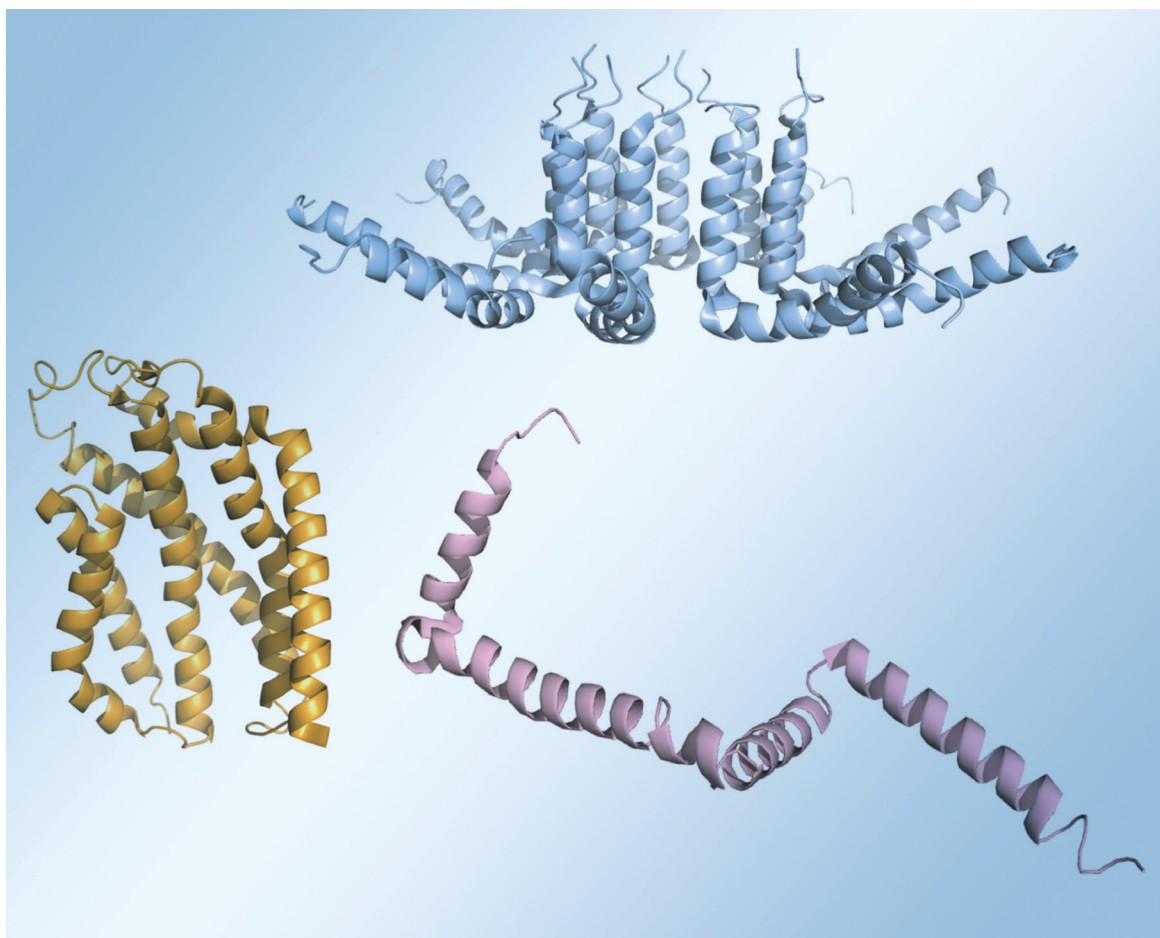




Identifizierung von Bindungs determinanten von Tat-Vorläuferproteinen an den TatBC-Rezeptorkomplex während der Tat-abhängigen Proteintranslokation in *Escherichia coli*

Agnes Ulfig

Schlüsseltechnologien / Key Technologies

Band / Volume 159

ISBN 978-3-95806-290-0

Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Bio-und Geowissenschaften
Biotechnologie (IBG-1)

**Identifizierung von Bindungs-
determinanten von Tat-Vorläuferproteinen
an den TatBC-Rezeptorkomplex während der
Tat-abhängigen Proteintranslokation in
*Escherichia coli***

Agnes Ulfig

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Schlüsseltechnologien / Key Technologies

Band / Volume 159

ISSN 1866-1807

ISBN 978-3-95806-290-0

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek.
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der
Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte Bibliografische Daten
sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Herausgeber
und Vertrieb: Forschungszentrum Jülich GmbH
Zentralbibliothek, Verlag
52425 Jülich
Tel.: +49 2461 61-5368
Fax: +49 2461 61-6103
zb-publikation@fz-juelich.de
www.fz-juelich.de/zb

Umschlaggestaltung: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Druck: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Copyright: Forschungszentrum Jülich 2018

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Schlüsseltechnologien / Key Technologies, Band / Volume 159

D 61 (Diss., Düsseldorf, Univ., 2017)

ISSN 1866-1807
ISBN 978-3-95806-290-0

Vollständig frei verfügbar über das Publikationsportal des Forschungszentrums Jülich (JuSER)
unter www.fz-juelich.de/zb/openaccess.



This is an Open Access publication distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/),
which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung.....	1
II. Theoretischer Hintergrund.....	3
1 Proteinsekretionssysteme in Gram-negativen Bakterien	3
2 Sec-abhängige Proteintranslokation über die Cytoplasmamembran.....	5
2.1 Aufbau und Funktion des bakteriellen Sec-Translocons.....	5
2.2 Co- und posttranslationaler Proteintransport über das Sec-System	6
3 Die Tat-abhängige Proteintranslokation in <i>E. coli</i>	9
3.1 Die Entdeckung und Relevanz des Tat-Systems	9
3.2 Das Tat-Substrat	11
3.2.1 Eigenschaften von Tat-Signalpeptiden	11
3.2.1.1 Das Tat-Konsensusmotiv in der n-Region	11
3.2.1.2 Die h-Region	12
3.2.1.3 Die c-Region und der frühe reife Proteinanteil	13
3.2.2 Der reife Proteinanteil von Tat-Substraten	14
3.2.3 Wechselwirkung von Tat-Substraten mit spezifischen und generellen Chaperonen	15
3.2.4 Ausschluss von ungefalteten Tat-Substraten von dem Tat-abhängigen Proteinexport	16
3.3 Komponenten der <i>E. coli</i> Tat-Translokase	18
3.3.1 TatA.....	19
3.3.2 TatB.....	20
3.3.3 TatC.....	20
3.3.4 Der TatBC-Rezeptorkomplex	21
3.4 Die Schritte der Tat-abhängigen Proteintranslokation.....	21
3.4.1 Zielsteuerung des Tat-Substrats an die Tat-Translokase	22
3.4.2 Erkennung und Bindung des Tat-Substrats durch den TatBC-Rezeptorkomplex	23
3.4.3 Translokation des Substrats über die Membran	24
3.5 Das TorA-MalE-Reportersystem zur <i>in vivo</i> Untersuchung des Tat-abhängigen Exports in <i>E. coli</i>	27
3.6 Untersuchung der Interaktionen zwischen Tat-Substraten und den Komponenten der Tat-Translokase mit Hilfe genetischer Ansätze	29
3.7 Ziele der vorliegenden Arbeit	31
III. Material und Methoden.....	32
1 Chemikalien und Enzyme.....	32
2 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide	32
2.1 Bakterienstämme	32
2.2 Plasmide	32
2.3 Oligonukleotide	34
3 Mikrobiologische Methoden	37
3.1 Nährmedien	37
3.1.1 LB (Luria-Bertani) –Medium (Miller, 1972).....	37

3.1.2	MacConkey-Agar	37
3.1.3	Maltose-Minimalmedium (Tanaka <i>et al.</i> , 1967).....	38
3.2	Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung	38
3.2.1	Kultivierungsbedingungen	38
3.2.2	Stammhaltung	39
3.3	Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	39
4	Molekularbiologische Methoden	40
4.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	40
4.2	Reinigung von Nukleinsäuren	40
4.3	Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	40
4.4	Sequenzierung von Plasmid-DNA	40
4.5	DNA-Agarose-Gelelektrophorese	41
4.6	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	41
4.7	Restriktion	41
4.8	Behandlung von DNA mit alkalischer Phosphatase.....	41
4.9	Ligation	42
4.10	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	42
4.11	Konstruktion des Reporterproteins NapA-30aa-MalE mittels „cross-over“ –PCR	43
4.12	Ortsgerichtete Mutagenese von TorA-30aa-MalE- und NapA-30aa-MalE-Reporterproteinvarianten sowie der Komponenten der Tat-Translokase	44
4.13	Konstruktion von pET22b(+)-Derivaten für <i>in vitro</i> Crosslinking-Experimente	45
4.14	Konstruktion von Mutantenbibliotheken.....	45
4.14.1	Konstruktion einer TorA[KQ]-30aa-MalE-Mutantenbibliothek mittels „error-prone“ (ep) –PCR zur Isolierung h-Region-lokalisierter Suppressormutationen	45
4.14.2	Konstruktion einer TorA[KQ]-30aa-MalE Mutantenbibliothek mittels ep-PCR zur Isolierung 30aa-Region-lokalisierter Suppressormutationen	46
4.14.3	Konstruktion einer TorA[KQ]-30aa*-MalE-Mutantenbibliothek mittels ortsgerichteter Mutagenese zur Isolierung 30aa-Region-lokalisierter Suppressormutationen	47
5	Biochemische und proteinchemische Methoden	48
5.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	48
5.2	Färbung von SDS-Gelen.....	49
5.3	Western-Blot.....	49
5.4	Fraktionierungen von <i>E. coli</i> -Zellen mittels osmotischen Schocks	50
5.5	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	51
6	Bioinformatische Ansätze	51
6.1	Bestimmung des GRAVY-Index von Tat-Signalpeptiden nach Kyte & Doolittle (1982) .	51
6.2	Erstellung eines Hydropathie-Plots für TorA-Signalpeptide nach Kyte & Doolittle (1982)	52
IV	Ergebnisse.....	53
1	Untersuchung der Rolle der h-Region von Tat-Signalpeptiden in der Tat-abhängigen Proteintranslokation in <i>E. coli</i>.....	53
1.1	Eine minimale, funktionale h-Region von Tat-Signalpeptiden wird für den <i>E. coli</i> Tat-Transport benötigt.....	53

1.1.1 Die Mutation V23D im Zentrum der h-Region des TorA-Signalpeptids führt zur vollständigen Blockierung des Tat-abhängigen Exports von TorA-MalE in <i>E. coli</i>	53
1.1.2 Die Länge einer intakten h-Region des TorA-Signalpeptids korreliert mit der Translokationseffizienz von TorA-MalE	55
1.2 Isolierung von Mutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids, die den Exportdefekt von TorA[KQ]-30aa-MalE supprimieren	58
1.3 Untersuchung der Suppression des Exportdefekts von TorA[KQ]-30aa-MalE durch h-Region-lokalisierte Mutationen im TorA[KQ]-Signalpeptid.....	62
1.4 Untersuchung der Auswirkung von Kombinationen der h-Region-lokalisierten Suppressormutationen auf den Export von TorA[KQ]-30aa-MalE.....	66
1.5 Untersuchung einer möglichen Korrelation zwischen der Hydrophobizität der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids und der Translokationseffizienz der jeweiligen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervariante.....	72
1.6 Auswirkung von Veränderungen der Hydrophobizität der h-Region des nativen TorA-Signalpeptids auf den Export von TorA-30aa-MalE.....	77
1.7 Crosslinking-Studien zur direkten Untersuchung der Bindung der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit h-Region-lokalisierten Suppressormutationen an den TatBC-Rezeptorkomplex.....	80
1.7.1 Identifizierung von Kontakten zwischen dem N-Terminus von TatB und TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit h-Region-lokalisierten Suppressor-mutationen	82
1.7.2 Identifizierung von Kontakten zwischen TatC und der TorA[KQ,T22I]-30aa-MalE-Reportervariante (iKQ-T22I)	84
1.7.3 Auswirkung von Inhibitoren der PMK auf die Insertion der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervariante mit der h-Region-lokalisierten Suppressormutation T22I in die TatBC-Bindetasche	86
1.8 Untersuchung der Auswirkung von Kombinationen der Suppressormutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids mit Suppressormutationen im TatBC-Rezeptorkomplex auf den Export von TorA[KQ]-30aa-MalE	87
1.8.1 Untersuchung des Exports der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit h-Region-lokalisierten Suppressormutationen durch die mutierte Tat-Translokase TatAB[E8K]CE	88
1.8.2 Untersuchung des Exports der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit h-Region-lokalisierten Suppressormutationen durch die mutierte Tat-Translokase TatABC[L9F]E	91
1.8.3 Untersuchung des Exports der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit h-Region-lokalisierten Suppressormutationen durch die mutierte Tat-Translokase TatAB[E8K]C[L9F]E	94
1.9 Untersuchung des partiellen Sec-abhängigen Exports einiger TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten.....	96
1.10 Untersuchung der Auswirkung einer Erhöhung der Gesamthydrophobizität auf den Transport einer exportdefekten Variante des neu konstruierten Reporterproteins NapA-30aa-MalE	101
1.10.1 Konstruktion des neuen Tat-spezifischen Reporterproteins NapA-30aa-MalE	101
1.10.2 Ortsgerichtete Mutagenese des NapA-Signalpeptids zur Wiederherstellung des Exports der NapA[KQ,G27R+V28R]-30aa-MalE-Reportervariante	105
2 Untersuchung der Rolle des frühen reifen Proteinanteils von Tat-Substraten in der Tat-abhängigen Proteintranslokation in <i>E. coli</i>	107
2.1 Isolierung von Mutationen im frühen reifen Proteinanteil, die den Exportdefekt von TorA[KQ]-30aa-MalE supprimieren.....	108
2.2 Auswirkung von Kombinationen von 30aa-Region-lokalisierten Suppressor-mutationen auf den Export von TorA[KQ]-30aa-MalE.....	110

2.3 Auswirkung von Kombinationen von h-Region-lokalisierten Suppressormutationen mit Suppressormutationen innerhalb der 30aa-Region auf den Export von TorA[KQ]-30aa-MalE	113
2.4 Untersuchung des Exports der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit 30aa-Region-lokalisierten Suppressormutationen durch die mutierte Tat-Translokase TatABC[L9F]E	117
V. Diskussion.....	123
1 Untersuchung der Rolle der h-Region von Tat-Signalpeptiden in der Tat-abhängigen Proteintranslokation in <i>E. coli</i>	123
1.1 Mutationen innerhalb der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids können den Exportdefekt von TorA[KQ]-30aa-MalE signifikant supprimieren	126
1.2 Kombinationen von h-Region-lokalisierten Suppressormutationen wirken sich synergistisch auf die Exporteffizienz von TorA[KQ]-30aa-MalE aus.....	130
1.3 Die Wiederherstellung des Exports von TorA[KQ]-30aa-MalE erfordert spezifisch die Einführung einer hydrophoberen Aminosäure in die h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids	132
1.4 Eine Erhöhung der Hydrophobizität des nativen TorA-Signalpeptids führt zu keiner Verbesserung des Exports von TorA-30aa-MalE	136
1.5 TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit h-Region-lokalisierten Suppressormutationen inserieren tief in die TatBC-Bindetasche	139
1.6 h-Region-lokalisierte Suppressormutationen kooperieren mit Mutationen im TatBC-Rezeptorkomplex bei der Suppression des Exportdefekts von TorA[KQ]-30aa-MalE	143
1.7 Eine zu starke Erhöhung der Hydrophobizität in Kombination mit einer Verlängerung der h-Region führt zu einem partiellen Sec-abhängigen Export einiger TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit h-Region-lokalisierten Suppressormutationen	147
1.8 Die Hydrophobizität der h-Region des Signalpeptids ist von genereller Bedeutung für die Gesamtbindeaffinität von Tat-Vorläuferproteinen an den TatBC-Rezeptorkomplex.....	150
2 Untersuchung der Rolle des frühen reifen Proteinanteils in der Tat-abhängigen Proteintranslokation	151
2.1 Mutationen im frühen reifen Proteinanteil können den Exportdefekt der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervariante signifikant supprimieren	153
2.2 Mutationen in der N-terminalen Hälfte der 30aa-Region supprimieren den Exportdefekt von TorA[KQ]-30aa-MalE durch Erhöhung der Gesamthydrophobizität des frühen reifen Proteinanteils.....	155
2.3 Mutationen in der C-terminalen Hälfte der 30aa-Region supprimieren den Exportdefekt von TorA[KQ]-30aa-MalE durch Erhöhung der positiven Nettoladung des frühen reifen Proteinanteils.....	158
3 Auswirkung der Ergebnisse auf das derzeitige Modell des Tat-abhängigen Translokationsprozesses	161
VI. Zusammenfassung.....	166
VII. Summary.....	167
VIII. Literaturverzeichnis.....	168
Danksagung.....	186

