013**, *8*, e69488.
- [173] S. M. Theg, K. Cline, G. Finazzi, F.-A. Wollman; "The energetics of the chloroplast Tat protein transport pathway revisited"; *Trends Plant Sci*, **2005**, *10*, 153 - 154.
- [174] S. Cristóbal, P. Scotti, J. Luirink, G. von Heijne, J. W. de Gier; "The signal recognition particle-targeting pathway does not necessarily deliver proteins to the Sec-translocase in Escherichia coli"; *J Biol Chem*, **1999**, *274*, 20068 - 20070.
- [175] C. L. Santini, B. Ize, A. Chanal, M. Müller, G. Giordano, L. F. Wu; "A novel Sec-independent periplasmic protein translocation pathway in Escherichia coli"; *EMBO J*, **1998**, *17*, 101 - 112.

- [176] M. P. DeLisa, P. Lee, T. Palmer, G. Georgiou; "Phage shock protein PspA of Escherichia coli relieves saturation of protein export via the Tat pathway"; *J Bacteriol*, **2003**, *186*, 366 - 373.
- [177] K. Vrancken, S. de Keersmaecker, N. Geukens, E. Lammertyn, J. Anné, L. van Mellaert; "PspA overexpression in Streptomyces lividans improves both Sec- and Tat-dependent protein secretion"; *Appl Microbiol Biotechnol*, **2007**, *73*, 1150 - 1157.
- [178] M. Kleerebezem, W. Crielaard, J. Tommassen; "Involvement of stress protein PspA (phage shock protein A) of Escherichia coli in maintenance of the protonmotive force under stress conditions"; *EMBO J*, **1996**, *15*, 162 - 171.
- [179] G. Finazzi, C. Chasen, F. A. Wollman, C. de Vitry; "Thylakoid targeting of Tat passenger proteins shows no delta pH dependence in vivo"; *EMBO J*, **2003**, *22*, 807 - 815.
- [180] U. K. Bageshwar, S. M. Musser; "Two electrical potential-dependent steps are required for transport by the Escherichia coli Tat machinery"; *J Cell Biol*, **2007**, *179*, 87 - 99.
- [181] N. A. Braun, A. W. Davis, S. M. Theg; "The chloroplast Tat pathway utilizes the transmembrane electric potential as an energy source"; *Biophys J*, **2007**, *93*, 1993 - 1998.
- [182] G. Warren, J. Oates, C. Robinson, A. M. Dixon; "Contributions of the transmembrane domain and a key acidic motif to assembly and function of the TatA complex"; *J Mol Biol*, **2009**, *388*, 122 - 132.
- [183] G. F. White, S. M. Schermann, J. Bradley, A. Roberts, N. P. Greene, B. C. Berks, A. J. Thomson; "Subunit organization in the TatA complex of the twin arginine protein translocase: A site-directed EPR spin labeling study"; *J Biol Chem*, **2010**, *285*, 2294 - 2301.
- [184] T. H. Walther, C. Gottselig, S. L. Grage, M. Wolf, A. V. Vargiu, M. J. Klein, S. Vollmer, S. Prock, M. Hartmann, S. Afonin, E. Stockwald, H. Heinzmann, O. V. Nolandt, W. Wenzel, P. Ruggerone, A. S. Ulrich; "Folding and self-assembly of the TatA translocation pore based on a charge zipper mechanism"; *Cell*, **2013**, *152*, 316 - 326.
- [185] T. Brüser, C. Sanders; "An alternative model of the twin arginine translocation system"; *Microbiol Res*, **2003**, *158*, 7 - 17.
- [186] H. W. Huang; "Molecular mechanism of antimicrobial peptides: The origin of cooperativity"; *Biochim Biophys Acta*, **2006**, *1758*, 1292 - 1302.
- [187] F. Lottspeich, J. W. Engels; "Bioanalytik"; Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag, München, Heidelberg, **2006**, 2. Auflage.
- [188] M. Cai, Y. Huang, K. Sakaguchi, G. M. Clore, A. M. Gronenborn, R. Craigie; "An efficient and cost-effective isotope labeling protocol for proteins expressed in shape Escherichia coli"; *J Biomol NMR*, **1998**, *11*, 97 - 102.
- [189] T. H. Walther; "Strukturuntersuchungen am porenbildenden Translokationsprotein TatAd aus B. subtilis"; *Dissertation*, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe, **2010**.
- [190] M. R. Wilkins, I. Lindskog, E. Gasteiger, A. Bairoch, J. C. Sanchez, D. F. Hochstrasser, R. D. Appel; "Detailed peptide characterization using PEPTIDEMASS - a World-Wide-Web-accessible tool"; *Electrophoresis*, **1997**, *18*, 403 - 408.
- [191] B. M. Michov; "Elektrophorese - Theorie und Praxis"; Walter de Gruyter Verlag, Berlin, **1995**, 24. Auflage.
- [192] E. Stockwald; "Untersuchung der Homooligomerisierung des porenbildenden Membranproteins TatAd aus B. subtilis"; *Diplomarbeit*, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe, **2012**.

- [193] M. Gey; "Instrumentelle Analytik und Bioanalytik"; *Springer Spektrum Verlag*, Berlin, **2015**, 3. Auflage.
- [194] R. Pecora; "Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids"; *J Nano Res*, **2000**, 2, 123 - 131.
- [195] E. K. Nepomniashchaia, E. T. Aksenov, T. A. Bogomaz, E. N. Velichko; "Use of laser correlation spectroscopy to investigate the parameters of biological suspensions"; *J Opt Technol*, **2015**, 82, 162.
- [196] Y. Li, A. R. Barron; "Dynamic Light Scattering"; *OpenStax-CNX*, zu finden unter <http://cnx.org/content/m50236/1.2/>.
- [197] H. Fujita; "Foundations of Ultracentrifugal Analysis: 042 (Chemical analysis)"; *Wiley-VCH Verlag*, New York, **1975**, 18. Auflage.
- [198] H. K. Schachman; "Ultracentrifugation in Biochemistry"; *Academic Press Publisher*, New York, **1959**.
- [199] J. L. Cole, J. W. Lary, T. P. Moody, T. M. Laue; "Analytical ultracentrifugation: Sedimentation velocity and sedimentation equilibrium"; *Methods Cell Biol*, **2008**, 84, 143 - 179.
- [200] F. M. Marassi, S. J. Opella; "NMR structural studies of membrane proteins"; *Curr Opin Struct Biol*, **1998**, 8, 640 - 648.
- [201] M. J. Duer; "Solid-state NMR spectroscopy: Principles and Applications"; *Blackwell Science Publisher*, Oxford, Malden, **2002**, 17. Auflage.
- [202] D. Marsh; "Energetics of hydrophobic matching in lipid-protein interactions"; *Biophys J*, **2008**, 94, 3996 - 4013.
- [203] F. M. Marassi, A. Ramamoorthy, S. J. Opella; "Complete resolution of the solid-state NMR spectrum of a uniformly ¹⁵N-labeled membrane protein in phospholipid bilayers"; *Proc Natl Acad Sci USA*, **1997**, 94, 8551 - 8556.
- [204] P. Laggner, M. Kriechbaum; "Phospholipid phase transitions: Kinetics and structural mechanisms"; *Chem Phys Lipids*, **1991**, 57, 121 - 145.
- [205] "Avanti Polar Lipids, Inc."; zu finden unter <http://www.avantilipids.com/>.
- [206] S. M. Kelly, T. J. Jess, N. C. Price; "How to study proteins by circular dichroism"; *Biochim Biophys Acta*, **2005**, 1751, 119 - 139.
- [207] R. Winter, F. Noll, C. Czeslik; "Methoden der biophysikalischen Chemie"; *Vieweg Teubner Verlag*, Wiesbaden, **2011**, 2. Auflage.
- [208] G. R. Grimsley, J. M. Scholtz, C. N. Pace; "A summary of the measured pK values of the ionizable groups in folded proteins"; *Protein Sci*, **2009**, 18, 247 - 251.
- [209] M. Baciu, S. C. Sebai, O. Ces, X. Mulet, J. A. Clarke, G. C. Shearman, R. V. Law, R. H. Templer, C. Plisson, C. A. Parker, A. Gee; "Degradative transport of cationic amphiphilic drugs across phospholipid bilayers"; *Philos Trans Series A Math Phys Eng S*, **2006**, 364, 2597 - 2614.
- [210] S. P. Bhamidipati, J. A. Hamilton; "Interactions of lyso 1-palmitoylphosphatidylcholine with phospholipids: A ¹³C and ³¹P NMR study"; *Biochemistry*, **1995**, 34, 5666 - 5677.
- [211] C. Biele, H. R. Horton; "Biochemie"; *Pearson Studium Verlag*, München, **2008**, 4. Auflage.
- [212] S. Tristram-Nagle, D. J. Kim, N. Akhuzada, N. Kucerka, J. C. Mathai, J. Katsaras, M. Zeidel, J. F. Nagle; "Structure and water permeability of fully hydrated diphytanoylPC"; *Chem Phys Lipids*, **2010**, 163, 630 - 637.