Abkürzungsverzeichnis

ÄM	Äußere Membran
APH	amphipathische Helix
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
Bpa	<i>p</i> -Benzoyl-L-Phenylalanin
°C	Grad Celsius
CCCP	Carbonylcyanid- <i>m</i> -chlorphenylhydrazon
Cm	Chloramphenicol
DCCD	N,N-Dicyclohexylcarbodiimid
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Dsb	<i>disulfide bond</i>
DTT	Dithiothreitol
ep-PCR	<i>error-prone</i> PCR
g	Gramm
GFOR	Glucose-Fructose-Oxidoreduktase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HiPIP	<i>high potential iron-sulfur protein</i>
IM	Innere Membran/Cytoplasmamembran
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobase
kg	Kilogramm
kDa	Kilodalton
L	Liter
LB	Luria-Bertani
M	Molar
mA	Milliampere
MCM	MacConkey-Maltose
μ l	Mikroliter
mg	Milligramm
MGD	Molybtopterin-Guanin-Dinukleotid
min	Minute

ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMM	Maltose-Minimalmedium
ng	Nanogramm
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PMK	protonenmotorische Kraft
pmol	picomol
PP	Periplasma
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
SAP	<i>Shrimp alkaline phosphatase</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SP	Signalpeptid
SPase	Signalpeptidase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TF	Triggerfaktor
TMAO	Trimethylaminoxid
TMH	Transmembranhelix
U	<i>Unit</i> , Enzymeinheit
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
w/v	<i>weight per volume</i> , Gewicht pro Volumen
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i> , Volumen pro Volumen/Volumenprozent
Wt	Wildtyp

Drei- und Ein-Buchstaben-Code für Aminosäuren

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

I. Einleitung

Das Gram-negative, fakultativ anaerobe Darmbakterium *Escherichia coli* aus der Familie der Enterobacteriaceae zählt heute zu den am besten untersuchten Modellorganismen. Aufgrund einiger pathogener Varianten wie EHEC (enterohämorrhagische *E. coli*) oder ETEC (enterotoxische *E. coli*), ist *E. coli* der breiten Bevölkerung hauptsächlich als Auslöser gefährlicher Darmerkrankungen bekannt. Die meisten *E. coli* –Stämme sind jedoch nicht gesundheitsgefährdend und bieten aufgrund ihrer einfachen genetischen Modifizierbarkeit, der kurzen Generationszeit und der geringen Ansprüche bezüglich der Nährmedien zahlreiche Vorzüge, von denen sowohl in der Forschung wie auch in der industriellen Biotechnologie profitiert wird. Bis 1997 konnte das *E. coli* Genom vollständig entschlüsselt werden (Blattner *et al.*, 1997). Es umfasst 4,6 Millionen Basenpaare und enthält ca. 4300 Gene, die für Proteine kodieren.

Da die grundlegenden Zellfunktionen über die Evolution konserviert geblieben sind, können in *E. coli* durch einfache genetische Manipulationen ubiquitäre zellbiologische Prozesse und molekulargenetische Mechanismen studiert werden. Die erzielten Forschungsergebnisse lassen sich oft auf pathogene Gram-negative sowie Gram-positive Bakterienstämme, teilweise auch auf tierische Zellen übertragen und sind daher von klinischer Relevanz.

Die heutige Medizin hat zunehmend mit multiresistenten Keimen zu kämpfen. Hunderttausende Menschen sterben weltweit an Infektionen mit Erregern, die gegen die gängigen Antibiotika immun sind. Viele bakterielle Pathogene wie *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Mycobacterium tuberculosis* oder auch EHEC, welche Lebensmittelvergiftungen, Typhus, Darmentzündungen oder Tuberkulose auslösen, haben jedoch eine Gemeinsamkeit: sie nutzen für den Transport von Virulenzfaktoren spezielle Sekretionssysteme, welche essentiell für ihre Pathogenität sind. Diese Sekretionssysteme stehen im Visier der heutigen medizinischen Grundlagenforschung, da die zugrundeliegenden Transportmechanismen neue Angriffspunkte für antibakterielle Medikamente bieten. Das Verständnis von Proteintransportwegen auf molekularer Ebene trägt damit erheblich zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze in der Behandlung von Infektionskrankheiten und der Bekämpfung von resistenten Keimen bei.

Die gezielte Erforschung von Proteinsekretionssystemen in *E. coli* spielt auch für die Biotechnologie eine Rolle. Seit Mitte der 70er Jahre wird *E. coli* als Wirtsorganismus für die Produktion von Aminosäuren, Biotreibstoffen sowie zahlreichen medizinisch relevanten (nicht-glykosylierten) Proteinen, z.B. von Insulin, Antikörperfragmenten und Wachstumshormonen verwendet.

Mit der vollständigen Genomsequenzierung wurden gezielte Eingriffe in die Regulation der Genexpression sowie die Steuerung von Stoffwechselwegen ermöglicht (*metabolic engineering*). Mit Hilfe solcher gentechnisch veränderten *E. coli* –Stämme konnten die Produktausbeuten bei der heterologen Proteinproduktion erheblich gesteigert werden.

Die biotechnologische Verwendung von *E. coli* birgt trotz der vielen Vorzüge dieses Modellorganismus jedoch auch entscheidende Nachteile. Die ausschließlich intrazelluläre Proteinsynthese erfordert zur Produktgewinnung einen Zellaufschluss. Die daraus resultierende

Verunreinigung der gewünschten Produkte mit zelleigenen Proteinen macht zeit- und kostenintensive Reinigungsprozesse zwingend erforderlich. Zudem sind die Proteine aufgrund ihrer intrazellulären Lokalisation einer erhöhten Proteolyse durch zelleigene, cytosolische Proteasen ausgesetzt und neigen darüber hinaus, nicht zuletzt aufgrund der starken Überexpression, zur Bildung von unlöslichen, meist biologisch inaktiven Aggregaten, den sogenannten *inclusion bodies*. Dies trifft insbesondere für heterolog überexprimierte Proteine mit Disulfidbrücken zu, welche unter den reduzierenden Bedingungen im Cytoplasma nicht korrekt falten können und infolgedessen aggregieren. Zur Rückgewinnung aktiver Proteine sind anschließend aufwendige Rückfaltungs- und Aufreinigungsschritte erforderlich.

Eine naheliegende Lösung dieser Probleme bietet die periplasmatische Expression solcher Proteine in *E. coli*. Dabei werden diese nach der Synthese im Cytosol mittels zelleigener Transportsysteme über die Cytoplasmamembran in den periplasmatischen Raum exportiert, welcher durch eine zusätzliche äußere Membran von der extrazellulären Umgebung abgegrenzt wird. Anders als im Cytosol herrschen im Periplasma von *E. coli* oxidierende Bedingungen, wodurch die Ausbildung von Disulfidbrücken ermöglicht wird. Durch die parallele Überproduktion von Dsb (*disulfide bond*)-Proteinen, welche die Disulfidbrückenbildung im Periplasma katalysieren, kann die Ausbeute an nativem rekombinanten Protein erheblich gesteigert werden. Daher wird heutzutage auch viel Aufwand zur Optimierung des Exports heterolog exprimierter Proteine über die Plasmamembran von Bakterien betrieben.

Die bakteriellen Proteinsekretionssysteme sind sehr vielfältig und die zugrundeliegenden Mechanismen noch nicht für jedes System vollständig aufgeklärt. Eines dieser Transportsysteme steht im Fokus der vorliegenden Arbeit.

II. Theoretischer Hintergrund

1 Proteinsekretionssysteme in Gram-negativen Bakterien

Der Transport von Proteinen über biologische Membranen ist ein essentieller Prozess in allen lebenden Organismen und stellt eine der größten Herausforderungen für prokaryotische und eukaryotische Zellen dar. Mit Ausnahme von nichtribosomalen Peptiden, erfolgt die bakterielle Proteinsynthese an den cytoplasmatisch lokalisierten Ribosomen. Der Funktionsort von 20% bis 30% aller Proteine liegt jedoch außerhalb der Cytoplasmas (Holland, 2010; Pugsley, 1993). Deshalb benutzen Bakterien verschiedene Transportsysteme um Proteine entweder in oder an ihre Cytoplasmamembran zu transportieren (integrale und periphere Membranproteine), als Virulenzfaktoren direkt in Wirtszellen zu injizieren oder in den extrazellulären Raum zu sekretieren (z.B. Abbauenzyme). Im Gegensatz zu Gram-positiven Bakterien ist die Zellhülle Gram-negativer Bakterien aus zwei Membranen aufgebaut, der inneren Cytoplasmamembran und einer äußeren Membran, welche die Zelle von der Umgebung abgrenzt. Zwischen den beiden Membranen ist die Zellwand als eine dünne Mureinschicht in den periplasmatischen Raum eingelagert. Liegt der Bestimmungsort der Proteine außerhalb der Zelle, so müssen bei Gram-negativen Bakterien somit zwei Membranen überwunden werden.

Der Transportprozess kann dabei direkt über beide Membranen oder in zwei unabhängigen Schritten über die jeweilige Membran erfolgen. In Gram-negativen Bakterien sind inzwischen neun verschiedene Kategorien von Proteinsekretionssystemen bekannt (Typ I bis Typ IX), welche sich in der Natur der zu transportierenden Proteine, dem Aufbau der Sekretionsmachinerie, dem Sekretionsmechanismus und der Energiequelle für den Sekretionsprozess unterscheiden (Abbildung 1). Diese vielfältigen Sekretionssysteme kommen jedoch nicht allesamt in allen Gram-negativen Bakterien vor, sondern beschränken sich oft auf pathogene Bakterienspezies. Daher wird in der Regel nur ein geringer Anteil der transportierten Proteine in den extrazellulären Raum ausgeschieden. Der Großteil der extracytosolischen Proteine liegt hingegen membrangebunden oder löslich im Periplasma vor.

Das Typ I-Sekretionssystem (z.B. α -Hämolysin-Transportsystem uropathogener *E. coli* spp.), das Typ III-Sekretionssystem (z.B. Ysc-Yop-System pathogener *Yersinia* spp.) sowie der Typ VI-Sekretionsweg (z.B. H1-T6SS aus *Pseudomonas aeruginosa*), welcher hauptsächlich in antagonistische, selten auch symbiotische Interaktionen mit prokaryotischen und eukaryotischen Wirtszellen involviert ist, transportieren cytolytische und cytotoxische Proteine in einem Schritt in das extrazelluläre Milieu oder injizieren diese direkt in das Innere von Wirtszellen (Jani & Cotter, 2010; Notti & Stebbins, 2016; Thomas *et al.*, 2014). Die Sekretion von Proteinen über das Typ IV-Sekretionssystem, welches die Fähigkeit besitzt DNA und DNA-Protein-Komplexe in Wirtszellen zu transportieren, erfolgt zumeist direkt über beide Membranen (VirB-System von *Agrobacterium* spp.) (Christie *et al.*, 2014; Zupan *et al.*, 1998). In wenigen Fällen kann diese aber auch in zwei Schritten vollzogen werden (Pertussis-Toxin von *Bordetella pertussis*) (Winans *et al.*, 1996).

Die übrigen Sekretionssysteme transportieren Proteine ausschließlich über die äußere Membran in den extrazellulären Raum. Das Typ II-Sekretionssystem (z.B. das Pullulanase-Sekretionssystem in *Klebsiella pneumoniae*) dient der Sekretion von bakteriellen Toxinen und Abbauenzymen (d'Enfert *et al.*, 1987; Sandkvist, 2001). Der Typ V-Sekretionsweg umfasst fünf verschiedene Typen von Autotransporter-Proteinen und "Zwei-Partner"-Sekretionssystemen (T5aSS bis T5eSS), welche für den Transport großer Proteine, u.a. Proteasen, Invasionsfaktoren und Adhäsinen, genutzt werden (z.B. die T5a-Autotransporter-IgA1-Protease von *Neisseria gonorrhoeae*) (Fan *et al.*, 2016; Guerin *et al.*, 2017).

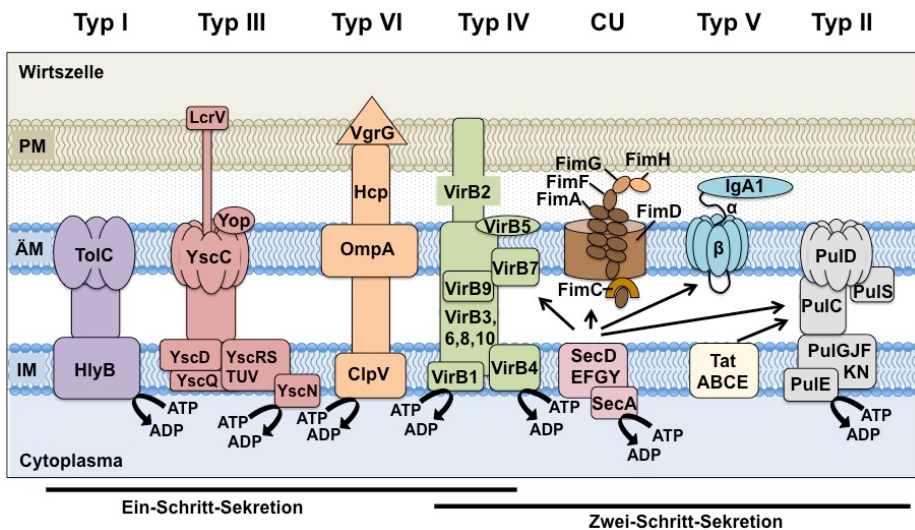


Abbildung 1: Proteinsekretionssysteme in Gram-negativen Bakterien. Dargestellt sind die am besten untersuchten Proteinsekretionssysteme Gram-negativer Bakterien: Typ I-Sekretionssystem (α -Hämolysin-Transporter HlyB-HlyD-TolC in *E. coli*), Typ II-Sekretionssystem (Pullulanase-Transporter in *Klebsiella pneumoniae*), Typ III-Sekretionssystem (Ysc-Yop-System pathogener *Yersinia* spp.), Typ IV-Sekretionssystem (VirB-System von *Agrobacterium* spp.), Typ V-Sekretionssystem (T5a-Autotransporter-IgA1-Protease aus *Neisseria gonorrhoeae*), Typ VI-Sekretionssystem (H1-Typ VI-Sekretionssystem aus *Pseudomonas aeruginosa*), CU – Sekretionssystem (Typ-1-Fimbrien uropathogener *E. coli* spp.), Sec-System und das Tat-System. Nicht dargestellt sind die Proteinsekretionssysteme VIII und IX. Die drei Sekretionssysteme Typ II, Typ V und CU, in *Bordetella pertussis* auch das Typ IV-Sekretionssystem, transportieren Proteine aus dem Periplasma über die äußere Membran und sind von den generellen Sekretionssystemen Sec (Typ II, Typ V, CU, Typ IV) und Tat (Typ II), die Proteine aus dem Cytoplasma über die innere Membran ins Periplasma translokieren, abhängig (Zwei-Schritt-Sekretion). Die Sekretionssysteme Typ I, Typ III, Typ VI und zumeist auch Typ IV transportieren Proteine in einem Schritt über beide Membranen und scheiden diese entweder in den extrazellulären Raum aus oder injizieren diese direkt in Wirtszellen (Ein-Schritt-Sekretion). PM: Plasmamembran der Wirtszelle; ÄM: Äußere bakterielle Membran; IM: Innere bakterielle Membran; CU: Chaperon/Usher; OmpA: outer membrane protein A.

Über das Chaperon/Usher-Sekretions- und Assemblierungssystem sowie das Typ VIII-Sekretionssystem werden lange adhäsive Polymere, die sogenannten Pili, oder entzündungsfördernde, amyloide Curli-Fimbrien in der äußeren Membran von uropathogenen bzw. enterohämorrhagischen *E. coli*-Stämmen verankert, welche für Zell-Zell-Kontakte und die Anheftung an Wirtszellen verantwortlich sind (Thanassi *et al.*, 1998; Van Gerven *et al.*, 2015). Das kürzlich entdeckte Typ IX-Sekretionssystem transportiert Adhäsionsproteine über die äußere Membran, welche für die gleitende Bewegung von *Flavobacterium johnsoniae* sowie mehreren

Vertretern des Phylums *Bacteroidetes* essentiell sind (McBride & Zhu, 2013; Sato *et al.*, 2010; Shrivastava *et al.*, 2013).