- [213] J. Gutknecht; "Proton / hydroxide conductance through lipid bilayer membranes"; *J Membr Biol*, **1984**, 82, 105 - 112.
- [214] K. Yamauchi, K. Doi, M. Kinoshita; "Archaeobacterial lipid models: Stable liposomes from 1-alkyl-2-phytanyl-sn-glycero-3-phosphocholines"; *Biochim Biophys Acta*, **1996**, 1283, 163 - 169.
- [215] W. R. Redwood, F. R. Pfeiffer, J. A. Weisbach, T. E. Thompson; "Physical properties of bilayer membranes formed from a synthetic saturated phospholipid in n-decane"; *Biochim Biophys Acta*, **1971**, 233, 1 - 6.
- [216] H. Lindsey, N. O. Petersen, S. I. Chan; "Physicochemical characterization of 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine in model membrane systems"; *Biochim Biophys Acta*, **1979**, 555, 147 - 167.
- [217] C. H. Hsieh, S. C. Sue, P. C. Lyu, W. G. Wu; "Membrane packing geometry of diphytanoylphosphatidylcholine is highly sensitive to hydration: Phospholipid polymorphism induced by molecular rearrangement in the headgroup region"; *Biophys J*, **1997**, 73, 870 - 877.
- [218] M. Andersson, J. Jackman, D. Wilson, P. Jarvoll, V. Alfredsson, G. Okeyo, R. Duran; "Vesicle and bilayer formation of diphytanoylphosphatidylcholine (DPhPC) and diphytanoylphosphatidylethanolamine (DPhPE) mixtures and their bilayers' electrical stability"; *Colloids Surf B Biointerfaces*, **2011**, 82, 550 - 561.
- [219] W. C. Hung, F. Y. Chen, H. W. Huang; "Order-disorder transition in bilayers of diphytanoyl phosphatidylcholine"; *Biochim Biophys Acta*, **2000**, 1467, 198 - 206.
- [220] D. J. Dieudonné, P. A. Gunnev, A. L. Rogozea, B. D. Ray, H. I. Petrache; "Physical properties of the lipid diphytanoyl-phosphatidylcholine (DPhPc) used for ion channel measurements"; *Biophys J*, **2010**, 98, 667a - 668a.
- [221] A. Wiese, M. Münstermann, T. Gutschmann, B. Lindner, K. Kawahara, U. Zähringer, U. Seydel; "Molecular mechanisms of polymyxin B-membrane interactions: Direct correlation between surface charge density and self-promoted transport"; *J Membr Biol*, **1998**, 162, 127 - 138.
- [222] Y. Wu, K. He, S. J. Ludtke, H. W. Huang; "X-ray diffraction study of lipid bilayer membranes interacting with amphiphilic helical peptides: Diphytanoyl phosphatidylcholine with alamethicin at low concentrations"; *Biophys J*, **1995**, 68, 2361 - 2369.
- [223] R. Koynova, B. Tenchov; "Transitions between lamellar and non-lamellar phases in membrane lipids and their physiological roles"; *OA Biochemistry*, **2013**, 1 - 9.
- [224] K. P. Howard, S. J. Opella; "High-resolution solid-state NMR spectra of integral membrane proteins reconstituted into magnetically oriented phospholipid bilayers"; *J Magn Reson B*, **1996**, 112, 91 - 94.
- [225] A. M. Thayer, S. J. Kohler; "Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectra characteristic of hexagonal and isotropic phospholipid phases generated from phosphatidylethanolamine in the bilayer phase"; *Biochemistry*, **1981**, 20, 6831 - 6834.
- [226] R. S. Prosser, S. A. Hunt, R. R. Vold; "Improving sensitivity in mechanically oriented phospholipid bilayers using ultrathin glass plates - a deuterium solid-state NMR study"; *J Magn Reson B*, **1995**, 109, 109 - 111.
- [227] Merck KGaA; "Millipore Wasseraufbereitungsanlage";, zu finden unter <http://www.merckmillipore.com>.
- [228] F. Hofmeister; "Zur Lehre von der Wirkung der Salze"; *Archiv experiment Pathol Pharmacol*, **1888**, 25, 1 - 30.

- [229] C. Ziegler; "Wechselwirkung der Transmembrandomäne des PDGF-Rezeptors β mit dem Onkoprotein E5"; *Dissertation*, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe, **2015**.
- [230] D. Windisch, C. Ziegler, S. L. Grage, J. Bürck, M. Zeitler, P. L. Gor'kov, A. S. Ulrich; "Hydrophobic mismatch drives the interaction of E5 with the transmembrane segment of PDGF receptor"; *Biophys J*, **2015**, *109*, 737 - 749.
- [231] R. Young; "Phage lysis: Do we have the hole story yet?"; *Curr Opin Microbiol*, **2013**, *16*, 790 - 797.
- [232] T. Park, D. K. Struck, J. F. Deaton, R. Young; "Topological dynamics of holins in programmed bacterial lysis"; *Proc Natl Acad Sci USA*, **2006**, *103*, 19713 - 19718.
- [233] T. Park, D. K. Struck, C. A. Dankenbring, R. Young; "The pinholin of lambdoid phage 21: Control of lysis by membrane depolarization"; *J Bacteriol*, **2007**, *189*, 9135 - 9139.
- [234] M. J. Fritsch, M. Krehenbrink, M. J. Tarry, B. C. Berks, T. Palmer; "Processing by rhomboid protease is required for *Providencia stuartii* TatA to interact with TatC and to form functional homo-oligomeric complexes"; *Mol Microbiol*, **2012**, *84*, 1108 - 1123.
- [235] K. Kumazaki, S. Chiba, M. Takemoto, A. Furukawa, K.-i. Nishiyama, Y. Sugano, T. Mori, N. Dohmae, K. Hirata, Y. Nakada-Nakura, A. D. Maturana, Y. Tanaka, H. Mori, Y. Sugita, F. Arisaka, K. Ito, R. Ishitani, T. Tsukazaki, O. Nureki; "Structural basis of Sec-independent membrane protein insertion by YidC"; *Nature*, **2014**, *509*, 516 - 520.
- [236] J. C. Samuelson, M. Chen, F. Jiang, I. Möller, M. Wiedmann, A. Kuhn, G. J. Phillips, R. E. Dalbey; "YidC mediates membrane protein insertion in bacteria"; *Nature*, **2000**, *406*, 637 - 641.
- [237] P. A. Scotti, M. L. Urbanus, J. Brunner, J. W. de Gier, G. von Heijne, C. van Der Does, A. J. Driessen, B. Oudega, J. Luirink; "YidC, the *Escherichia coli* homologue of mitochondrial Oxa1p, is a component of the Sec translocase"; *EMBO J*, **2000**, *19*, 542 - 549.
- [238] R. E. Dalbey, P. Wang, A. Kuhn; "Assembly of bacterial inner membrane proteins"; *Annu Rev Biochem*, **2011**, *80*, 161 - 187.
- [239] M. Chen, J. C. Samuelson, F. Jiang, M. Muller, A. Kuhn, R. E. Dalbey; "Direct interaction of YidC with the Sec-independent Pf3 coat protein during its membrane protein insertion"; *J Biol Chem*, **2002**, *277*, 7670 - 7675.
- [240] L. Zhu, A. Wasey, S. H. White, R. E. Dalbey; "Charge composition features of model single-span membrane proteins that determine selection of YidC and SecYEG translocase pathways in *Escherichia coli*"; *J Biol Chem*, **2013**, *288*, 7704 - 7716.
- [241] J. Fröbel, P. Rose, F. Lausberg, A.-S. Blümmel, R. Freudl, M. Müller; "Transmembrane insertion of twin-arginine signal peptides is driven by TatC and regulated by TatB"; *Nat Commun*, **2012**, *3*, 1311.
- [242] B. Maldonado, G. Buchanan, M. Müller, B. C. Berks, T. Palmer; "Genetic evidence for a TatC dimer at the core of the *Escherichia coli* twin arginine (Tat) protein translocase"; *J Mol Microbiol Biotechnol*, **2011**, *20*, 168 - 175.
- [243] J. Fröbel, P. Rose, M. Müller; "Early contacts between substrate proteins and TatA translocase component in twin-arginine translocation"; *J Biol Chem*, **2011**, *286*, 43679 - 43689.
- [244] M. S. Blake, K. H. Johnston, G. J. Russell-Jones, E. C. Gotschlich; "A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots"; *Anal Biochem*, **1984**, *136*, 175 - 179.

- [245] J. Lovric; "Introducing Proteomics: From concepts to sample separation, mass spectrometry and data analysis"; *Wiley-VCH Verlag*, **2011**, 1. Auflage.
- [246] M. Karas, M. Glückmann, J. Schäfer; "Ionization in matrix-assisted laser desorption / ionization: Singly charged molecular ions are the lucky survivors"; *J Mass Spectrom*, **2000**, *35*, 1 - 12.
- [247] K. Schilling; "Analytische Ultrazentrifugation - Übersicht"; *Nanalytics GmbH*, zu finden unter http://www.nanalytics.de/pdf/de/analytische_ultrazentrifugation_einfuehrung.pdf.
- [248] T. M. Laue, W. F. Stafford; "Modern applications of analytical ultracentrifugation"; *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **1999**, *28*, 75 - 100.
- [249] W. Demtröder; "Experimentalphysik 2: Elektrizität und Optik"; *Springer Verlag*, Berlin, Heidelberg, **2013**, 6. Auflage.
- [250] N. Berova, K. Nakanishi, R. Woody; "Circular Dichroism: Principles and Applications"; *Wiley-VCH Verlag*, New York, **2000**, 2. Auflage.
- [251] F.-Y. Chen, M.-T. Lee, H. W. Huang; "Sigmoidal concentration dependence of antimicrobial peptide activities: A case study on alamethicin"; *Biophys J*, **2002**, *82*, 908 - 914.
- [252] Y. Wu, H. W. Huang, G. A. Olah; "Method of oriented circular dichroism"; *Biophys J*, **1990**, *57*, 797 - 806.
- [253] W. Moffitt; "Optical rotatory dispersion of helical polymers"; *J Chem Phys*, **1956**, *25*, 467.
- [254] C. A. Fyfe; "Solid state NMR for chemists"; *C.F.C. Press Publisher*, Guelph, Ontario, **1983**.
- [255] L. M. McDowell, J. Schaefer; "High-resolution NMR of biological solids"; *Curr Opin Struct Biol*, **1996**, *6*, 624 - 629.
- [256] B. Bechinger, C. Sizun; "Alignment and structural analysis of membrane polypeptides by ¹⁵N and ³¹P solid-state NMR spectroscopy"; *Concepts Magn Reson*, **2003**, *18 A*, 130 - 145.
- [257] S. Müller; "Strukturuntersuchungen am bakteriellen Tat-Proteinexportsystem"; *Dissertation*, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe, **2007**.
- [258] E. L. Hahn; "Spin Echoes"; *Phys Rev*, **1950**, *77*, 746.
- [259] N. Sinha, C. V. Grant, C. H. Wu, A. A. De Angelis, S. C. Howell, S. J. Opella; "SPINAL modulated decoupling in high field double- and triple-resonance solid-state NMR experiments on stationary samples"; *J Magn Reson*, **2005**, *177*, 197 - 202.
- [260] B. M. Fung, A. K. Khitrin, K. Ermolaev; "An improved broadband decoupling sequence for liquid crystals and solids"; *J Magn Reson*, **2000**, *142*, 97 - 101.
- [261] A. Pines; "Proton-enhanced NMR of dilute spins in solids"; *J Chem Phys*, **1973**, *59*, 569.
- [262] S. R. Hartmann, E. L. Hahn; "Nuclear double resonance in the rotating frame"; *Phys Rev*, **1962**, *128*, 2042 - 2053.
- [263] O. B. Peersen, X. L. Wu, I. Kustanovich, S. O. Smith; "Variable-amplitude cross-polarization MAS NMR"; *J Magn Reson A*, **1993**, *104*, 334 - 339.
- [264] O. B. Peersen, X. L. Wu, S. O. Smith; "Enhancement of CP-MAS signals by variable-amplitude cross polarization. Compensation for inhomogeneous B1 fields"; *J Magn Reson A*, **1994**, *106*, 127 - 131.
- [265] G. Metz, X. L. Wu, S. O. Smith; "Ramped-amplitude cross polarization in magic-angle-spinning NMR"; *J Magn Reson A*, **1994**, *110*, 219 - 227.
- [266] Y. Ishihara, A. Calderon, H. Watanabe, K. Okamoto, Y. Suzuki, K. Kuroda; "Precise and fast temperature mapping using water proton chemical-shift"; *Magn Reson Med*, **1995**, *34*, 814 - 823.