Bei allen zweistufigen Sekretionsmechanismen erfolgt der erste Transportschritt über die Cytoplasmamembran zumeist über das generelle *Secretion* (Sec) –System. Im Falle des TypII-Sekretionssystems konnte gezeigt werden, dass zwei Phospholipasen aus *Pseudomonas aeruginosa* über das alternative *Twin Arginine Translocation* (Tat)- System in das Periplasma transloziert werden (Voulhoux *et al.*, 2001). Im folgenden Kapitel werden die beiden Transportwege über die Cytoplasmamembran näher beschrieben. Der Fokus wird auf die Tat-abhängige Proteintranslokation gerichtet, welche im Zentrum der vorliegenden Arbeit steht.

2 Sec-abhängige Proteintranslokation über die Cytoplasmamembran

Bakterien haben eine Vielzahl von Sekretionssystemen entwickelt, um Proteine über Zellmembranen zu transportieren (siehe Abschnitt 1), jedoch sind nur zwei dieser Transportwege in nahezu allen Bakterienspezies vorhanden: das Sec-System sowie das Tat-System. Das wichtigste und am besten charakterisierte Proteintransportsystem stellt die Sec-Translokase dar. Diese ist für die Lebensfähigkeit der Organismen essentiell und ubiquitär in allen drei Domänen des Lebens vorhanden (Beckwith, 2013; Denks *et al.*, 2014; Tsigotaki *et al.*, 2017). *E. coli* nutzt das Sec-System um 96% aller extracytosolischen Proteine entweder als Exportproteine über die Membran zu transportieren oder als Membranproteine in die Cytoplasmamembran zu integrieren (Randall & Hardy, 1986). Diese duale Funktion unterscheidet die Sec-Translokase funktionell von der YidC-Insertase, deren Rolle auf die Integration von Membranproteinen beschränkt ist (Hennon *et al.*, 2015).

Eine charakteristische Eigenschaft des Sec-Systems ist, dass die zu transportierenden Proteine in entfalteter Konformation vorliegen müssen.

2.1 Aufbau und Funktion des bakteriellen Sec-Translocons

Den Kern des bakteriellen Sec-Systems bildet der SecYEG-Translokationskanal - ein essentieller und evolutionär konservierter Proteinkomplex aus drei integralen Membranproteinen, welcher in die innere Membran eingebettet ist und die zu transportierenden Proteine in oder durch die Membran schleust (Denks *et al.*, 2014). Homologe finden sich in der Membran des endoplasmatischen Retikulums von Eukaryoten sowie in Archaeen. Die essentielle Komponente SecY besteht aus zehn transmembranen Domänen, die in zwei Hälften um einen zentralen Kanal angeordnet sind (Nishiyama *et al.*, 1991; Van den Berg *et al.*, 2004). Der Translokationskanal ist zum Cytoplasma und zum Periplasma hin geöffnet, wobei sich in der Mitte der Lipiddoppelschicht eine zentrale, ringförmige Konstriktion befindet, welche einen unkontrollierten Ioneneinstrom während der Translokation verhindern soll (Van den Berg *et al.*, 2004). Neben SecY stellt auch SecE eine für die Funktion der Sec-Translokase essentielle Komponente dar und ist zur Aufrechterhaltung der Komplexstabilität zwingend erforderlich (Kihara *et al.*, 1995; Pohlschroder *et al.*, 1996; Schatz *et al.*, 1991). Die dritte Komponente SecG ist peripher an den SecYE-

Komplex assoziiert. Unter normalen Wachstumsbedingungen wird SecG zwar nicht zwingend für die Funktionalität der Translokase benötigt, wirkt jedoch stimulierend auf den Translokationsprozess, erleichtert die Interaktion von SecY mit SecA (s.u.) und trägt zur SecYEG-Komplexstabilität bei (Belin *et al.*, 2015; Morita *et al.*, 2012; Nishiyama *et al.*, 1993; Nishiyama *et al.*, 1994).

Der SecYEG-Komplex ist mit einem weiteren, nicht essentiellen heterotrimeren Komplex aus den Komponenten SecD, SecF und YajC assoziiert (Pogliano & Beckwith, 1994). Bis heute wurden mehrere Funktionsweisen für SecDF-YajC vorgeschlagen, dennoch ist die Rolle dieser Proteine am Translokationsprozess noch nicht vollständig aufgeklärt (Duong & Wickner, 1997). Aktuelle Studien suggerieren, dass die Membranproteine SecD und SecF direkt an der Translokation des Vorläuferproteins durch die Membran beteiligt sind und die protonenmotorische Kraft (PMK) dafür nutzen, einen Zug auf die Polypeptidkette von der *trans*-Seite der Membran aus auszuüben und auf diese Weise die Translokation zu stimulieren (Lycklama & Driessen, 2012; Tsukazaki *et al.*, 2011).

Neben der Funktion als eigenständige Membranprotein-Insertase assoziiert YidC auch mit dem SecYEG-Komplex und unterstützt die Assemblierung polytooper Membranproteine sowie den Proteintransfer durch die laterale Öffnung im Translokationskanal in die Lipiddoppelschicht (Beck *et al.*, 2001; Urbanus *et al.*, 2001).

Neben dem SecYEG-Translokton, stellt SecA eine weitere essentielle Komponente des Sec-Systems dar, die durch ATP-Hydrolyse zusammen mit der PMK (van der Laan *et al.*, 2004) die Translokation der Proteine durch den Sec-YEG-Kanal über die innere Membran energetisiert (Economou & Wickner, 1994; Schiebel *et al.*, 1991).

2.2 Co- und posttranslatinaler Proteintransport über das Sec-System

Der Proteintransport durch das Sec-System kann sowohl cotranslational während der ribosomalen Proteinsynthese als auch posttranslational nach Beendigung der Translation erfolgen (De Geyter *et al.*, 2016; Tsirigotaki *et al.*, 2017). Alle Sec-abhängigen Exportproteine sowie einige Membranproteine werden als Vorläuferproteine mit abspaltbaren, N-terminalen Signalpeptiden synthetisiert, die als Sortierungs- und Zielsteuerungssignale fungieren (Chatzi *et al.*, 2013; Hegde & Bernstein, 2006; von Heijne, 1990). In Membranproteinen übernimmt zumeist die erste Transmembrandomäne, welche als Signalankersequenz bezeichnet wird, diese Funktion.

Integrale Membranproteine sowie einige Exportproteine, z.B. die periplasmatische Thiol-Disulfid-Oxidoreduktase DsbA aus *E. coli* (Schierle *et al.*, 2003), werden cotranslational durch das SecYEG-Translokton in die Membran integriert bzw. ins Periplasma transportiert (SRP-abhängiger Translokationsweg) (Abbildung 2). Die meisten Exportproteine werden jedoch posttranslational über den SecA/SecB-abhängigen Transportweg über die Cytoplasmamembran transloziert (s.u.).

Um eine Aggregation der hydrophoben Membranproteine im wässrigen Milieu des Cytoplasmas zu verhindern, werden diese bereits während der Translation als Ribosomen-assoziierte naszierende Polypeptidketten zur Sec-Translokase dirigiert. Diese Steuerungsfunktion übernimmt

das „*signal recognition particle*“ (SRP), eine GTPase, die neu synthetisierte, hydrophobe Signalankersequenzen von Membranproteinen bzw. stark hydrophobe Signalpeptide bestimmter Exportproteine an den Ribosomen erkennt und bindet (Akopian *et al.*, 2013; Gu *et al.*, 2003). Die Bindung von SRP führt zur Verzögerung der Translation (Fluman *et al.*, 2014). Der Komplex aus SRP, Ribosom und naszierender Polypeptidkette interagiert anschließend mit dem SRP-Rezeptor FtsY. Dieser liegt aufgrund von direkten Wechselwirkungen mit dem SecYEG-Komplex und Membranlipiden fixiert in der Membran vor und besitzt zwei GTP-bindende Domänen (Angelini *et al.*, 2005; Parltz *et al.*, 2007). Durch die Interaktion von SRP mit dem Rezeptor wird die GTPase-Aktivität beider Proteinpartner aktiviert. Die membranständige Positionierung des Rezeptors in unmittelbarer Nähe zu SecYEG erlaubt die direkte Übergabe des Ribosomen-Substrat-Komplexes an den SecYEG-Translokationskanal (Bernstein & Hyndman, 2001). Die Hydrolyse des von SRP und FtsY gebundenen GTP führt schließlich zur Freisetzung des SRPs vom Rezeptor, wobei die Proteinsynthese cotranslational an der Membran fortgesetzt und das Protein lateral über die zentrale Öffnung des SecYEG-Kanals in die Lipiddoppelschicht inseriert bzw. über die Membran transloziert wird (s.u) (Akopian *et al.*, 2013). Die Integration von Membranproteinen in die Membran sowie deren Faltung werden von der akzessorischen Insertase YidC unterstützt (Kol *et al.*, 2008). Die Proteininsertion in die Membran ist in der Regel nicht von der ATPase-Aktivität von SecA und/oder der PMK abhängig und wird stattdessen von der Elongation der naszierenden Polypeptidkette an den Ribosomen energetisiert. Für den Transport größerer hydrophiler Domänen wird jedoch die Beteiligung von SecA benötigt (Dalbey & Chen, 2004; Neumann-Haefelin *et al.*, 2000).

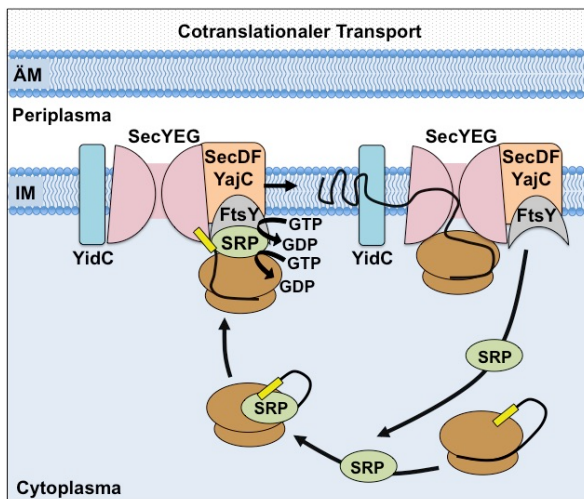


Abbildung 2: Cotranslationaler Transport von Membranproteinen über das Sec-System (SRP-abhängiger Translokationsweg). Entfaltete Proteine mit aminoterminalen hydrophoben Signalankersequenzen (gelb) werden co-translational von dem Signalerkennungspartikel (SRP; grün) erkannt und gebunden. Der Komplex aus Ribosom, naszierender Polypeptidkette und SRP bindet an der Membran an den SRP-Rezeptor FtsY (grau). Durch GTP-Hydrolyse wird SRP vom Rezeptor freigesetzt, der Ribosom-Substrat-Komplex an den SecYEG-Translokationskanal (rosa) übergeben und die Polypeptidkette lateral durch die zentrale Öffnung des SecYEG-Kanals in die Membran inseriert, wobei die Proteintranslation fortgesetzt wird. ÄM: äußere Membran; IM: innere Membran.

Der Transport von Exportproteinen, deren Bestimmungsort das Periplasma, die äußere Membran oder der extrazelluläre Raum darstellt, erfolgt in der Regel posttranslational und wird durch die ATP-Hydrolyse durch SecA und die PMK getrieben (Koch *et al.*, 1999; Koch & Müller, 2000) (Abbildung 3). Im Vergleich zu Proteinen, welchen den SRP-abhängigen Translokationsweg

nutzen, weisen die Signalpeptide dieser Exportproteine in der Regel eine geringere Hydrophobizität auf.

Die Zielsteuerung der zu transportierenden Proteine an den SecYEG-Translokationskanal erfolgt durch SecA, das an die N-terminalen Signalpeptide bindet (Akita *et al.*, 1990; Karamyshev & Johnson, 2005). Diese Bindung kann bereits während der Proteintranslation an den Ribosomen (Huber *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2014), frei im Cytoplasma oder an der Membran, nachdem das Vorläuferprotein von SecB und anderen Chaperonen zum SecYEG-gebundenem SecA geleitet wurde, erfolgen (Fekkes *et al.*, 1998; Oh *et al.*, 2011; Randall *et al.*, 1998a; Saio *et al.*, 2014).

Das Chaperon SecB dient dabei der Aufrechterhaltung der entfalteten, Transport-kompetenten Konformation der Vorläuferproteine bis zum Erreichen des SecYEG-Translokationskanals (Hoffmann *et al.*, 2012; Randall *et al.*, 1998b).

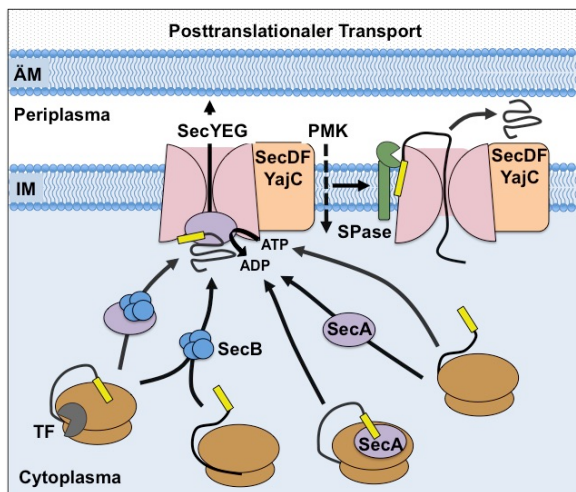


Abbildung 3: Posttranslationaler Sec-abhängiger Transport von Proteinen über die Cytoplasmamembran (SecA/SecB-abhängiger Translokationsweg). Entfaltete Proteine mit aminoterminalen Signalpeptiden (gelb) werden posttranslational von SecA (violett) an den SecYEG-Translokationskanal (rosa) für den ATP- und PMK-abhängigen Transport über die Membran übergeben. SecA bindet das Signalpeptid co- oder posttranslational im Cytoplasma, oder an der Membran, nachdem das Vorläuferprotein ggf. von Chaperonen (TF (grau), SecB (blau)) zum SecYEG-gebundenen SecA geleitet wurde. SecDF-YajC (orange), YidC (hellblau) erhöhen die Translokationseffizienz; Signalpeptidase (SPase; dunkelgrün) spaltet das Signalpeptid nach der Translokation ab. AM: äußere Membran; IM: innere Membran; TF: Triggerfaktor. PMK: Protonenmotorische Kraft.

Während der Proteintranslation an den Ribosomen bindet der Ribosomen-assoziierte Triggerfaktor (TF) an die naszierenden Exportproteine und verhindert deren Einleitung in den SRP-abhängigen Translokationsweg. Dadurch wird eine posttranslationale Interaktion dieser Proteine mit SecA und SecB ermöglicht (Beck *et al.*, 2000). Das nicht essentielle Chaperon SecB (de Cock & Tommassen, 1991; van der Sluis & Driessen, 2006; Xu *et al.*, 2000) bindet anschließend posttranslational an hydrophobe Abschnitte der synthetisierten Vorläuferproteine (Knoblauch *et al.*, 1999). Dadurch, dass SecB eine hohe Affinität für SecA aufweist, unterstützt die Bindung von SecB die Zielsteuerung der Proteine an die Membran. Die Interaktion von SecB mit dem C-Terminus von SecA führt zur Freisetzung des Vorläuferproteins von SecB und zur Bindung des Signalpeptids an SecA, wodurch die SecA-ATPase-Aktivität stimuliert wird (Brundage *et al.*, 1990; Fekkes *et al.*, 1998). Die Bindung von ATP an SecA resultiert in einer Konformationsänderung, die zur Freisetzung des SecB-Proteins und zu einer partiellen Insertion von SecA in die Lipiddoppelschicht führt (den Blaauwen *et al.*, 1996; Economou & Wickner, 1994). Dadurch, dass das Vorläuferprotein zusammen mit SecA teilweise in die Membran inseriert, wird die Translokation des Proteins initiiert. Die Hydrolyse des gebundenen ATP bewirkt

eine Deinsertion von SecA und eine Ablösung des gebundenen Vorläuferproteins, welches im Translokationskanal verbleibt. Durch die Bindung eines weiteren ATP-Moleküls, wiederholt sich der Zyklus der Insertion und Deinsertion von SecA, wobei das Vorläuferprotein in Schritten von 30-40 Aminosäuren durch den SecYEG-Translokationskanal bewegt wird (Schiebel *et al.*, 1991).

Der posttranslationale Proteinexport wird zusätzlich durch die PMK stimuliert (Driessen & Wickner, 1991). *In vitro* wurde gezeigt, dass die PMK die für den Translokationsprozess benötigte ATP-Menge reduziert (Shiozuka *et al.*, 1990). Darüber hinaus kann die PMK auch die richtige Orientierung des Signalpeptids innerhalb des Translokationskanals unterstützen (Nouwen *et al.*, 1996).