Anhang

Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen

Medien und Stammlösungen der Transformation und Proteinexpression

SOC-Medium		Vollmedium	
Trypton	20 g	NaCl	10 g
Hefeextrakt	5 g	Trypton	10 g
NaCl	0,6 g	Hefeextrakt	5 g
KCl	0,2 g		
Magnesiumchlorid-Lösung (1 M)	10 ml		<i>ad 1 l H₂O</i>
Glucose-Lösung (40 %)	9 ml		pH 7,4 einstellen, autoklavieren
	eichen auf 1 l H ₂ O		
	pH 7,0 einstellen, steril filtrieren		
Kanamycin-Lösung (5 %)		Glucose-Lösung (40 %)	
Kanamycin	500 mg	Glucose	8 g
	<i>ad 10 ml H₂O, steril filtrieren</i>		<i>ad 20 ml H₂O, steril filtrieren</i>
Magnesiumchlorid-Lösung (1 M)		Thiamin-Lösung (0,5 %)	
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	10,17 g	Thiamin	50 mg
	<i>ad 50 ml H₂O, steril filtrieren</i>		<i>ad 10 ml H₂O, steril filtrieren</i>
Glycerol-Lösung (50 %)		¹⁵N-Ammoniumchlorid-Lösung (10 %)	
Glycerol	2,5 ml	¹⁵ NH ₄ Cl	1 g
	<i>ad 2,5 ml H₂O</i>		<i>ad 10 ml H₂O, steril filtrieren</i>
Vitamin-Lösung		Spurenelement-Lösung	
Biotin	5 mg	FeSO ₄ · 7 H ₂ O	300 mg
Cholinchlorid	5 mg	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	300 mg
Folsäure	5 mg	MnCl ₂ · 4 H ₂ O	60 mg
Nicotinamid	5 mg	CoCl ₂ · 6 H ₂ O	40 mg
D-Pantothenat Calcium-Salz	5 mg	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	35 mg
Pyridoxal-Hydrochlorid	5 mg	CuCl ₂ · 2 H ₂ O	15 mg
Riboflavin	500 mg	H ₃ BO ₃	1 mg
		EDTA	250 mg
		(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	12,5 mg
	<i>ad 50 ml H₂O</i>		<i>ad 50 ml H₂O, steril filtrieren</i>
	pH 7,0 einstellen, steril filtrieren		
IPTG-Lösung (1 M)			
IPTG	1,19 g		
	<i>ad 5 ml H₂O, steril filtrieren</i>		

M9-Salz-Lösung

KH ₂ PO ₄	26,00 g
K ₂ HPO ₄	20,00 g
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	22,56 g
Na ₂ SO ₄	4,80 g

ad 1 l H₂O, autoklavieren

M9-Minimalmedium

M9-Salz-Lösung	500 ml
Kanamycin-Lösung (5 %)	1 ml
Glucose-Lösung (40 %)	12,5 ml
Magnesiumchlorid-Lösung (1 M)	10 ml
Thiamin-Lösung (0,5 %)	6 ml
Vitamin-Lösung	10 ml
Spurenelement-Lösung	10 ml
¹⁵ NH ₄ Cl-Lösung (10 %)	10 ml

eichen auf 1 l H₂O
pH sollte bei 7,0 liegen, autoklavieren

Proteaseinhibitoren des Zellaufschlusses**PMSF-Lösung (100 mM)**

PMSF	34,84 mg
------	----------

ad 2 ml DMSO

Pefabloc-Lösung (20 mM)

Pefabloc	9,58 mg
----------	---------

ad 2 ml H₂O

Benzamidin-Lösung (478,8 mM)

Benzamidin-Hydrochlorid	149,96 mg
-------------------------	-----------

ad 2 ml H₂O

Puffer der Nickelchelate-Affinitätschromatographie**Imidazolfreier *Binding*-Puffer**

NaCl	58,44 g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	5,52 g

ad 2 l H₂O
pH 7,4 einstellen, entgasen

Imidazolhaltiger *Binding*-Puffer

NaCl	58,44 g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	5,52 g
Imidazol	6,81 g

ad 2 l H₂O
pH 7,4 einstellen, entgasen

Elutionspuffer

NaCl	58,44 g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	5,52 g
Imidazol	61,08 g

ad 2 l H₂O
pH 7,4 einstellen, entgasen

***Stripping*-Puffer**

NaCl	29,20 g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	2,76 g
EDTA	14,61 g

ad 1 l H₂O
pH 7,4 einstellen, entgasen

Puffer der Größenausschluss-Chromatographie

SEC-Puffer

NaCl	17,53 g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	5,52 g
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	3,62 g

ad 2 l H₂O
pH 7,5 einstellen, entgasen

Puffer und Stammlösungen der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen

SDS-Sammelgel-Puffer (4x Tris-HCl-Puffer)

NaCl	58,44 g
Tris	6,05 g

ad 100 ml H₂O
pH 6,8 einstellen

SDS	0,40 g
-----	--------

SDS-Anodenpuffer

Tris	24,22 g
------	---------

ad 1 l H₂O, pH 8,9 einstellen

Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (10 %)

APS	1 g
-----	-----

ad 10 ml H₂O

SDS-Ladepuffer

Tris-Puffer (1 M; pH 6,8)	1,75 ml
Glycerol	1,50 ml
SDS	0,50 g
DTT	0,24 g
Bromphenolblau	1 Sp.

eichen auf 10 ml H₂O

Stammlösungen der Coomassie-Färbung

Färbelösung

Coomassie blue G-250	1 g
Essigsäure (98 %)	50 ml
EtOH	450 ml

eichen auf 1 l H₂O

SDS-Trenngel-Puffer (Tris-Cl-Puffer)

NaCl	29,20 g
Tris	36,34 g

ad 100 ml H₂O
pH 8,45 einstellen

SDS	0,30 g
-----	--------

SDS-Kathodenpuffer

Tris	12,11 g
Tricin	17,92 g
SDS	1,00 g

ad 1 l H₂O

Tris-Puffer (1 M)

Tris	12,11 g
------	---------

ad 100 ml H₂O, pH 6,8 einstellen

Fixierlösung

Essigsäure (98 %)	100 ml
EtOH	500 ml

eichen auf 100 ml H₂O

Entfärberlösung

Essigsäure (98 %)	50 ml
EtOH	250 ml

eichen auf 500 ml H₂O

Stammlösungen der Silberfärbung**Färbelösung A**

Natriumcarbonat	25 g
-----------------	------

ad 500 ml H₂O

Färbelösung B

Ammoniumnitrat	1 g
Silbernitrat	1 g
H ₄ [Si(W ₃ O ₁₀) ₄] · x H ₂ O	5 g
Formaldehyd (37 %)	7 ml

eichen auf 500 ml H₂O

Puffer des Western Blot-Verfahrens**Anodenpuffer I**

Tris	36,34 g
MeOH	200 ml

eichen auf 1 l H₂O, pH 10,4 einstellen

Anodenpuffer II

Tris	3,03 g
MeOH	200 ml

eichen auf 1 l H₂O, pH 10,4 einstellen

Kathodenpuffer

Aminocaprinsäure	5,52 ml
SDS	0,1 g
MeOH	200 ml

eichen auf 1 l H₂O, pH 6,7 einstellen

Puffer und Stammlösungen der Immunodetektion**Tween20-haltiger PBS-Puffer**

NaCl	0,94 g
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	1,37 g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0,36 g
Tween 20	500 µl

eichen auf 1 l H₂O, pH 7,2 einstellen

Milchpulverlösung

Milchpulver	2,5 g
-------------	-------

ad 50 ml Tween 20-haltiger PBS-Puffer

Entwicklungslösung

Tris	6,06 g
NaCl	2,92 g
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	5,08 g

ad 500 ml H₂O, pH 9,5 einstellen

Detektionslösung

BCIP-Lösung	1 ml
NBT-Lösung	1 ml

eichen auf 10 ml H₂O

Geräte, Materialien und Chemikalien

Geräte	Modell (Firma)
Autoklaven	Varioklav (H + P Labortechnik GmbH) Sanoclav S-ECZ (A. Wolf SANOclav)
Brutschrank	Incucell (MMM Medcenter Einrichtungen GmbH)
Chromatographiesäulen	HisTrap HP (GE Healthcare Life Sciences) HiPrep™ 16/60 Sepharyl™ S-100 (Amersham Biosciences) HiLoad 16/60 Superdex 200 pg (Amersham Biosciences)
SDS-Elektrophoresegeräte	Power Supply Consort EV 243 (Bio-Rad Laboratories) Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories)
FPLC-Anlage	ÄKTApurifier (GE Healthcare Life Sciences)
Gasbrenner	Schütt Flammy S (Schütt Labortechnik GmbH)
Geldokumentationssystem	Photo Print (Vilber Lourmat Deutschland GmbH) Printer P91 (Mitsubishi Electric Europe B.V.)
Glaskolben	(Duran Group GmbH)
Heizblock	HB-2 (Wealtec Corporation)
Inkubationsschüttler	Innavo44 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific) Minitron AI 72 (Infors HT AG)
Kühlschränke	4 °C und -20 °C -80 °C
	(Siemens AG) Herafreeze (Heraeus Instruments GmbH)
Lyophilisator	Alpha I-6 und Alpha 2-4 LD (Martin Christ GmbH)
Magnetrührer	RCT (IKA®-Werke GmbH & CO. KG) IKAMAG RCT (IKA®-Werke GmbH & CO. KG IKA)
MALDI-TOF-Massenspektrometer	Autoflex III (Bruker Daltonics GmbH)
Mikrowelle	M1712N (Samsung Electronics GmbH)
NMR-Spektrometer	Avance III, 500 MHz Wide Bore (Bruker BioSpin GmbH)
NMR-Probenköpfe	Tripleresonanz-(¹ H / X / Y)-Probenkopf Doppelresonanz-(¹ H / ¹⁵ N)-LowE-Probenkopf (Bruker BioSpin GmbH)
pH-Messgeräte	QpH 70 (VWR International GmbH) pH 315i (WTW GmbH) pH 3310 (WTW GmbH) HI 98110 Kontakt-pH-Meter (PCE Deutschland GmbH)
Pipetten	0,5 – 10 µl, 2 – 20 µl, 10 – 100 µl, 50 – 200 µl, 100 – 1000 µl
	Reference (Eppendorf AG)
Reinraumbank	Herasafe (Heraeus Instruments GmbH)
Reinstwasseranlage	Milli-Q® (Merck Millipore; Merck KGaA)
Schüttler	7400 Tübingen KL 2 (Edmund Bühler GmbH)
Software	MALDI-TOF-Spektrometrie NMR-Spektroskopie
	Compass 1.3 (Bruker Daltonics GmbH) Topspin (Bruker BioSpin GmbH)
SR-CD/OCD-Anlage	UV-CD12-Strahlröhre (ANKA)
Trockenschrank	600 (Memmert GmbH + Co. KG)

Ultraschallgeräte	Branson Sonifer 250 (G. Heinemann) Sonorex RK510 (Bandelin electronic GmbH + Co. KG) UW2200 (Bandelin electronic GmbH + Co. KG)
UV/VIS-Spektrophotometer	SmartSpec Plus (Bio-Rad Laboratories)
Vortexer	Genie K-550-GE (Bender und Hobein AG) BioVortex V1 (Lab 4 you GmbH)
Waagen	Ablesbarkeit 0,1 g Ablesbarkeit 0,001 g Ablesbarkeit 0,1 mg Ablesbarkeit 0,001 mg
	PB 3001 (Mettler-Toledo GmbH) Analytic A200 S (Sartorius AG) Analytic CP 64 (Sartorius AG) Analytic M2P (Sartorius AG)
Wärmebäder	Thermostat U3- 7A (Julabo Labortechnik GmbH) SW22 (Julabo Labortechnik GmbH) A100 (Lauda GmbH) BüdiWaterbath B-480 (Huber medingen GmbH)
Western Blot-Apparatur	PerfectBlue Semi-Dry Electrobloetter (PEQLAB GmbH)
Zentrifugen	Centrifuge 5417R (Eppendorf AG) Sigma 3-18 K (Eppendorf AG) Centrifuge MiniSpin plus® (Eppendorf) Avanti Centrifuge J-25 (Beckmann Coulter GmbH) L8-M Ultrazentrifuge (Beckmann Coulter GmbH)
Zentrifugenrotoren	45Ti (Beckmann Coulter GmbH) J-Lite JLA-9.100 (Beckmann Coulter GmbH)

Verbrauchsmaterialien**Modell (Firma)**

Aluminiumfolie		Rotilabo-Folie (Carl Roth GmbH + Co. KG)
Autoklavierband		Comply Indicator Tape (3M Deutschland GmbH)
Blottingpapier		(Carl Schleicher und Schüll)
Deckgläser	7,5 · 12,5 mm	(Paul Marienfeld GmbH + Co. KG)
Dialyseschläuche	MWCO: 1 kDa	Float-A-Lyzer (Spectrum Laboratories, Inc.)
Einmalspritzen	2–20 ml	Inject (B. Braun Melsungen AG)
Einmalsterilfilter	0,22 µm	Rotilabo-Filter (Carl Roth GmbH + Co. KG)
Halbmikroküvetten	1 ml	(Sarstedt AG + Co.)
Nitrocellulosemembran		(Whatman)
Parafilm		(American National Can GmbH + Co. KG)
Petrischalen		(Sarstedt AG + Co.)
Pipettenspitzen	10 µl, 200 µl, 1000 µl	(Sarstedt AG + Co.)
Polyethylenfolie		(Rewe Handelsgruppe)
Reaktionsgefäße	0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	(Sarstedt AG + Co.)
Wägebapier		MN, 226 (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG)
Wägeschalen		Rotilabo-Schälchen (Carl Roth GmbH + Co. KG)
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml	Falcon-Tubes (Sarstedt AG + Co.)