Nach der Translokation wird das Signalpeptid durch die Signalpeptidase I abgespalten und das reife Protein an der *trans*-Seite der Membran freigesetzt (Auclair *et al.*, 2012). Die transportierten Proteine können anschließend als Substrate für die zweistufigen Proteinsekretionssysteme (siehe Abschnitt 1) fungieren oder in ihre aktive Konformation im Periplasma, der äußeren Membran, dem extrazellulären Raum oder der Zielzelle falten (De Geyter *et al.*, 2016).

Neben dem Sec-System und der YidC-Insertase, stellt das Tat-System den dritten Haupttranslokationsweg für extracytosolische Proteine in *E. coli* dar. Dieses weist die besondere Eigenschaft auf, Proteine in vollständig gefalteter Konformation zu transportieren.

3 Die Tat-abhängige Proteintranslokation in *E. coli*

3.1 Die Entdeckung und Relevanz des Tat-Systems

Bis zur Mitte der 90er Jahre war nur ein generelles Proteintransportsystem über die innere Membran bekannt: das Sec-System (siehe Abschnitt 2). Jedoch hat der Transport von extracytosolischen Proteinen über diesen Translokationsweg einen entscheidenden Nachteil: die Proteine müssen im entfalteten Zustand vorliegen. Die Translokation von gefalteten Proteinen über die innere bakterielle Membran galt eine lange Zeit als unmöglich. Ende der 80er Jahre gab es dann die ersten experimentellen Hinweise auf ein alternatives Transportsystem. Die Feststellung, dass nur eine Untereinheit eines dimeren Proteins ein Signalpeptid aufweist, ließ die Frage nach dem Transportmechanismus der zweiten Untereinheit aufkommen (Prickril *et al.*, 1986). Weiterhin erforderte der Transport einiger Proteine über die innere Membran den vorherigen Einbau von Cofaktoren, welcher eine Sec-inkompatible, stabile Konformation des Proteins zur Folge hätte (Yoshida *et al.*, 1991). In den folgenden Jahren fiel schließlich auf, dass sich die Signalpeptide Cofaktor-haltiger Proteine in einigen Aspekten von typischen Sec-Signalpeptiden unterscheiden (siehe auch Abschnitt 3.2.1). Diese Signalpeptide waren ungewöhnlich lang und wiesen ein konserviertes Motiv aus zwei benachbarten Argininen auf (Hoeren *et al.*, 1993; Niviere *et al.*, 1992). Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Zwillingsarginin-Motiv und der Translokation gefalteter Proteine wurde erst 1996 von Ben Berks postuliert (Berks, 1996).

In pflanzlichen Chloroplasten wurde bereits Anfang der 90er Jahre ein ATP-unabhängiger Proteintransportweg über die Thylakoidmembran nachgewiesen, welcher als Energiequelle ausschließlich die PMK benötigte: der Δ pH-Weg (Cline *et al.*, 1992; Robinson *et al.*, 1993). Kurze Zeit später wurde festgestellt, dass ein Zwillingsarginin-Motiv im Signalpeptid entscheidend für die Einschleusung der Transportproteine in den Δ pH-abhängigen Translokationsweg ist (Chaddock *et al.*, 1995). Ab diesem Zeitpunkt wurde das neue bakterielle und plastidäre Transportsystem zum Gegenstand zahlreicher Studien. Das Tat-System findet sich darüber hinaus auch in Archaeen. Zudem gibt es bereits erste Hinweise auf ein potentiell funktionales Tat-abhängiges Transportsystem in pflanzlichen Mitochondrien (Carrie *et al.*, 2016).

Über den Tat-Weg werden zumeist gefaltete Cofaktor-haltige und multimere Proteine transportiert, welche in zahlreiche Prozesse wie Energiemetabolismus, Zellteilung, Bewegung, Anpassung von Bakterien an ihre Umgebung sowie Biofilmbildung involviert sind (Palmer & Berks, 2012; Zhang *et al.*, 2009). Zwar ist das Tat-System für die meisten Bakterien nicht essentiell, jedoch können Mutationen in den *tat*-Genen zu Defekten in der Zellteilung, der Integrität der äußeren Membran und im anaeroben Wachstum sowie zu Störungen der Eisenaufnahme und Kupferhomöostase führen (Ize *et al.*, 2004; Jack *et al.*, 2001; Stanley *et al.*, 2001).

Für die medizinische Forschung ist das Tat-System von besonderer Bedeutung, da es für die Pathogenität und die Entfaltung der vollen Virulenz mehrerer humanpathogener Bakterienspezies essentiell ist. In dem Tuberkulose-Erreger *Mycobacterium tuberculosis*, in welchem das Tat-System sogar für die Lebensfähigkeit essentiell ist, werden u.a. die β -Lactamase (BlaC), das Protein Rv2525c und zwei Phospholipasen C (PlcA und PlcB) Tat-abhängig exportiert, die einen Einfluss auf die Virulenz haben (Feltcher *et al.*, 2010; McDonough *et al.*, 2005; Raynaud *et al.*, 2002; Saint-Joanis *et al.*, 2006). Darüber hinaus konnte auch in *Pseudomonas aeruginosa* (Ochsner *et al.*, 2002), *Legionella pneumophila* (Rossier & Cianciotto, 2005), *Helicobacter pylori* (Benoit & Maier, 2014), dem enterohämorrhagischen, Shigatoxin-produzierenden *E. coli*-Stamm O157:H7 (Pradel *et al.*, 2003b) sowie in *Yersinia pseudotuberculosis* (Avican *et al.*, 2017; Lavander *et al.*, 2006) ein entscheidender Beitrag des Tat-Systems zur Pathogenität dieser Bakterien nachgewiesen werden. Das Tat-System stellt daher einen neuen potentiellen Angriffspunkt für antibiotische Medikamente dar, die spezifisch den Tat-abhängigen Proteinexport inhibieren. Dadurch, dass in tierischen Zellen kein Tat-Transportsystem vorliegt, besteht der entscheidende Vorteil gegenüber dem ubiquitären Sec-Systems darin, dass während der Therapie keine oder nur wenige Nebenwirkungen bei Menschen erwartet werden (Bageshwar *et al.*, 2016).

Die Identifizierung solcher Inhibitoren erfordert jedoch detaillierte Kenntnisse über die zugrundeliegenden Mechanismen. Bis heute sind viele mechanistische Aspekte des Tat-abhängigen Translokationsprozesses noch nicht vollständig aufgeklärt. Im Folgenden wird der derzeitige Wissensstand zum Tat-System im Detail dargestellt.

3.2 Das Tat-Substrat

3.2.1 Eigenschaften von Tat-Signalpeptiden

Ebenso wie Sec-Substrate besitzen Tat-abhängige Exportproteine N-terminale Signalpeptide, welche für die korrekte Sortierung und Zielsteuerung an das jeweilige Translokationssystem in der Membran benötigt werden. Sec- und Tat-Signalpeptide weisen eine ähnliche dreigliedrige Struktur auf und sind aus einer positiv geladenen n-Region, einer hydrophoben h-Region und einer polaren c-Region, welche die Erkennungs- und Bindestelle für die Signalpeptidase enthält, aufgebaut (von Heijne, 1990). Mit einer durchschnittlichen Länge von 37 Aminosäuren sind Tat-Signalpeptide signifikant länger als Sec-Signalpeptide (ca. 25 Aminosäuren), was auf eine verlängerte n-Region zurückzuführen ist (Bendtsen *et al.*, 2005). Weiterhin wurde gezeigt, dass Tat-Signalpeptide optimal an die Tat-Translokase des jeweiligen Organismus adaptiert sind und, anders als bei Sec-Signalpeptiden, nicht universell von verschiedenen Tat-Translokasen erkannt werden. Wurde die normalerweise Tat-abhängig exportierte Glucose-Fructose-Oxidoreduktase (GFOR) aus *Zymomonas mobilis* in *E. coli* heterolog synthetisiert, so konnte kein Export über den Tat-Weg nachgewiesen werden (Blaudeck *et al.*, 2001).

Das Tat-Signalpeptid unterscheidet sich noch in weiteren Aspekten grundlegend von Sec-Signalpeptiden. Diese Unterschiede sind für die spezifische Translokation der Substrate über das Tat-System entscheidend und werden im Folgenden ausführlich erläutert (Abbildung 4).

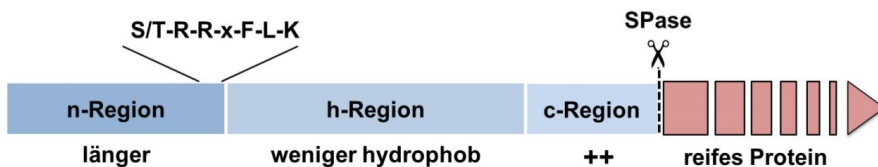


Abbildung 4: Aufbau des Tat-Signalpeptids. Tat-Signalpeptide sind wie Sec-Signalpeptide aus drei Regionen aufgebaut: einer positiv geladenen n-Region, einer hydrophoben h-Region und einer polaren c-Region, welche die Erkennungs- und Bindestelle für die Signalpeptidase enthält. Im Vergleich zu Sec-Signalpeptiden ist die n-Region von Tat-Signalpeptiden länger und enthält an der Grenze zur h-Region ein konserviertes Tat-Konsensusmotiv S/T-R-R-x-F-L-K. Weiterhin ist die h-Region von Tat-Signalpeptiden weniger hydrophob. Die c-Region enthält zudem positiv geladene Aminosäuren, welche vom Sec-System nicht toleriert werden. SPase: Signalpeptidase.

3.2.1.1 Das Tat-Konsensusmotiv in der n-Region

Die wichtigste Besonderheit von Tat-Signalpeptiden stellt das Vorhandensein des namensgebenden, hochkonservierten *twin arginine* (RR) –Motivs mit der Konsensussequenz $S/T^{-1}-R-R-x-F^{+2}-L^{+3}-K^{+4}$ dar, welches im Übergangsbereich zwischen der n- und h-Region liegt (Berks, 1996). Während Variationen des ersten Arginins in der Regel toleriert werden und nur zu einer Verringerung der Exporteffizienz führen, resultiert der Austausch des zweiten oder beider Argininreste häufig in einem vollständigen Exportdefekt (Alami *et al.*, 2002; Buchanan *et al.*, 2001; Chaddock *et al.*, 1995; Ize *et al.*, 2002b; Stanley *et al.*, 2000; Yahr & Wickner, 2001). Der beobachtete Effekt von Mutationen im Zwillingsarginin-Motiv auf die Tat-abhängige Translokation wird jedoch maßgeblich von der Sensitivität des Reportersystems bestimmt, das zur

Untersuchung des Tat-Transports verwendet wird. In den Studien von Buchanan *et al.* (2001) oder Alami *et al.* (2002) bewirkte bereits die konservative Substitution eines bzw. beider Arginine durch positiv geladene Lysinreste eine Blockade der Tat-abhängigen Translokation (Alami *et al.*, 2002; Buchanan *et al.*, 2001; Mendel *et al.*, 2008). In anderen Studien konnte hingegen ein geringfügiger, residualer Transport in Anwesenheit des Zwillingslysins nachgewiesen werden (Ize *et al.*, 2002b; Kreutzenbeck *et al.*, 2007). Daher wird angenommen, dass das Zwillingsarginin-Motiv eine wichtige, jedoch nicht absolut essentielle Rolle für den Tat-abhängigen Export spielt. Einige native Tat-Substrate weisen auch nur eines der beiden Arginine im Tat-Konsensusmotiv auf (Hinsley *et al.*, 2001; Ignatova *et al.*, 2002).

Die übrigen Aminosäuren des Tat-Konsensusmotivs sind weniger stark konserviert und können teilweise ohne signifikante Verringerungen der Translokationseffizienz durch andere Aminosäuren substituiert werden. Eine Ausnahme stellt hierbei das Phenylalanin an der Position +2 dar, welches zumeist nur in bakteriellen Tat-Signalpeptiden vorkommt (Gerard & Cline, 2007; Stanley *et al.*, 2000). Der Austausch von Phenylalanin gegen andere ähnlich hydrophobe Aminosäuren hat nur geringe Auswirkungen auf die Exporteffizienz (Stanley *et al.*, 2000). Wird Phenylalanin hingegen durch hydrophile Aminosäuren wie Arginin oder Aspartat ersetzt, so führt dies zu einer drastischen Reduzierung bzw. einer vollständigen Inhibierung des Tat-abhängigen Exports (Lausberg *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2006). Die Aminosäuren Serin und Lysin an den Positionen -1 bzw. +4 im Tat-Konsensusmotiv sind in der Regel nicht essentiell (Stanley *et al.*, 2000). Jedoch können auch bestimmte Substitutionen des Serins den Tat-Transport nahezu blockieren (Mendel *et al.*, 2008).

Das Vorhandensein eines Tat-Konsensusmotivs im Signalpeptid ist zwar eine besondere, jedoch nicht ausreichende Eigenschaft, um Substrate spezifisch an das Tat-System in der Cytoplasmamembran zu leiten. Die Übertragung des Tat-Konsensusmotivs an die entsprechende Stelle in einem Sec-Signalpeptid führte nicht zur Umleitung des Substrats in den Tat-abhängigen Transportweg (Brüser *et al.*, 1998). Daher müssen noch weitere Faktoren für die Einhaltung der Tat-Spezifität eine Rolle spielen.

3.2.1.2 Die h-Region

Tat-Signalpeptide unterscheiden sich von Sec-Signalpeptiden auch in der geringeren Hydrophobizität ihrer h-Region. Diese enthält eine höhere Anzahl weniger stark hydrophober Aminosäuren wie Glycin und Threonin, welche anstelle der in Sec-Signalpeptiden häufig auftretenden Leucinreste vorkommen (Cristobal *et al.*, 1999). In einer Arbeit von Cristobal *et al.* (1999) wurde gezeigt, dass die geringere Hydrophobizität von Tat-Signalpeptiden für die spezifische Einschleusung der Substrate in den Tat-abhängigen Translokationsweg entscheidend sein kann. Eine Erhöhung der Hydrophobizität der h-Region des Signalpeptids der Trimethylaminoxid- (TMAO) Reduktase (TorA) (Santini *et al.*, 1998) führte nämlich zur Fehlleitung eines normalerweise Tat-abhängigen Konstruktes in den Sec-Translokationsweg (Cristobal *et al.*, 1999).

Darüber hinaus gibt es experimentelle Hinweise, dass die h-Region von Tat-Signalpeptiden an der Membranbindung von Tat-Substraten beteiligt ist, die vor dem eigentlichen Tat-abhängigen Translokationsprozess erfolgt (siehe auch 3.4.1) (Brüser *et al.*, 2003; Hou *et al.*, 2006; Musser & Theg, 2000; Shanmugham *et al.*, 2006).

Studien zur Untersuchung der Rolle der h-Region von Signalpeptiden bei dem Transport von extracytosolischen Substraten über die Membran beschränken sich weitgehend auf Sec-Signalpeptide. Allerdings wurde von Henry *et al.* (1997) sowie von Cline & Mori (2001) gezeigt, dass die Einführung eines negativ geladenen Aspartatrests in das Zentrum der h-Region den plastidären Δ pH-abhängigen (Tat) Export über die Thylakoidmembran vollständig blockiert. Für den Transport von Proteinen über den Tat-Weg in Chloroplasten ist neben dem Zwillingarginin-Motiv offensichtlich auch eine funktionale h-Region sowie ein bestimmter Grad an Hydrophobizität des Signalpeptids erforderlich (Cline & Mori, 2001; Henry *et al.*, 1997). Jedoch ist nach wie vor unklar, in welchen konkreten Schritt des Tat-abhängigen Translokationsprozesses die h-Region involviert ist.

Für Sec-Signalpeptide wurde bereits eine Mindestlänge der h-Region bestimmt, welche für die Erkennung des Signalpeptids durch SecA und einen effizienten Transport über das Sec-System ausreichend ist. Überraschenderweise konnte die ATPase-Aktivität von SecA auch von dem Tat-abhängigen TorA-Signalpeptid *in vitro*, jedoch nicht *in vivo*, stimuliert werden, das im Vergleich zu den meisten anderen Tat-Signalpeptiden eine relativ stark hydrophobe h-Region aufweist (Kebir & Kendall, 2002). Inwiefern die h-Region von Tat-Signalpeptiden auch spezifisch zur Erkennung des Signalpeptids durch das Tat-System beiträgt, wurde bisher noch nicht untersucht.