Chemikalien (Firma)

Acetonitril (Fisher Scientific GmbH)	Folsäure (AppliChem GmbH)
Acrylamid (Carl Roth)	Hefeextrakt (AppliChem GmbH)
Agar (Carl Roth)	Hexafluoroisopropanol (Carl Roth)
Albumin Fraktion V (Carl Roth)	Imidazol (Carl Roth)
6-Aminocaprinsäure (Carl Roth)	Imidazol-Hydrochlorid (Sigma-Aldrich)
Ammoniumchlorid (Fluka Chemie GmbH)	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (Carl Roth)
Ammoniumcitrat (Carl Roth)	Kaliumdihydrogenphosphat (Carl Roth)
Ammoniumpersulfat (Carl Roth)	Kaliumsulfat (Carl Roth)
Ammoniumsulfat (Acros Organics)	Kanamycin (AppliChem GmbH)
^{15}N -Ammoniumsulfat (Spectra Stable Isotopes)	Kupfer(II)chloriddihydrat (Fluka Chemie GmbH)
Benzamidin-Hydrochlorid (Merck KGaA)	Lysozym (AppliChem GmbH)
Benzonase (Merck KGaA)	Magnesiumchloridhexahydrat (Sigma-Aldrich)
Bio-Beads TM SM-2 (Bio-Rad Laboratories)	Mangan(II)chloridtetrahydrat (Fluka GmbH)
Biotin (AppliChem GmbH)	Methanol (Fisher Scientific GmbH)
Bis-Tris (Carl Roth)	Milchpulver (Carl Roth)
Borsäure (Carl Roth)	4-Morpholinoethansulfonsäure (Sigma-Aldrich)
Bromcyan (Fluka Chemie GmbH)	Natriumazid (Carl Roth)
Bromphenolblau (Merck KGaA)	Natriumcarbonat (Carl Roth)
Calciumchloriddihydrat (Carl Roth)	Natriumchlorid (Carl Roth)
Cholinchlorid (AppliChem GmbH)	Natriumdihydrogenphosphat (AppliChem GmbH)
Cobaltchloridhexahydrat (AppliChem GmbH)	Natriumdodecylsulfat (AppliChem GmbH)
Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva)	Natriumhydroxid (Merck KGaA)
Cytochrom c (Carl Roth)	Natriumlauroylsarkosin (Fluka Chemie GmbH)
DDPC (Avanti Polar Lipids)	Natriumsulfat (Carl Roth)
DEiPC (Avanti Polar Lipids)	Niacinamid (AppliChem GmbH)
DErPC (Avanti Polar Lipids)	Nickelsulfat (Fluka Chemie GmbH)
Dextran (Carl Roth)	Nitroblue Tetrazolium Salz (Invitrogen AG)
Dikaliumhydrogenphosphat (AppliChem GmbH)	Pefabloc (Carl Roth)
Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich)	Phenylmethylsulfonylfluorid (AppliChem GmbH)
Dinatriumhydrogenphosphat (AppliChem GmbH)	Pyridoxal (AppliChem GmbH)
Dithiothreitol (Fluka Chemie GmbH)	Riboflavin (AppliChem GmbH)
Dithranol (Sigma-Aldrich)	Salzsäure (Carl Roth)
DLPC (Avanti Polar Lipids, Inc.)	Servalyt TM -Ampholyt-Lösung (Serva)
DMPC (Avanti Polar Lipids, Inc.)	Silbernitrat (Carl Roth)
DNPC (Avanti Polar Lipids, Inc.)	Sinapinsäure (Sigma-Aldrich)
DOcPC (Avanti Polar Lipids, Inc.)	Stickstoff (Messer Griesheim GmbH)
Dodecyl- β -D-Maltosid (Carl Roth)	Sulfosalicylsäure (AppliChem GmbH)
DOPC (Avanti Polar Lipids, Inc.)	2,4,6-Trichloranisol (Carl Roth)
D-Pantothenat (AppliChem GmbH)	Tetramethylethylendiamin (Carl Roth)
DPhPC (Avanti Polar Lipids, Inc.)	Thiamin-Hydrochlorid (AppliChem GmbH)

DPhPE (Avanti Polar Lipids, Inc.)	Tricin (AppliChem GmbH)
DPolePC (Avanti Polar Lipids, Inc.)	Trifluoressigsäure (Carl Roth)
Eisen(II)sulfatheptahydrat (Fluka Chemie GmbH)	Trinatriumcitratdihydrat (Carl Roth)
Essigsäure (Carl Roth)	Tris (Carl Roth)
Ethanol (Carl Roth)	Tris-Hydrochlorid (Carl Roth)
Ethylendiamintetraessigsäure (Fluka GmbH)	Trypton (Carl Roth)
Folsäure (AppliChem GmbH)	Tween 20 (Carl Roth)
Formaldehyd (Carl Roth)	Wolframatokieselsäure-Hydrat (Sigma-Aldrich)
Glucose (Fluka Chemie GmbH)	Zinksulfatheptahydrat (AppliChem GmbH)
Glycerol (Carl Roth)	

Bakterienstämme

Firma

<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Novagen
<i>E. coli</i> XL1-Blue	Stratagene

Expressionsstämme

<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET-28a(+)-TatA ₁₋₇₀	Dr. Christian Lange, Universität Karlsruhe
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET-28a(+)-TatA ₁₋₄₅	Dr. Torsten Walther, Universität Karlsruhe
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET-28a(+)-TatA ₁₋₅₂ 7er LAL	Stefanie Vollmer, Universität Karlsruhe
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET-28a(+)-TatA ₁₋₅₀ 5er LAL	Stefanie Vollmer, Universität Karlsruhe
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET-28a(+)-TatA ₁₋₄₈ 3er LAL	Stefanie Vollmer, Universität Karlsruhe
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET-28a(+)-TatA ₁₋₄₅ 5er A	Stefanie Vollmer, Universität Karlsruhe
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET-28a(+)-TatA ₁₋₄₂ ΔLIL	Stefanie Vollmer, Universität Karlsruhe
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET-28a(+)-TatA ₁₋₄₅ F ₂ D I ₇ D	Stefanie Vollmer, Universität Karlsruhe
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET-28a(+)-TatA ₁₋₄₅ F ₂ D	Stefanie Vollmer, Universität Karlsruhe
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET-28a(+)-TatA ₁₋₄₅ F ₂ E	Stefanie Vollmer, Universität Karlsruhe
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET-28a(+)-TatA ₁₋₄₅ F ₂ K	Stefanie Vollmer, Universität Karlsruhe

Antikörper

Firma

TatA ₄ -Antikörper; polyklonal	Dr. Jörg Müller, Universität Jena
His ₆ -Tag-Antikörper; monoklonal	Novagen
Goat-Anti-Mouse IgG Alkalische Phosphatase Konjugat	Invitrogen AG

Proteinreferenzmarker

Firma

PageRuler Prestained Protein Ladder	Fisher Scientific GmbH
PageRuler Unstained Protein Ladder	Fisher Scientific GmbH