Um die Tat-Spezifität von relativ stark hydrophoben Tat-Signalpeptiden aufrecht zu erhalten, weisen diese Tat-Signalpeptide in ihrer c-Region ein Motiv auf, welches von der Sec-Translokase nicht toleriert wird.

3.2.1.3 Die c-Region und der frühe reife Proteinanteil

Die C-terminale Region von Sec- und Tat-Signalpeptiden enthält die Erkennungs- und Bindestelle (A-X-A) für die membranintegrale Signalpeptidase I, die das Signalpeptid nach der Translokation der reifen Proteindomäne in der Regel proteolytisch abspaltet (Lüke *et al.*, 2009). Im Vergleich zu Sec-Signalpeptiden findet sich in der c-Region von Tat-Signalpeptiden eine höhere Anzahl basischer Aminosäuren wie Arginin oder Lysin. Diese verhindern Interaktionen mit dem Sec-System und tragen entscheidend zur spezifischen Einschleusung der Substrate in den Tat-Weg bei (Blaudeck *et al.*, 2003; Bogsch *et al.*, 1997; Cristobal *et al.*, 1999). Dieses sogenannte „Sec avoidance“-Motiv ist insbesondere bei solchen Tat-Signalpeptiden wichtig, deren h-Region ausreichend hydrophob ist um grundsätzlich auch einen Sec-abhängigen Export zu erlauben. Daher führen Mutationen in diesem Motiv oft zu einer Umleitung eines Tat-Substrats in den Sec-Weg (Blaudeck *et al.*, 2003; Ize *et al.*, 2002a).

Alternativ können auch positiv geladene Aminosäuren im N-Terminus des reifen Proteins einen Transport des Substrats über den Sec-Weg verhindern und daher zur Erhaltung der Tat-Spezifität

beitragen. Sec-Substrate enthalten natürlicherweise im frühen reifen Proteinanteil basische Aminosäuren, welche für die Zielsteuerung an die Membran und die Initiierung der Translokation eine Rolle spielen könnten (Andersson & von Heijne, 1991). Mehrere Studien haben gezeigt, dass die Einfügung zusätzlicher positiver Ladungen in den frühen reifen Proteinanteil den Transport über den Sec-Weg jedoch drastisch vermindern oder vollständig blockieren kann (Andersson & von Heijne, 1991; Tullman-Ercek *et al.*, 2007; Yamane & Mizushima, 1988).

Bisher wurde noch nicht aufgeklärt, auf welchen genauen Schritt des Steuerungs- und/oder Translokationsprozesses das „Sec avoidance“-Motiv einwirkt. Eine Studie mit dem artifiziellen Tat-Vorläuferprotein TorA-MalE, in welchem ein Tat-Signalpeptid an den reifen Teil eines nativen Sec-Substrats fusioniert wurde, zeigte jedoch, dass durch dieses Motiv Interaktionen mit dem cytosolischen Chaperon SecB nicht unterbunden werden (Blaudeck *et al.*, 2003). Da die Sec-abhängige Translokation von TorA-MalE durch das „Sec avoidance“-Motiv schließlich verhindert wird, muss der „Sec-Ausschluss“ an einem der nachfolgenden Schritte des Transportprozesses erfolgen.

Tat-Signalpeptide weisen somit mehrere Eigenschaften auf, die diese grundlegend von Sec-Signalpeptiden unterscheiden und für die spezifische Translokation der jeweiligen Substrate über den Tat-Weg entscheidend sind. Das Genom des *E. coli*-Laborstamms K-12 kodiert für 29 potentielle Tat-Signalpeptide (Tullman-Ercek *et al.*, 2007). Tullman-Ercek *et al.* (2007) haben jedoch in dieser Studie gezeigt, dass weniger als die Hälfte dieser Signalpeptide einen strikt Tat-abhängigen Export vermittelt. Wurden die Tat-Signalpeptide an Substrate, welche normalerweise über das Sec-System transportiert werden, fusioniert, so konnte eine Zielsteuerung in den Sec-Weg beobachtet werden. Proteine, welche im Cytoplasma aufgrund von Faltung eine Sec-inkompatible Konformation annehmen, wurden hingegen von den Tat-Signalpeptiden spezifisch zum Tat-System dirigiert (Tullman-Ercek *et al.*, 2007). Offensichtlich können einige Tat-Signalpeptide grundsätzlich einen Export über beide Translokationssysteme vermitteln. In diesen Fällen bestimmt der Faltungszustand des reifen Proteinanteils welcher Translokationsweg eingeschlagen wird.

3.2.2 Der reife Proteinanteil von Tat-Substraten

Zwei Drittel der Tat-abhängigen Substrate in *E. coli* sind Cofaktor-haltige Redoxproteine (Palmer *et al.*, 2005; Stanley *et al.*, 2001), welche bei der anaeroben Atmung eine Rolle spielen wie z.B. Hydrogenasen, die Formiat-Dehydrogenase, die Dimethylsulfoxid (DMSO)-Reduktase oder die Nitrat-Reduktase. Der Einbau von Cofaktoren im Cytoplasma setzt jedoch in der Regel eine Faltung der Proteine voraus. Daher sind Tat-Substrate normalerweise ungeeignet für einen Export über das Sec-System, das auf den Transport entfalteter Proteine beschränkt ist.

Bei den übrigen Tat-Substraten in *E. coli* handelt es sich um periplasmatische Liganden-bindende Proteine sowie Enzyme, welche am Aufbau der Zellhülle beteiligt sind (Lee *et al.*, 2006b). Beispiele für Tat-Substrate ohne Cofaktoren stellen das Protein Sufl, das in die Zellteilung involviert ist, sowie die periplasmatischen Zellwandamidasen AmiA und AmiC dar, die aufgrund

ihrer schnellen Faltungskinetik Tat-abhängig exportiert werden müssen (Bernhardt & de Boer, 2003; Tarry *et al.*, 2009a). Einige Proteine wie das grün fluoreszierende Protein (GFP) benötigen für ihre Faltung Chaperone, welche im Periplasma nicht vorhanden sind. Daher können solche Proteine nur im Cytoplasma ihre aktive Konformation annehmen. Für GFP wurde gezeigt, dass dieses nach einer Sec-abhängigen Translokation ins Periplasma, welche im entfalteten Zustand erfolgte, inaktiv bleibt (Feilmeier *et al.*, 2000; Santini *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2001). Daher handelt es sich bei vielen Tat-Substraten auch um langsam faltende Proteine, welche im Cytoplasma zunächst eine Protease-resistente Konformation annehmen, bevor sie in den periplasmatischen Raum exportiert werden. Wegen ihrer langsamen Faltung aufgrund des Fehlens von benötigten Chaperonen im Periplasma würden diese andernfalls durch periplasmatische Proteasen wie HtrA abgebaut werden (Chang, 2016; Ruiz & Silhavy, 2005).

Eine weitere Gruppe von Tat-Substraten nutzt den sogenannten „hitchhiker“-Mechanismus. In *E. coli* besitzen mindestens acht Proteine kein eigenes Tat-Signalpeptid (Lee *et al.*, 2006b). Diese werden in multimeren Komplexen zusammen mit Untereinheiten, welche ein Tat-Signalpeptid enthalten, transportiert. Zu den Proteinen welche diesen Exportmechanismus nutzen zählen die *E. coli* Hydrogenasen 1 und 2 (Rodrigue *et al.*, 1999), die Aldehyd-Oxidoreduktase PaoABC (Lee *et al.*, 2014) sowie die dimere DMSO –Reduktase, welche aus den Untereinheiten DmsA und DmsB aufgebaut ist, wobei lediglich die DmsA-Untereinheit ein Signalpeptid trägt (Sambasivarao *et al.*, 2000).

Es gibt auch Beispiele für Tat-abhängige Proteine, welche nicht ins Periplasma exportiert werden, sondern in die Membran integriert werden. In *E. coli* stellen mindestens fünf Tat-Substrate potentielle intergrale Membranproteine dar, welche in der Cytoplasmamembran über eine C-terminale, transmembrane α -Helix verankert sind (Hatzixanthis *et al.*, 2003). Ein Beispiel hierfür stellt die Rieske-Eisen-Schwefel-Untereinheit des Cytochrom bc_1 - und Cytochrom b_6f -Komplexes dar, welche in pflanzlichen Chloroplasten (Molik *et al.*, 2001) wie auch in verschiedenen Prokaryoten wie *Paracoccus denitrificans* (Bachmann *et al.*, 2006) oder *Legionella pneumophila* (De Buck *et al.*, 2007) für die Membraninsertion das Tat-System nutzt.

3.2.3 Wechselwirkung von Tat-Substraten mit spezifischen und generellen Chaperonen

Das Tat-abhängige Translokationssystem weist die herausragende Eigenschaft auf Proteine nur im gefalteten Zustand über die innere Membran zu transportieren. Damit auch komplexe Cofaktorhaltige und oligomere Redoxproteine vor dem Export korrekt assembliert werden, interagieren diese häufig mit Chaperonen. Dabei handelt es sich oft um hochgradig spezifische Chaperone, die als „*redox enzyme maturing proteins*“ (REMPs) bezeichnet werden (Kuznietsova *et al.*, 2016; Turner *et al.*, 2004). Das bekannteste Beispiel für ein REMP stellt das spezifische Chaperon TorD der TMAO –Reduktase TorA dar (Genest *et al.*, 2009; Ilbert *et al.*, 2004). Dieses Chaperon bindet an das TorA-Signalpeptid sowie den reifen Teil des gefalteten Apoproteins (Genest *et al.*, 2008; Hatzixanthis *et al.*, 2005; Jack *et al.*, 2004; Pommier *et al.*, 1998). Die Erkennung des TorA-Signalpeptids von TorD erfolgt dabei unabhängig vom Zwillingsarginin-Motiv anhand einer TorA-

spezifischen, einzigartigen Aminosäuresequenz in den hydrophoben oder geladenen Regionen des Signalpeptids (Hatzixanthis *et al.*, 2005; Jack *et al.*, 2004). Die Funktionen von TorD sind vielfältig. Es kann durch die Bindung an TorA den Einbau des Molybdän-haltigen Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid (MGD) –Cofaktors unterstützen, das TorA-Signalpeptid vor dem proteolytischen Abbau schützen sowie die vorzeitige Heranführung des noch nicht vollständig gefalteten Tat-Proteins an die Tat-Translokase verhindern (Genest *et al.*, 2009; Ilbert *et al.*, 2004; Jack *et al.*, 2004). Zudem haben mehrere Studien gezeigt, dass die meisten REMPs direkt mit dem Tat-System interagieren können. Es ist daher möglich, dass die direkte Zielsteuerung vieler Tat-abhängig translozierter Redoxproteine an die Tat-Translokase durch Chaperone erfolgt (siehe auch 3.4.1) (Kostecki *et al.*, 2010; Kuzniatsova *et al.*, 2016; Papish *et al.*, 2003).

Neben den hochspezifischen REMPs können auch generelle Chaperone wie der TF, GroEL, SlyD oder DnaK mit Tat-Substraten wechselwirken (Calloni *et al.*, 2012; Castanie-Cornet *et al.*, 2014; Graubner *et al.*, 2007; Jong *et al.*, 2004; Oresnik *et al.*, 2001). Für das Chaperon DnaK konnte gezeigt werden, dass eine Deletion des entsprechenden Gens den Tat-abhängigen Export der Kupfer-Oxidase CueO vollständig inhibiert. Da DnaK für die Stabilität von CueO nicht essentiell ist, wurde der beobachtete Exportdefekt auf eine gestörte Zielsteuerung des Proteins an die Tat-Translokase zurückgeführt (Graubner *et al.*, 2007). In einer anderen Studie konnte zudem gezeigt werden, dass DnaK die Tat-abhängige Translokation von überproduzierten, artifiziellen Tat-Substraten positiv beeinflusst. Durch eine Überexpression von DnaK-DnaJ konnte der Export des Fusionsproteins TorA-GFP signifikant gesteigert werden (Perez-Rodriguez *et al.*, 2007).

3.2.4 Ausschluss von ungefalteten Tat-Substraten von dem Tat-abhängigen Proteinexport

In vielen Studien wurde gezeigt, dass Proteine im entfalteten Zustand vom Tat-abhängigen Export ausgeschlossen sind (Halbig *et al.*, 1999; Rodrigue *et al.*, 1999; Santini *et al.*, 1998). Dies wirft die Frage nach einer Qualitätskontrolle auf, welche die Zielsteuerung und/oder die Translokation von ungefalteten Proteinen verhindert. Bis heute ist unklar, ob die Tat-Translokase aktiv den Faltungszustand der Substrate überprüfen kann oder ob der Export nicht korrekt gefalteter Proteine aus mechanistischen Gründen nicht möglich ist. Die ersten experimentellen Hinweise auf das Vorhandensein einer intrinsischen Qualitätskontrolle durch die Tat-Translokase lieferten Studien von DeLisa *et al.* (2003), die den Export von Disulfidbrücken-haltigen Proteinen untersuchten. Die alkalische Phosphatase PhoA stellt normalerweise ein Sec-Substrat dar, welches erst nach der Translokation in das reduzierende Milieu des periplasmatischen Raums durch Ausbildung zweier Disulfidbrücken seine aktive Konformation annimmt (Sone *et al.*, 1997). Wurde PhoA an ein Tat-Signalpeptid fusioniert, so konnte das Fusionsprotein nur in einem genetisch modifizierten *E. coli* –Stamm mit oxidierendem Cytoplasma nach erfolgter Faltung Tat-abhängig exportiert werden (DeLisa *et al.*, 2003). Eine weitere Studie suggeriert ebenfalls die aktive Ausübung einer Qualitätskontrolle durch die Tat-Translokase. Durch Isolierung von Mutationen in der Tat-Translokase, die das Qualitätskontrollsystem inaktivierten, konnte der Export nicht korrekt gefalteter Substrate ermöglicht werden. Die Lage dieser Mutationen könnte

dabei auf die Bereiche der Tat-Translokase hinweisen, die in die Überprüfung des Faltungszustands der Substrate involviert sind (Rocco *et al.*, 2012). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass nicht korrekt gefaltete, Tat-abhängige PhoA-Konstrukte prinzipiell zur Tat-Translokase dirigiert, jedoch nicht über die Membran transportiert werden konnten (Panahandeh *et al.*, 2008). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde ein Mechanismus vorgeschlagen, der den Faltungszustand des Substrats an der Tat-Translokase vor dem Export „messen“ und den Abbau nicht korrekt gefalteter bzw. entfalteter Substrate einleiten kann. Es gibt jedoch auch Studien, welche eine derartige intrinsische Qualitätskontrolle durch die Tat-Translokase anzweifeln. Die Ergebnisse einer Arbeit von Lindenstrauss *et al.* (2010) suggerieren, dass die Erkennung und die Degradierung nicht korrekt gefalteter Proteine unabhängig von den Komponenten des Tat-Systems durch cytosolische Proteasen erfolgt. Damit stünden Tat-Substrate unter der Kontrolle eines cytosolischen Qualitätskontrollsystems, das bereits vor den Tat-spezifischen Interaktionen die Proteolyse für den Tat-Transport ungeeigneter Proteine initiiert (Lindenstrauss *et al.*, 2010).

Gegen die aktive Ausübung einer Qualitätskontrolle durch die Tat-Translokase sprechen auch die Studien von Richter und Brüser (2005). Diese haben gezeigt, dass PhoA im ungefalteten Zustand nicht nur an die Tat-Translokase binden, sondern die Tat-abhängige Translokation über die Membran auch initiieren kann, wenn dieses an das Tat-spezifische Signalpeptid des „*high potential iron-sulfur*“ Proteins HiPIP aus *Allochromatium vinosum* fusioniert wird (Richter & Brüser, 2005). In diesem Fall würde eine durch das Tat-System ausgeübte Qualitätskontrolle die Initiierung des Translokationsprozesses verhindern. Inzwischen wurde auch in mehreren Studien gezeigt, dass Substrate bis zu einer bestimmten Größe im ungefalteten Zustand Tat-abhängig exportiert werden können, sofern diese keine großen, exponierten hydrophoben Bereiche aufweisen (Alanen *et al.*, 2015; Cline & McCaffery, 2007; Richter *et al.*, 2007). Damit sei *per se* nicht die entfaltete Konformation, sondern vielmehr die, für ungefaltete Proteine typische, Offenlegung hydrophober Bereiche die Hauptursache für den fehlenden Export durch die Tat-Translokase. Die aktuellen Untersuchungen von Alanen *et al.* (2015) konnten ebenfalls bestätigen, dass auch kleine Disulfidbrücken-haltige Substrate, welche im reduzierenden Cytoplasma eine nahezu native Struktur annehmen können, vom Tat-System akzeptiert werden (Alanen *et al.*, 2015). In diesem Kontext wurde kürzlich von Jones *et al.* (2016) gezeigt, dass die Tat-Translokase auch bestimmte Veränderungen der Oberflächeneigenschaften gefalteter Substrate tolerieren und diese, wenn auch teilweise mit geringerer Effizienz, transportieren kann (Jones *et al.*, 2016).

Diese Beobachtungen suggerieren, dass die Tat-Translokase unter bestimmten Voraussetzungen auch nicht korrekt gefaltete oder ungefaltete Substrate transportieren kann. Ob die dreidimensionale Struktur der Substrate von der Tat-Translokase nach bestimmten Kriterien beurteilt wird oder ob der Ausschluss ungefalteter oder falsch gefalteter Substrate während des Translokationsprozesses aus reinen mechanistischen Gründen erfolgt, ist aufgrund der vielen konträren Studienergebnisse noch nicht vollständig aufgeklärt.

3.3 Komponenten der *E. coli* Tat-Translokase

An der Bildung der Tat-Translokase sind integrale Membranproteine aus nur zwei strukturell unterschiedlichen Proteinfamilien beteiligt, die TatA- und die TatC-Familie. Ein minimales Tat-System enthält jeweils nur ein Protein aus jeder Proteinfamilie und kommt typischerweise in Firmicutes wie *Bacillus subtilis* oder *Staphylococcus aureus* sowie in Archaeen vor. Die meisten Tat-Systeme, darunter auch die am besten untersuchten Systeme in *E. coli* und den pflanzlichen Chloroplasten, weisen eine weitere, funktioniell unterschiedliche Komponente aus der TatA-Familie auf, welche als TatB (bakterielles Tat-System) bzw. Hcf106 (plastidärer Δ pH-Weg) bezeichnet wird. Auch können noch weitere TatA-paralogue Proteine für den Tat-Transport eine Rolle spielen. Beispielsweise besitzt *E. coli* ein drittes Protein aus der TatA-Familie, TatE (Berk, 2015).

Im *E. coli* Genom liegen vier Gene (*tatA*, *tatB*, *tatC* und *tatE*) vor, deren Genprodukte, TatA, TatB, TatC und TatE, an der Bildung der Tat-Translokase beteiligt sind (Sargent *et al.*, 1999; Weiner *et al.*, 1998). Die Gene *tatA*, *tatB* und *tatC* sind dabei mit einem vierten Gen, *tatD*, in einem Operon angeordnet, während das Gen *tatE* monocistronisch an einer anderen Stelle im Genom lokalisiert ist (Jack *et al.*, 2001). In *E. coli* sind lediglich die Komponenten TatA, TatB und TatC für den Tat-abhängigen Export essentiell, welche die orthologen Proteine zu den Tha4-, Hcf106-, und cpTatC-Proteinen des cpTat-Systems pflanzlicher Chloroplasten darstellen (Mori *et al.*, 1999; Mori *et al.*, 2001) (Abbildung 5).

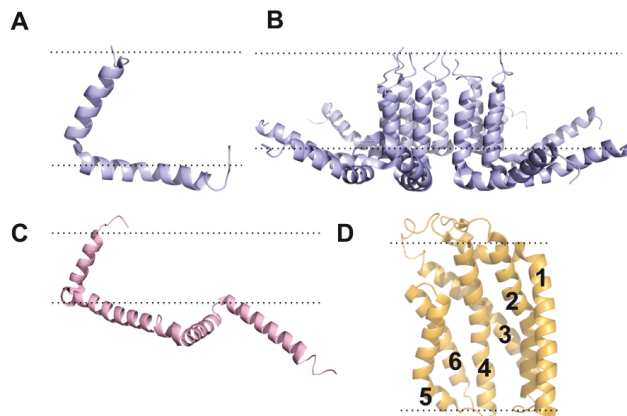


Abbildung 5: Dreidimensionale Strukturen der Tat-Komponenten in Cartoon-Darstellung. A: Monomeres TatA; B: Homooligomerer TatA-Komplex; C: Monomeres TatB; D: Monomeres TatC. Abbildung wurde mit der 3D-Grafiksoftware PyMOL nach den PDB-Strukturen 2LZR (monomeres TatA; (Rodriguez *et al.*, 2013)), 2LZS (homooligomerer TatA-Komplex; (Rodriguez *et al.*, 2013)), 2MI2 (TatB; (Zhang *et al.*, 2014)) und 4B4A (TatC; (Rollauer *et al.*, 2012)) erstellt. Die gestrichelten Linien deuten die cytoplasmatische (untere Linie) bzw. periplasmatische (obere Linie) Seite der inneren Membran an. Die sechs transmembranen Helices von TatC sind nummeriert.

TatD ist ein cytosolisches Protein mit DNase-Aktivität, welches keinen Einfluss auf den Tat-Transport ausübt (Wexler *et al.*, 2000). Die Komponente TatE weist eine Sequenzidentität von 53% zu TatA auf und kann dieses teilweise funktionell ersetzen (Baglieri *et al.*, 2012; Sargent *et al.*, 1998). Deshalb führt nur eine Deletion beider Gene zu einer vollständigen Blockierung des Tat-abhängigen Transports (Jack *et al.*, 2001; Sargent *et al.*, 1998). Die Expression von *tatA* in

den Zellen ist 50fach höher als die von *tatE*, sodass angenommen wurde, dass es sich bei *tatE* lediglich um eine kryptische Genduplikation von *tatA* handelt (Jack *et al.*, 2001). Kürzlich wurde jedoch gezeigt, dass TatE mit den übrigen Komponenten TatA, TatB und TatC interagiert, und daher einen regulären Bestandteil der Tat-Translokase darstellt (Eimer *et al.*, 2015). Es ist jedoch nach wie vor unklar, welche genaue Rolle TatE im Translokationsprozess erfüllt. Im Folgenden werden die essentiellen Komponenten der *E. coli* Tat-Translokase im Detail beschrieben.

3.3.1 TatA

Das aus 89 Aminosäuren bestehende intergrale Membranprotein TatA bildet homooligomere Komplexe unterschiedlicher Größe, von unter 100 kDa bis 700 kDa, die die Passage des Substrats durch die Cytoplasmamembran vermitteln (Dabney-Smith *et al.*, 2006; De Leeuw *et al.*, 2001; Leake *et al.*, 2008; Oates *et al.*, 2005) (Abbildung 5 A, B). TatA ist aus einer kurzen N-terminalen Transmembranhelix (TMH), einer amphipathischen Helix (APH) sowie einer unstrukturierten C-terminalen Domäne aufgebaut (Berks, 2015; Sargent *et al.*, 1998; Settles *et al.*, 1997). Die TMH und APH sind nahezu rechtwinklig in einer L-Form angeordnet, wobei der Winkel von einer kurzen „hinge“-Region mit einem hochkonservierten Glycinrest gebildet wird. Dadurch, dass die TMH zu kurz ist um die Membran vollständig zu durchspannen, kommt es zu einer Schiefstellung des TatA-Moleküls, welche den N-terminalen Teil der APH unter die Membranoberfläche zieht. Der C-Terminus von TatA liegt im Cytoplasma und ist für die Tat-Transport-Aktivität und Oligomerisierung von TatA nicht essentiell (Lee *et al.*, 2002). Der N-Terminus befindet sich wiederum auf der periplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran und stellt mit der TMH, der „hinge“-Region und der APH die funktionell relevanten Bereiche von TatA dar (Koch *et al.*, 2012). Ein polarer Glutaminrest im N-terminalen Bereich der TMH ist hochkonserviert und für die Oligomerisierung von TatA essentiell (Dabney-Smith *et al.*, 2003; Greene *et al.*, 2007). Darüber hinaus konnte den Aminosäuren Phenylalanin und Glycin an den Positionen 20 und 21 in der „hinge“-Region sowie Phenylalanin und Lysin an den Positionen 39 und 40 in der APH des *E. coli* TatA eine wichtige Rolle für die TatA-Funktion zugesprochen werden (Barrett *et al.*, 2005; Hicks *et al.*, 2003; Hicks *et al.*, 2005).

Es wird allgemein angenommen, dass TatA erst bei einem späten Schritt des Translokationsprozesses mit dem Tat-Substrat in Kontakt tritt und nur für dessen Durchschleusung durch die Membran benötigt wird (Cline & Mori, 2001). Es gibt jedoch auch vereinzelte Hinweise darauf, dass das Tat-Substrat nach dessen Zielsteuerung an die Membran zunächst unabhängig vom TatBC-Rezeptorkomplex und einem intakten Zwillingsarginin-Motiv mit frei diffundierenden TatA-Oligomeren interagiert (Taubert *et al.*, 2015). In der Studie von Taubert *et al.* (2015) wurde gezeigt, dass diese initiale Wechselwirkung des Tat-Vorläuferproteins mit TatA einen positiven Einfluss auf die Translokationseffizienz hat. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die in der Membran verteilten TatA-Homooligomere eine Zielsteuerungsfunktion ausüben und dazu dienen, das Tat-Substrat an die wenigen TatBC-Rezeptorkomplexe in der Membran zu übergeben (Taubert *et al.*, 2015).

3.3.2 TatB

Das *E. coli* TatB-Protein besteht aus 171 Aminosäuren und gehört ebenfalls zur TatA-Familie (Abbildung 5 C). TatA und TatB weisen eine ähnliche Topologie und bis zum Ende ihrer APH Sequenzhomologien auf (Sargent *et al.*, 1999). In den minimalen TatAC-Tranlokasen einiger Gram-positiver Bakterien stellt TatA eine bifunktionale Komponente dar, die sowohl die TatA- als auch die TatB-Funktion übernimmt (Jongbloed *et al.*, 2004; Yamada *et al.*, 2007). Auch in *E. coli* können einzelne Aminosäuresubstitutionen im N-Terminus von TatA eine solche Bifunktionalität bewirken (Blaudeck *et al.*, 2005). Im Gegensatz hierzu kann TatA jedoch nicht *vice versa* durch das TatB-Protein funktionell ersetzt werden (Sargent *et al.*, 1999).

TatB ist ähnlich wie TatA aus einer N-terminalen TMH, einer APH, die an der cytoplasmatischen Membranseite aufliegt, sowie einem unstrukturierten, cytoplasmatischen C-Terminus aufgebaut (Koch *et al.*, 2012). Im Vergleich zu TatA sind die APH sowie der C-Terminus von TatB jedoch wesentlich länger (Lee *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2006a; Sargent *et al.*, 1999). Im *E. coli* TatB-Protein befinden sich zwischen der APH und dem C-Terminus zwei zusätzliche Helices, welche eine polare Oberfläche aufweisen und über flexible „linker“-Regionen miteinander verbunden sind (Zhang *et al.*, 2014). Studien an C-terminal verkürzten Varianten der TatB-Komponente aus *E. coli* ergaben, dass der C-Terminus für die Funktion von TatB nicht essentiell ist. So konnte in einem Stamm mit einem C-terminal um die letzten 80 Aminosäuren verkürzten TatB-Protein noch eine signifikante TorA-Aktivität im Periplasma nachgewiesen werden. Erst eine Verkürzung von TatB auf 100 Aminosäuren und weniger wirkte sich erheblich auf den Tat-abhängigen Transport aus (Lee *et al.*, 2002). Während Aminosäuresubstitutionen in der APH von TatA den Tat-Transport in der Regel beeinträchtigen (Greene *et al.*, 2007; Hicks *et al.*, 2005), wirken sich Veränderungen innerhalb der APH von TatB nur geringfügig auf die TatB-Funktion aus (Lee *et al.*, 2006a). Weitere Studien haben jedoch gezeigt, dass Mutationen in der kurzen „hinge“-Region zwischen der TMH und der APH den Tat-abhängigen Export von nativen sowie artifiziellen Substraten drastisch verringern können (Hicks *et al.*, 2003). Wie auch TatA bildet TatB Homooligomere aus, welche jedoch trotz der strukturellen Ähnlichkeiten zu TatA eine andere Funktion im Translokationsprozess erfüllen (siehe Abschnitte 3.3.4 und 3.4.2) (De Leeuw *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2006a).

3.3.3 TatC

Das TatC-Protein stellt die am stärksten konservierte Komponente der Tat-Translokase dar und ist ebenfalls - wie auch TatA und TatB - essentiell für den Tat-abhängigen Export in *E. coli* (Abbildung 5 D). TatC besteht aus sechs transmembranen Domänen sowie einem cytoplasmatisch lokalisierten C- und N-Terminus (Behrendt *et al.*, 2004; Punginelli *et al.*, 2007; Sargent *et al.*, 1998). Die TMH falten dabei zu einer begrenzt flexiblen Struktur, die einer hohlen Hand oder einem Handschuh ähnelt (Ramasamy *et al.*, 2013). Die „Handinnenfläche“ formt dabei einen Hohlraum, welcher auf der periplasmatischen Seite der Membran von einem starren „Deckel“ aus einer Helix und zwei parallelen Loops an der Membranoberfläche vom Periplasma

abgeschirmt wird. Die TMH-5 und TMH-6 von TatC sind zu kurz, um die Membran vollständig zu durchspannen. Dadurch ergibt sich zwischen den beiden Helixenden und dem "Deckel" eine Öffnung, durch die das Substrat während des Transports aus dem Hohlraum ins Periplasma gelangen könnte. In dieser Tasche liegt ein hochkonservierter Glutamatrest, welcher innerhalb der hydrophoben Lipiddoppelschicht eine polare Umgebung kreiert, die zumindest gelegentlich mit dem wässrigen Cytoplasma verbunden ist (Ramasamy *et al.*, 2013; Rollauer *et al.*, 2012). Wird diese Aminosäure durch andere substituiert, so wird der Tat-abhängige Export in *E. coli* stark beeinträchtigt (Buchanan *et al.*, 2002; Holzapfel *et al.*, 2007). In mehreren Studien konnten weitere Mutationen in TatC identifiziert werden, die den Tat-Transport negativ beeinflussen. Unter diesen Mutationen führte lediglich die Substitution des Prolins an Position 48 durch einen Alaninrest im ersten periplasmatischen Loop von TatC zur vollständigen Inaktivierung der Tat-Translokase. Die Mutation P48A inhibiert dabei die Interaktionen zwischen TatB und TatC (Barrett *et al.*, 2005; Holzapfel *et al.*, 2007).

Während der homooligomere Komplex aus TatA-Molekülen den Translokationsschritt über die Membran vermittelt, bilden TatB und TatC einen weiteren Komplex, den sogenannten TatBC-Rezeptorkomplex, welcher für die Erkennung und Bindung des Tat-Substrats verantwortlich ist (de Leeuw *et al.*, 2002).

3.3.4 Der TatBC-Rezeptorkomplex

Der multimer, 360-700 kDa große TatBC-Rezeptorkomplex besteht aus vier bis acht Kopien jeder Untereinheit, welche in einem 1:1 Verhältnis vorliegen (Bolhuis *et al.*, 2001; Celedon & Cline, 2012; McDevitt *et al.*, 2005; Tarry *et al.*, 2009b). Co-Reinigungs- sowie Crosslinking-Studien deuten zudem darauf hin, dass auch eine variierende Anzahl an TatA-Molekülen permanent mit dem TatBC-Rezeptorkomplex assoziiert vorliegt (Bolhuis *et al.*, 2001; de Leeuw *et al.*, 2002). Innerhalb des TatBC-Multimers sind die TatB-Moleküle zu einer kuppelförmigen Struktur angeordnet, welche von einem äußeren Ring aus TatC-Monomeren umgeben wird. Dadurch wird eine Bindetasche für das Substrat kreiert, welche tief in die Membran eingebettet ist (Alcock *et al.*, 2016; Blümmel *et al.*, 2015). Dass das TatBC-Multimer als eine Einheit agiert, wurde bereits in frühen Untersuchungen gezeigt. Mutationen in TatC, welche die Assemblierung des TatBC-Rezeptorkomplex beeinträchtigten, hatten eine negative Auswirkung auf die Bindung und den Transport des Tat-Substrats (Buchanan *et al.*, 2002; Ma & Cline, 2013).

Weitere Studien haben gezeigt, dass der multimer TatBC-Komplex mehrere Substrate zeitgleich binden und transportieren kann. Die dimeren oder tetrameren Substrate binden dabei individuell an jeweils eine TatBC-Rezeptor-Einheit und werden gemeinsam mit einer ähnlichen Effizienz transportiert wie monomere Vorläuferproteine (Ma & Cline, 2010).