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Proteintranslokation über das Sec-abhängige und Tat-abhängige Transportsystem	2
Abbildung 2	Vorteile einer zytoplasmatischen Faltung der Tat-abhängigen Substrate.....	4
Abbildung 3	Vergleich eines Tat-abhängigen und Sec-abhängigen Signalpeptids	6
Abbildung 4	Strukturvorhersage der <i>E. coli</i> Tat-Komponenten.....	8
Abbildung 5	Lokale Struktur und Membranorientierung von <i>B. subtilis</i> TatA _d	9
Abbildung 6	Lokale Struktur von <i>E. coli</i> TatB.....	10
Abbildung 7	Struktur von <i>A. aeolicus</i> TatC	11
Abbildung 8	Dreidimensionale Dichtekarten von <i>E. coli</i> TatA und <i>B. subtilis</i> TatA _d	12
Abbildung 9	Lösliche Form von <i>B. subtilis</i> TatA _d	13
Abbildung 10	Konsensus-Mechanismus der Tat-abhängigen Proteintranslokation	14
Abbildung 11	Homooligomerisierung von <i>B. subtilis</i> TatA _d nach der „Charge-Zipper“-Hypothese	17
Abbildung 12	Bildung der Translokationspore über den „Charge-Zipper“-Mechanismus	18
Abbildung 13	Bildung der Translokationspore durch eine Membrandestabilisierung	19
Abbildung 14	Homologiemodelle von TatC-Proteinen	20
Abbildung 15	Darstellung der strukturell konservierten Aminosäuren von <i>B. subtilis</i> TatC _d	21
Abbildung 16	„TatC-Flippase“-Translokationsmechanismus	22
Abbildung 17	<i>E. coli</i> -Wachstumskurven der TatA ₂₋₄₅ -Mutanten mit zugehörigen Western Blots	26
Abbildung 18	SDS-Gel und Western Blots einer Aufreinigung von TatA ₂₋₇₀	28
Abbildung 19	SDS-Gel der aufgereinigten TatA-Konstrukte	28
Abbildung 20	SDS-Gele der Löslichkeitsexperimente von TatA ₂₋₇₀	30
Abbildung 21	SDS-Gele der Löslichkeitsexperimente von TatA ₂₋₇₀ nach einer Silberfärbung	32
Abbildung 22	SDS-Gel von TatA ₂₋₇₀ gelöst in verschiedenen Acetonitrilgemischen	32
Abbildung 23	SEC-Diagramme von TatA ₂₋₇₀ , 250 kDa-Dextran, BSA und Cytochrom c	34
Abbildung 24	DLS-Diagramme von TatA ₂₋₇₀ , 250 kDa-Dextran, BSA und Cytochrom c.....	35
Abbildung 25	AUZ-Diagramme von TatA ₂₋₇₀	36
Abbildung 26	Zielstellung der Untersuchung von membrangebundenem TatA.....	37
Abbildung 27	NMR-Spektren von TatA ₂₋₇₀ in DMPC.....	38
Abbildung 28	NMR-Spektren von TatA ₂₋₇₀ in Lipiden mit unterschiedlicher Acylkettenlänge	39
Abbildung 29	NMR-Spektren von TatA ₂₋₄₅ in DMPC.....	40
Abbildung 30	SR-CD-Spektren von TatA ₂₋₄₅ in Lipiden mit unterschiedlicher Acylkettenlänge	42
Abbildung 31	NMR-Spektren von TatA ₂₋₄₅ in Lipiden mit unterschiedlicher Acylkettenlänge	44
Abbildung 32	NMR-Spektren von TatA ₂₋₄₅ in DErPC und DNPC bei unterschiedlichem pH-Wert	46
Abbildung 33	<i>Monte Carlo</i> -Simulationen von TatA ₁₋₄₅ in impliziten Modellmembranen.....	47

Abbildung 34	NMR-Spektren von TatA ₂₋₄₅ in DMPC bei unterschiedlichen Temperaturen	48
Abbildung 35	Phytanoyllipid DPhPC und DPhPE	50
Abbildung 36	Vergleich der NMR-Spektren von TatA ₂₋₄₅ in DMPC und DPhPC	50
Abbildung 37	NMR-Spektren von TatA ₂₋₄₅ in DPhPC in einer 0°- und 90°-Orientierung.....	51
Abbildung 38	NMR-Spektren von TatA ₂₋₄₅ in DPhPC / 5 % PE	52
Abbildung 39	NMR- und SR-OCD-Spektren von TatA ₂₋₄₅ in DMPC und DPhPC / 5 % PE	53
Abbildung 40	Auswirkungen einer Dehydratation der NMR-Probe	55
Abbildung 41	Übersicht der TatA ₂₋₄₅ -Mutanten	56
Abbildung 42	NMR-Spektren der Ladungsmutanten in DMPC und DPhPC / 5 % PE	58
Abbildung 43	NMR-Spektren der Ladungsmutanten in dicken Membranen	59
Abbildung 44	Vergleich der NMR-Spektren der Mutante TatA ₂₋₄₅ 3er LAL und TatA ₂₋₄₅ 7er LAL.....	61
Abbildung 45	NMR-Spektren der Mutanten mit einer TMH-Verlängerung	63
Abbildung 46	SR-OCD-Spektren der Mutanten mit einer TMH-Verlängerung	64
Abbildung 47	Vergleich der NMR-Spektren von TatA ₂₋₄₅ und TatA ₂₋₄₅ ΔLIL in DPhPC / 5 % PE.....	65
Abbildung 48	Vergleich der SR-OCD-Spektren von TatA ₂₋₄₅ und TatA ₂₋₄₅ ΔLIL in DPhPC / 5 % PE	66
Abbildung 49	SR-OCD-Spektren der Mutante TatA ₂₋₄₅ ΔLIL in dünnen Membranen	67
Abbildung 50	SR-OCD-Spektren der Mutante TatA ₂₋₄₅ ΔLIL in dicken Membranen	69
Abbildung 51	Vergleich der SDS- und BN-PAGE-Daten von <i>B. subtilis</i> TatA _d	71
Abbildung 52	An der Bakterienlyse beteiligte Phagen-kodierte Membranproteine.....	76
Abbildung 53	Membraninsertion einzelsträngiger Membranproteine durch das YidC-Protein	79
Abbildung 54	Molekulardynamik-Simulation eines TatC _d / [TatA _d] ₁₂ -Komplexes.....	80
Abbildung 55	Interaktionsmodelle der Tat-Komponenten.....	81
Abbildung 56	Bildung eines poren- oder spaltförmigen Translokationskanals	82
Abbildung 57	Prinzip der MALDI-TOF-Massenspektrometrie	92
Abbildung 58	Trennprinzip der Größenausschluss-Chromatographie	93
Abbildung 59	Aufbau der dynamischen Lichtstreuapparatur.....	95
Abbildung 60	Prinzip eines Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiments	96
Abbildung 61	Elliptisch zirkular polarisiertes Licht.....	98
Abbildung 62	Ellipsoider CSA-Tensor und ¹⁵ N-Festkörper-NMR-Pulverspektrum.....	104
Abbildung 63	Hahn-Echo-Pulssequenz der ³¹ P-NMR-Experimente	106
Abbildung 64	Kreuzpolarisations-Pulssequenz mit Rampe der ¹⁵ N-NMR-Experimente	107