3.4 Die Schritte der Tat-abhängigen Proteintranslokation

Der Prozess der Tat-abhängigen Proteintranslokation kann basierend auf dem derzeitigen Wissensstand in drei aufeinander folgende Schritte unterteilt werden: (1) die Zielsteuerung des

Tat-Substrats an die Tat-Translokase, (2) die Erkennung und Bindung des Tat-Substrats durch den TatBC-Rezeptorkomplex und (3) die Translokation des Substrats über die Membran. In den nachfolgenden Unterkapiteln werden die einzelnen Schritte ausführlich beschrieben und zuletzt in der Übersichtsabbildung 6 graphisch zusammengefasst.

3.4.1 Zielsteuerung des Tat-Substrats an die Tat-Translokase

Nach erfolgter Proteinsynthese an den Ribosomen wird die Faltung und Assemblierung vieler Tat-Substrate durch die Bindung von spezifischen (REMPs) sowie generellen Chaperonen unterstützt (siehe auch 3.2.3). Anschließend werden die vollständig gefalteten Tat-Substrate zur Tat-Translokase dirigiert.

Inzwischen gibt es zahlreiche experimentelle Hinweise, dass der Erkennung und Bindung von verschiedenen Tat-Substraten durch die Tat-Translokase ein Schritt vorausgeht, in dem das Tat-Substrat unspezifisch und in Unabhängigkeit von den Tat-Komponenten sowie einem intakten Zwillingsarginin-Motiv an die Membran gesteuert wird (Brüser *et al.*, 2003; Hou *et al.*, 2006; Musser & Theg, 2000; Shanmugham *et al.*, 2006). Es erscheint wahrscheinlich, dass das Tat-Vorläuferprotein dabei mittels des Signalpeptids in die Membran inseriert. Dabei könnten die positiv geladenen Aminosäurereste der n-Region mit den hydrophilen Lipid-Kopfgruppen der Lipiddoppelschicht interagieren, während die hydrophobe Region in die Membran integriert wird (Shanmugham *et al.*, 2006). *In vitro* Untersuchungen mit dem Tat-Substrat HiPIP zeigten, dass eine Membranbindung des Proteins nach der Abspaltung des Signalpeptids nicht mehr möglich war (Brüser *et al.*, 2003). Darüber hinaus konnte in der Arbeit von Hou *et al.* (2006) nach einem proteolytischen Verdau des membrangebundenen chimären 16/23-Proteins ein Protease-resistentes Fragment erhalten werden, welches von der Größe her dem Signalpeptid und dem N-Terminus des reifen Proteinanteils entsprechen könnte. Diese Beobachtungen sprechen für eine vollständige Insertion des Signalpeptids in die proteasegeschützte Umgebung der Membran. Die membrangebundene Form des Tat-Substrats stellt dabei ein funktionelles Intermediat des Tat-abhängigen Transportzyklus dar, das in Abhängigkeit der PMK durch die Tat-Translokase über die Membran transloziert werden kann (Bageshwar *et al.*, 2009).

Das partiell membraninserierte Tat-Substrat könnte anschließend lateral zur Tat-Translokase diffundieren (Brüser & Sanders, 2003; Brüser *et al.*, 2003; Hou *et al.*, 2006; Musser & Theg, 2000; Shanmugham *et al.*, 2006). Die Membraninsertion des Signalpeptids von Tat-Vorläuferproteinen könnte hierbei der richtigen Ausrichtung des Tat-Signalpeptids für die nachfolgende Erkennung und Bindung durch den TatBC-Rezeptorkomplex dienen.

Alternativ können Tat-Substrate auch von Chaperonen zur Tat-Translokase geleitet werden. Für viele Redoxproteine erscheint es wahrscheinlich, dass die Zielsteuerung an die Tat-Translokase in diesen Fällen durch die spezifischen REMPs erfolgt. Mehrere Arbeiten haben gezeigt, dass die meisten REMPs mit den Komponenten des TatBC-Rezeptorkomplexes interagieren und daher als Bindeglied zwischen den Tat-Substraten und der Tat-Translokase fungieren könnten (Kostecki *et al.*, 2010; Kuzniatsova *et al.*, 2016; Papish *et al.*, 2003). In Unabhängigkeit davon, auf welche

Weise die Tat-Substrate zum Tat-abhängigen Translokationssystem gesteuert wurden, erfolgt die erste spezifische Wechselwirkung des Tat-Substrats mit der Tat-Translokase am TatBC-Rezeptorkomplex.

3.4.2 Erkennung und Bindung des Tat-Substrats durch den TatBC-Rezeptorkomplex

Die Tat-abhängige Translokation von Tat-Vorläuferproteinen über die Membran wird durch die Erkennung und Bindung des Tat-Signalpeptids am TatBC-Rezeptorkomplex initiiert (Gerard & Cline, 2007). Die direkte Beteiligung beider Komponenten des TatBC-Rezeptorkomplexes an der Bindung von Tat-Substraten wurde mit Hilfe unterschiedlicher experimenteller Ansätze nachgewiesen, u.a. durch Co-Reinigung des Tat-Vorläuferproteins Sufl mit TatB und TatC oder durch die Identifizierung von Kontakten zwischen Sufl und den beiden Tat-Komponenten in zahlreichen Crosslinking-Experimenten (Alami *et al.*, 2003; McDevitt *et al.*, 2006; Tarry *et al.*, 2009b). Im TatBC-Rezeptorkomplex dient TatC als die primäre Erkennungs- und Bindestelle für das Tat-Konsensusmotiv von Tat-Signalpeptiden. Mehrere Crosslinking-Versuche ergaben, dass der cytoplasmatische N-Terminus sowie der erste cytoplasmatische Loop von TatC das Signalpeptid nach dessen Bindung an die Membran in der Nähe des Tat-Konsensusmotivs kontaktieren (Alami *et al.*, 2003; Panahandeh *et al.*, 2008; Zoufaly *et al.*, 2012). Die Bereiche von TatC, die direkt in die Bindung des Signalpeptids involviert sind, konnten auch mit Hilfe genetischer Ansätze eingegrenzt werden (Kreutzenbeck *et al.*, 2007; Lausberg *et al.*, 2012; Strauch & Georgiou, 2007). Ausgehend von dem exportdefekten Tat-abhängigen Fusionsprotein TorA[KQ]-MalE, in dem das Zwillingsarginin-Motiv durch ein Lysin-Glutamin-Paar substituiert wurde, wurden von Kreutzenbeck *et al.* (2007) Mutationen im TatBC-Rezeptorkomplex isoliert, die den Export signifikant wiederherstellten. Diese Mutationen waren u.a. in dem cytoplasmatischen N-Terminus von TatC lokalisiert, welcher ebenfalls in den Crosslinking-Experimenten als ein Teil der Erkennungs- und Bindestelle für das Tat-Konsensusmotiv identifiziert werden konnte (Kreutzenbeck *et al.*, 2007).

Die Interaktionen zwischen TatC und dem Tat-Signalpeptid sind strikt von einem intakten Zwillingsarginin-Motiv abhängig (Alami *et al.*, 2003). Da die Kontakte zwischen dem Tat-Signalpeptid und TatC auch in Abwesenheit von TatB detektiert werden konnten, wurde von Alami *et al.* (2003) eine hierarchische Abfolge bei der Signalpeptidbindung postuliert, bei der das Signalpeptid zunächst über das intakte Tat-Konsensusmotiv an TatC gebunden und anschließend an TatB übergeben wird.

Es gibt jedoch experimentelle Hinweise, dass Tat-Substrate auch mit einem veränderten Zwillingsarginin-Motiv in ihren Signalpeptiden mit dem TatBC-Rezeptorkomplex assoziieren können. In der Arbeit von McDevitt *et al.* (2006) konnte das Tat-Protein Sufl, welches im Überschuss vorlag, nach einer Substitution des Zwillingsarginins durch zwei Lysin- oder Alaninreste zwar nicht Tat-abhängig exportiert, jedoch mit dem TatBC-Rezeptorkomplex co-gereinigt werden. Darüber hinaus konnten Alami *et al.* (2003) nachweisen, dass Veränderungen im Zwillingsarginin-Motiv nicht zur vollständigen Inhibierung der Interaktionen zwischen einem

exportdefekten Sufl-Protein und TatB führten. Diese Beobachtungen implizieren, dass die Bindung des Tat-Substrats an den TatBC-Rezeptorkomplex in einem zweistufigen Mechanismus stattfinden könnte. Während im ersten Schritt das Tat-Substrat unabhängig vom Zwillingsarginin-Motiv mit dem TatBC-Rezeptorkomplex wechselwirkt, würde erst im nachfolgenden Schritt die spezifische Primärererkennung des Zwillingsarginins durch TatC erfolgen (McDevitt *et al.*, 2006; Panahandeh *et al.*, 2008).

Die Erkennung eines unveränderten Zwillingsarginins im Tat-Konsensusmotiv durch TatC führt anschließend zu einer Bindung des Signalpeptids innerhalb des TatBC-Rezeptorkomplexes. Fröbel *et al.* (2007) haben gezeigt, dass TatC das Signalpeptid auch in Unabhängigkeit von TatB in die Membran inserieren und in einer transmembranen Orientierung positionieren kann. Bei einer Insertion des Signalpeptids in Abwesenheit von TatB wird die Spaltstelle des Signalpeptids auf der periplasmatischen Seite der Membran für die Signalpeptidase zugänglich, wodurch eine vorzeitige Prozessierung des Tat-Vorläuferproteins bewirkt wird (Fröbel *et al.*, 2012). Normalerweise, d.h. in Anwesenheit von TatB, positioniert die von Fröbel *et al.* (2007) postulierte Insertase-Aktivität von TatC das Signalpeptid sowie einige Aminosäuren des frühen reifen Proteinanteils hingegen tief in einer in der Membran eingebetteten, Protease-geschützten Bindetasche, die gemeinsam von beiden Tat-Komponenten gebildet wird. Das Signalpeptid nimmt innerhalb der Bindetasche eine Haarnadel-ähnliche Konformation ein, wobei die h-Region parallel zur TatB-TMH ausgerichtet wird (Alami *et al.*, 2003; Blümmel *et al.*, 2015; Fincher *et al.*, 1998; Gerard & Cline, 2006; Panahandeh *et al.*, 2008). Die Fixierung des Signalpeptids zwischen TatB und TatC verhindert dabei eine vorzeitige Exposition der Signalpeptidspaltstelle vor der Translokation des reifen Proteinanteils über die Membran (Fröbel *et al.*, 2012). Während sich die Kontakte zwischen TatC und dem Signalpeptid weitgehend auf das Tat-Konsensusmotiv beschränken, kontaktiert TatB das tief inserierte Signalpeptid über dessen gesamte Länge sowie den reifen Proteinanteil (Alami *et al.*, 2003). Arbeiten von Maurer *et al.* (2010) haben gezeigt, dass während der Bindung des Signalpeptids die gefaltete, reife Domäne des Tat-Substrats von den amphipathischen Helices mehrerer TatB-Monomere vorübergehend umschlossen wird. Die Bindung des Tat-Substrats an den TatBC-Rezeptorkomplex erfordert hierbei keine Energiequelle (Mori & Cline, 2002).

3.4.3 Translokation des Substrats über die Membran

Die hochaffine, sogenannte „*advanced-stage*“-Bindung des Tat-Signalpeptids tief innerhalb der TatBC-Bindetasche löst über eine Konformationsänderung des TatBC-Rezeptorkomplexes die Rekrutierung von homooligomeren Tat-Komplexen aus, wodurch das translokationskompetente, aktive Tat-Translokon gebildet wird. Auf der Basis von Crosslinking-Studien wird angenommen, dass sich die TatA-Protomere dabei lateral dem gebundenen Tat-Substrat nähern, wobei dabei Kontakte zwischen dem Vorläuferprotein und dem N-Terminus, der TMH sowie der APH von TatA ausgebildet werden (Blümmel *et al.*, 2015).

Kürzlich wurde gezeigt, welche genauen strukturellen Veränderungen im TatBC-Rezeptorkomplex durch die Signalpeptidbindung induziert werden. In Abwesenheit eines Tat-Substrats interagieren polare Aminosäurereste auf einer Seite der TMH von TatB über Wasserstoffbrückenbindungen mit einem polaren Cluster der TMH-5/TMH-6 von TatC. Diese TatB-Bindestelle in TatC ist wahrscheinlich auch die Bindestelle für TatA. Es wird angenommen, dass die Bindung eines Substrats an den TatBC-Rezeptor mechanistisch mit einer Verdrängung von TatB von dieser TMH-5/TMH-6-Stelle verbunden ist, sodass TatA binden, oligomerisieren und den Export des Substrats vermitteln kann (Alcock *et al.*, 2016).

Während die Bindung des Tat-Substrats an den TatBC-Rezeptorkomplex keine Energie benötigt, ist die Rekrutierung der TatA-Oligomere zur Bildung des aktiven Tat-Translokons strikt von der PMK des elektrochemischen Protonengradienten über der Membran abhängig. In diesem Zusammenhang konnten Blümmel *et al.* (2015) zeigen, dass Kontakte zwischen TatA und dem Tat-Vorläuferprotein nach der Dissipation der PMK durch den Entkoppler Carbonylcyanid-*m*-chloro-phenylhydrazon (CCCP) vollständig aufgehoben werden (Blümmel *et al.*, 2015). Im Gegensatz zur Sec-abhängigen Translokation benötigt das Tat-System jedoch keine Nukleosidtriphosphate wie ATP zur Energetisierung des Translokationsprozesses (Cline *et al.*, 1992; Yahr & Wickner, 2001).

Die Membranpassage des gefalteten Proteins ist strikt von der Anwesenheit von TatA abhängig. Derzeit gibt es zwei Hypothesen wie die TatA-Oligomere die Translokation des Tat-Substrats über die Membran vermitteln könnten. Einerseits wurde gezeigt, dass TatA-Moleküle zu ringförmigen Strukturen verschiedener Durchmesser angeordnet sind, welche als Kanal für unterschiedlich große Substrate fungieren könnten (Dabney-Smith *et al.*, 2006; Gohlke *et al.*, 2005). Solche Kanäle könnten durch die konzertierte Insertion der TatA-APH in die Lipiddoppelschicht entstehen und so wassergefüllte Passagen für die Substrate formen (Walther *et al.*, 2013). In *E. coli* konnte die Existenz von unterschiedlich großen Poren mit einem Durchmesser von 30-70 Å bestätigt werden, die für die Membranpassage der bekannten Tat-Substrate ausreichend groß wären (Gohlke *et al.*, 2005). Der Transport von Proteinen durch einen aus TatA-Molekülen aufgebauten Kanal würde jedoch eine vollständige Übergabe des Substrats vom TatBC-Rezeptorkomplex an die Translokationspore erfordern. In einer Studie von Gerard & Cline (2006) wurde jedoch gezeigt, dass das Tat-Signalpeptid während des gesamten Translokationsprozesses über das Tat-Konsensusmotiv an TatC gebunden bleibt (Gerard & Cline, 2006).

In einem alternativen Modell könnten die TatA-Oligomere die Lipiddoppelschicht destabilisieren. Die kurzen Transmembrandomänen würden die Membran demnach punktuell zusammenziehen und dadurch eine Schwächung der Membran bewirken, wodurch das Substrat diese über eine transiente Pore passieren könnte (Brüser & Sanders, 2003; Rodriguez *et al.*, 2013).

In Unabhängigkeit davon, auf welche genaue Weise das Tat-Substrat über die Membran transloziert wird, erfolgt anschließend die Abspaltung des Signalpeptids vom reifen Proteinanteil durch die Signalpeptidase (Lüke *et al.*, 2009; Yahr & Wickner, 2001). Im Anschluss an die Freisetzung des reifen Proteins (Lüke *et al.*, 2009) dissoziiert der TatABC-Komplex in seine Einzelkomponenten (Mori & Cline, 2002).

In Abbildung 6 sind alle Schritte der Tat-abhängigen Proteintranslokation noch einmal graphisch zusammengefasst.