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Ladungssequenz von TatA-, TatB- und TatE-Proteinen aus verschiedenen Organismen	16
Tabelle 2	Aminosäuresequenz der TatA-Konstrukte	24
Tabelle 3	Molekulargewicht der TatA-Konstrukte	29
Tabelle 4	Eigenschaften der Phosphatidylcholinlipide mit unterschiedlicher Acylkettenlänge	41
Tabelle 5	Strukturelle Kenndaten der TMHs der TatA _{2,45} -Mutanten	56
Tabelle 6	Zusammensetzung der 16 %igen Tris-Tricin-Polyacrylamidgele	89
Tabelle 7	Aufbau eines Western Blot-Experiments	91
Tabelle 8	Größenausschluss-Chromatographiesäulen	94

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

<i>A. aeolicus</i>	<i>Aquifex aeolicus</i>
AN	Acetonitril
APH	Amphiphile Helix
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AUZ	Analytische Ultrazentrifugation
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
CD-Spektroskopie	Zirkulardichroismus-Spektroskopie (<i>circular dichroism</i>)
CHES	N-Cyclohexyl-2-aminoethansulfonsäure
CP	Kreuzpolarisation (<i>cross polarisation</i>)
cpTatC	Chloroplastidäres TatC-Homolog
C-Region	C-terminale Signalpeptid-Region
CSA	Anisotropie der chemischen Verschiebung (<i>chemical shift anisotropy</i>)
C-terminal	Carboxyterminal
DCR	Hoch geladener Teil der C-terminalen Region von <i>B. subtilis</i> TatA _d (<i>densely charged region</i>)
DDM	Dodecyl-β-D-maltosid
DDPC	1,2-Didecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DEiPC	1,2-Dieicosenoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DErPC	1,2-Dierucoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DmsD	Substratspezifisches Korrektur-Chaperon der <i>E. coli</i> Dimethylsulfoxid-Reduktase
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DMSO	Dimethylsulfoxid

DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DOcPC	1,2-Didecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DPhPC	1,2-Diphytanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DPhPE	1,2-Diphytanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
DPolePC	1,2-Dipalmitoleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DLPC	1,2-Dilauroyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DLS	Dynamische Lichtstreuung (<i>dynamic light scattering</i>)
DNPC	1,2-Dinervonoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
d_L	Hydrophobe Membrandicke
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FPLC	Flüssigkeitschromatographie (<i>fast protein liquid chromatography</i>)
H ⁺	Proton(en)
Hcf106	Chloroplastidäres TatB-Homolog (<i>high-chlorophyll fluorescent 106</i>)
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-propanol
HP-Entkopplung	Höchleistungsentkopplung
H-Region	Hydrophobe Signalpeptid-Region
His ₆ -Tag	Hexahistidinanhang
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
MALDI-TOF-MS	Matrixunterstützte Laser-Desorption und -Ionisation mit Flugzeitmassenspektrometerdetektion (<i>matrix assisted laser desorption ionisation – time of flight – mass spectrometry</i>)
MeOH	Methanol
Milli-Q H ₂ O	Deionisiertes Wasser aus einer Millipore-Anlage
M _r	Molekulargewicht
$[\theta]_{MRE}$	Mittlere molare Elliptizität pro Peptidbindung (<i>mean residue ellipticity</i>)
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NaPi	Natriumphosphatpuffer
N-Region	N-terminale Signalpeptid-Region
N-terminal	Aminoterminal
NLS	N-Lauroylsarcosin Natriumsalz
NMR	Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
NTA	Nitriloessigsäure (<i>nitrilotriacetic acid</i>)
OCD-Spektroskopie	orientierte Zirkulardichroismus-Spektroskopie
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ORD	optische Rotationsdispersion
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pK _s	Negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante K _s
pH	Pondus / potentia Hydrogenii
PhoD	Phosphodiesterase D

P : L	Molares Protein-zu-Lipid-Verhältnis
PMF	Protonenmotorische Kraft (<i>proton motive force</i>)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SEC	Größenausschluss-Chromatographie (<i>size exclusion chromatography</i>)
SR	Synchrotron
TatA ₂₋₄₅	Rekombinant dargestelltes <i>B. subtilis</i> TatA _d -Fragment, dessen C-terminale Region und Startmethionin entfernt ist
TatA ₂₋₇₀	Rekombinant dargestelltes <i>B. subtilis</i> TatA _d -Protein, dessen Startmethionin entfernt ist
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tha4	Chloroplastidäres TatA-Homolog (<i>thylakoid assembly 4</i>)
T _m	Phasenübergangstemperatur der Lipide
TMH	Transmembranhelix
TorA	Kleine Untereinheit der Trimethylamin-N-Oxid-Reduktase
TorD	Substratspezifisches Korrektur-Chaperon des <i>E. coli</i> TorA-Substrates
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
VIS	Sichtbar (<i>visible</i>)

Symbole und Einheiten

Ångström	Å	Millimol	mM
Bar	bar	Millivolt	mV
Dalton	Da	Minute(n)	min
Durchmesser	Ø	Molar	M
Grad	°	Nanogramm	ng
Grad Celsius	°C	Nanometer	nm
Gramm	g	Nanosekunde(n)	ns
größer gleich	≥	Pikogramm	pg
Quadratmillimeter	mm ²	Prozent	%
Kilodalton	kDa	Protein-zu-Lipid-Verhältnis	P : L
Kilohertz	kHz	Relative Luftfeuchtigkeit (<i>relative humidity</i>)	rH
kleiner	<	Sekunde(n)	s
Liter	l	Svedberg	S
Masse-zu-Ladungsverhältnis	m/z	Tausendstel Winkelgrade (<i>millidegrees</i>)	mdeg
Mikrogramm	µg	Teile einer Million (<i>parts per million</i>)	ppm
Mikroliter	µl	Stunde(n)	h
Mikromol	µm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)	rpm
Milliampere	mA	ungefähr	≈
Milligramm	mg	Volt	V
Milliliter	ml	Willkürliche Einheit (<i>arbitrary unit</i>)	a. u.
Millimeter	mm	Zentimeter	cm

Publikationen

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, 316–326.

TAGUNGSBEITRÄGE

“Structural investigation of the twin-arginine translocase (Tat).”

Stockwald, E.; Gottselig, C.; Grage, S. L.; Bürck, J.; Afonin, S.; Vollmer, S.; Wolf, M.; Setzler, J.; Stockmar, F.; Dörlich, R.; Nienhaus, U. G.; Vargiu, A.; Ruggerone, P.; Wenzel, W.; Walther, T. H.; Ulrich, A. S.; *International Workshop of Molecular Membrane Biophysics*, Hünfeld, **2014**.

“Structure-function analysis of the twin-arginine translocase.”

Stockwald, E.; Gottselig, C.; Vollmer, S.; Grage, S.; Bürck, J.; Afonin, S.; Wolf, M.; Setzler, J.; Vargiu, A.; Ruggerone, P.; Wenzel, W.; Walther, T. H.; Ulrich, A. S.; *Young Investigator Network Meeting, Karlsruhe*, **2013**.