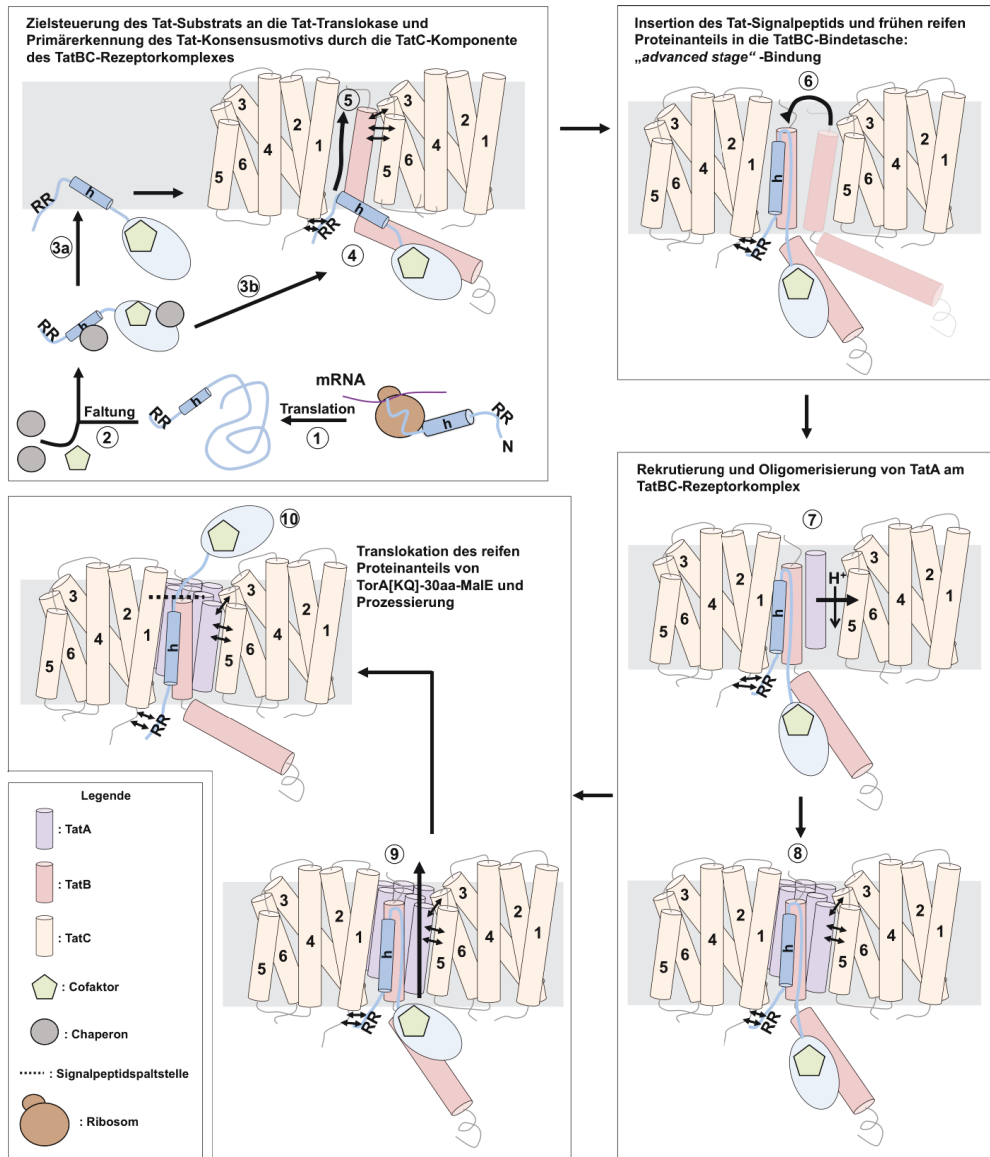


Abbildung 6: Modell der Tat-abhängigen Translokation von gefalteten Proteinen über die Cytoplasmamembran. Während des Tat-abhängigen Bindungs- und Translokationsprozesses ist der TatBC-Rezeptorkomplex aus mehreren Kopien der Komponenten TatB und TatC aufgebaut, welche im 1:1-Verhältnis zueinander vorliegen. Zur Vereinfachung ist in der Abbildung nur ein TatB-Monomer dargestellt, welches von zwei benachbarten TatC-Molekülen umgeben wird. Darüber hinaus sind die APHs der TatA-Oligomere ebenfalls nicht dargestellt. Im ersten Schritt wird das Protein an den Ribosomen vollständig synthetisiert (1). Anschließend unterstützen spezifische und allgemeine Chaperone die korrekte Faltung sowie Oligomerisierung der Proteine und schützen diese vor proteolytischem Abbau. Bei Cofaktor-haltigen Redoxproteinen erfolgt vor dem Export der Einbau des Cofaktors (2). Das vollständig gefaltete Tat-Substrat wird zunächst in einem der TatBC-Rezeptorbindung vorausgehenden Schritt unspezifisch an die Membran gebunden, bevor dieses dann lateral an den TatBC-Rezeptorkomplex diffundiert (3a). Alternativ werden Tat-Substrate von Chaperonen zur Tat-Translokase dirigiert (3b). Am TatBC-Rezeptorkomplex erfolgt die Primärerkenntnis des Tat-Konsensusmotivs durch TatC, welche strikt von dem Vorhandensein eines Zwillingsarginins abhängig ist (4). In einem vorhergehenden Schritt

könnte das Signalpeptid auch unabhängig vom Zwillingsarginin-Motiv mit dem TatBC-Rezeptorkomplex interagieren. Nach der erfolgreichen Primärerkenntnis werden das Signalpeptid sowie einige Aminosäuren des frühen reifen Proteinanteils durch die Insertase-Aktivität von TatC tief in die TatBC-Bindetasche inseriert (5). Die Signalpeptidbindung induziert eine Konformationsänderung des TatBC-Rezeptorkomplexes (6), welche zur PMK-abhängigen Rekrutierung (7) und Oligomerisierung (8) von TatA führt. Der an den TatBC-Rezeptorkomplex assoziierte TatA-Komplex vermittelt dann die Translokation des Substrats über die Membran (9). Nach der Abspaltung des Signalpeptids durch die Signalpeptidase (10) wird das reife Protein freigesetzt und der TatABC-Komplex dissoziiert. Weitere Details sowie Literaturangaben sind im Text vorzufinden.

3.5 Das TorA-MalE-Reportersystem zur *in vivo* Untersuchung des Tat-abhängigen Exports in *E. coli*

Für die Untersuchung des Tat-abhängigen Translokationsprozesses in *E. coli in vivo* wird ein geeignetes Reportersystem benötigt. Ein gut etabliertes und sehr sensitives Reportersystem stellt dabei das TorA-MalE-Reportersystem dar. Dieses basiert auf dem artifiziellen Tat-Substrat TorA-MalE, in welchem das Signalpeptid der Tat-abhängig translozierten TMAO-Reduktase TorA sowie die ersten acht Aminosäuren des reifen TorA-Proteins (8aa-Region) über eine aus drei Aminosäuren bestehende „linker“-Region an den reifen Proteinanteil des Maltose-Bindeproteins MalE fusioniert worden ist (Abbildung 7 A). In dem alternativen Reporterprotein TorA-30aa-MalE, welches primär in der vorliegenden Arbeit verwendet wird, erfolgte die Fusion des TorA-Signalpeptids an das reife MalE-Protein über eine aus den ersten 30 Aminosäuren des reifen TorA-Proteins bestehende Region (30aa-Region) (Abbildung 7 B).

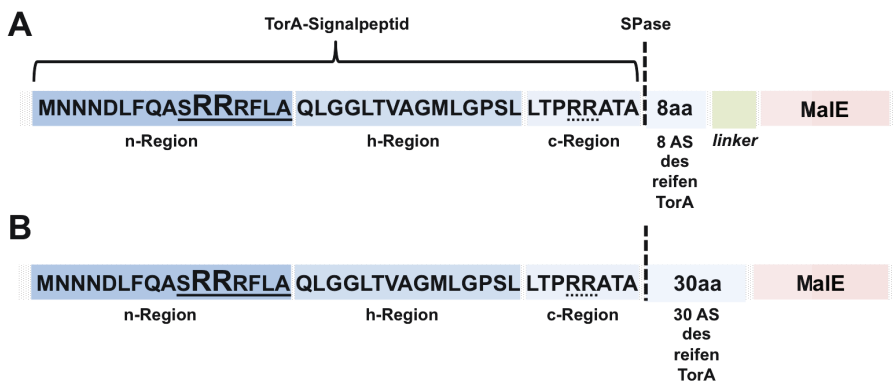


Abbildung 7: Schematischer Aufbau des Reporterproteins (A) TorA-MalE bzw. (B) TorA-30aa-MalE. Das Tat-Konsensusmotiv in der n-Region des TorA-Signalpeptids ist mit einer durchgezogenen Linie, das „Sec avoidance“-Motiv (RR) in der c-Region mit einer gepunkteten Linie unterstrichen. Das Zwillingsarginin im Tat-Konsensusmotiv ist hervorgehoben. Die Signalpeptidspaltstelle (vertikale gepunktete Linie) liegt unmittelbar hinter dem Erkennungs- und Bindemotiv ATA für die Signalpeptidase (SPase). 8aa/30aa: Region, welche aus den ersten acht bzw. 30 Aminosäuren des reifen TorA-Proteins besteht.

Das TorA-Signalpeptid ist mit 39 Aminosäuren überdurchschnittlich lang und weist das nahezu ideale Tat-Konsensusmotiv S-R-R-R-F-L-A auf. Da die h-Region ausreichend hydrophob ist, um einen Sec-abhängigen Export zu erlauben, fungieren zwei positiv geladene Argininreste in der c-Region als das „Sec avoidance“-Motiv und verhindern den Transport über den Sec-Weg (Blaudeck *et al.*, 2003). MalE stellt mit seinem nativen Signalpeptid normalerweise ein Sec-Substrat dar. Wird der reife Proteinanteil von MalE hingegen an das Tat-spezifische TorA-Signalpeptid fusioniert, so erfolgt der Export ins Periplasma strikt Tat-abhängig (Blaudeck *et al.*,

2003). Ein entscheidender Vorteil der Verwendung dieses Fusionsproteins als Reporterprotein besteht darin, dass der Export ins Periplasma eines *malE* –negativen *E. coli* Stamms phänotypisch leicht auf Agarplatten nachgewiesen werden kann.

Das periplasmatische MalE-Protein ist Teil des Maltose-Transportsystems in *E. coli*. Nach der Diffusion von Maltose durch die LamB-Pore (Maltoporin) in der äußeren Membran wird diese im Periplasma an MalE gebunden. Anschließend wird Maltose von MalE zu dem in der inneren Membran lokalisierten ABC-Transporter MalFGK₂ dirigiert, welcher diese unter Hydrolyse von ATP ins Cytoplasma transportiert (Chen, 2013; Hengge & Boos, 1983). Die Tat-abhängige Translokation von MalE über die Cytoplasmamembran ist deshalb direkt mit der Fähigkeit der Zellen verbunden Maltose aufzunehmen, zu verwerten und auf Minimalmedium mit Maltose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle (MMM) zu wachsen sowie rote Kolonien auf pH-Indikatorhaltigen MacConkey-Maltose-Agarplatten (MCM) zu bilden. Die Rotfärbung der Kolonien kann dabei auf die Erniedrigung des pH-Werts durch die Ausscheidung organischer Säuren zurückgeführt werden, welche im Zuge der Maltose-Verstoffwechslung gebildet werden (Blaudeck *et al.*, 2003; Blaudeck *et al.*, 2005; Kreutzenbeck *et al.*, 2007; Lausberg *et al.*, 2012). Die Intensität der Rotfärbung gilt bis zum Erreichen der maximalen Farbtiefe als Maß für die Tat-abhängige Exporteffizienz des TorA-MalE-Reporterproteins.

In der vorliegenden Arbeit wird der *E. coli* –Stamm GSJ101, in welchem das chromosomale *malE* –Gen sowie die *tat* –Gene deletiert sind, als Ausgangsstamm verwendet. Um in diesem Stamm einen Tat-abhängigen Export von MalE zu ermöglichen und infolgedessen auch das Wachstum auf MMM, müssen sowohl TorA-MalE als auch die Tat-Translokase Plasmid-kodiert (pTorA-MalE, pHSG-TatABCE) in diesen eingeführt werden. Wird in dem Stamm GSJ101 (pTorA-MalE, Δ *tat*) nur das Plasmid-kodierte Reporter-gen *torA-malE* exprimiert, so wächst dieser aufgrund des fehlenden Tat-abhängigen TorA-MalE-Exports ins Periplasma nicht auf MMM und bildet auf MCM einen weissen Phänotyp aus. Erst durch die Coexpression der Plasmid-kodierten *tat* –Gene wird ein Wachstum auf MMM und die Bildung roter Kolonien auf MCM ermöglicht. Der *E. coli* –Stamm GSJ101 (Δ *malE*, Δ *tat*) ohne eine funktionale Tat-Translokase eignet sich deshalb insbesondere zur Überprüfung der Tat-Spezifität von veränderten TorA-MalE-Reporterproteinvarianten. Für den Fall dass bestimmte Aminosäureaustausche im TorA-Signalpeptid zu einer Umleitung des jeweiligen Reporters in den Sec-Weg führen würde auch in Abwesenheit der Tat-Translokase Wachstum von GSJ101 (Δ *tat*, pTorA-MalE) auf MMM beobachtet werden.

In den vorhergehenden Arbeiten dieser Arbeitsgruppe wurde das TorA-MalE-Reportersystem bereits vielfach zur Untersuchung der Tat-abhängigen Proteintranslokation in *E. coli* eingesetzt. Diese Arbeiten fokussierten sich dabei auf den Bindungsschritt des Tat-Substrats an den TatBC-Rezeptorkomplex und die Untersuchung jener Interaktionen innerhalb der TatBC-Bindetasche, welche zu einer produktiven Bindung beitragen und folglich zu einer erfolgreichen Translokation des Tat-Substrats über die Membran führen. Hierzu wurden zunächst verschiedene Varianten von TorA-MalE generiert, welche von der Wildtyp-Tat-Translokase nicht mehr über die Cytoplasmamembran transportiert werden konnten. Dieser Exportdefekt wurde durch bestimmte Aminosäureaustausche im TorA-Signalpeptid hervorgerufen, wodurch dieses nicht mehr produktiv

von der wildtypischen Tat-Translokase erkannt und gebunden werden konnte. Ein *malE* – negativer *E. coli* –Stamm GSJ101 (Δ malE, pHSG-TatABCE), der eine exportdefekte Variante von TorA-MalE enthält, ist deshalb nicht in der Lage auf MMM zu wachsen und bildet weisse Kolonien auf MCM. Das veränderte TorA-MalE-Reporterprotein wurde anschließend eingesetzt, um Mutanten zu isolieren, in denen dieser Transportdefekt aufgehoben wird. Erhält ein *E. coli* – Stamm, welcher zuvor nicht auf MMM wachsen konnte, die Fähigkeit zurück Maltose aufzunehmen, so muss durch eine Mutation die produktive Erkennung und Bindung der veränderten TorA-MalE-Reportervariante durch die Tat-Translokase wiederhergestellt worden sein. Diese Suppression des Exportdefekts kann dabei entweder durch Mutationen in den *tat* – Genen oder durch Mutationen im Reportergen erfolgen. Dabei wird angenommen, dass die Lage solcher Suppressormutationen Hinweise auf die funktionell relevanten Bereiche des Tat-Signalpeptids oder der Tat-Translokase gibt, welche in die produktive Bindung des Tat-Substrats involviert sind. Die vorhergehenden Arbeiten von Kreutzenbeck *et al.* (2007) und Lausberg *et al.* (2012) konzentrierten sich auf die Identifizierung solcher Regionen in der Tat-Translokase und werden nachfolgend ausführlicher beschrieben.

3.6 Untersuchung der Interaktionen zwischen Tat-Substraten und den Komponenten der Tat-Translokase mit Hilfe genetischer Ansätze

In den Arbeiten von Kreutzenbeck *et al.* (2007) sowie Lausberg *et al.* (2012) beruhte der genetische Ansatz zur Untersuchung der Interaktionen zwischen Tat-Substraten und den Komponenten der *E. coli* Tat-Translokase auf der Selektion von mutierten Translokasen, die den Export einer Transport-inkompetenten TorA-MalE-Variante wiederherstellen konnten.

Hierfür wurde u.a die TorA-MalE-Variante TorA[KQ]-MalE konstruiert, in welcher die beiden konservierten Argininreste im Tat-Konsensusmotiv durch ein Lysin-Glutamin-Paar substituiert wurden. Die Mutation des Zwillingarginins führte hierbei zu einer vollständigen Inhibierung des Tat-abhängigen Exports. Der entsprechende *E. coli* –Stamm wuchs nicht auf MMM und bildete einen weissen Phänotyp auf MCM aus (Kreutzenbeck *et al.*, 2007; Ulfing *et al.*, 2017).

Das exportdefekte TorA[KQ]-MalE-Protein stellte den Ausgangspunkt für die Mutagenesestudien von Kreutzenbeck *et al.* (2007) dar. Zur Erstellung einer Tat-Mutantenbibliothek wurden die *tat*-Gene *tatABC* und *tatE* mittels „error-prone“ (ep)- PCR zufällig mutagenisiert. Anschließend erfolgte mit Hilfe von Agarplattentests (MMM/MCM) eine Selektion jener mutierten Tat-Translokasen, welche den Exportdefekt von TorA[KQ]-MalE supprimierten. Durch die Identifizierung von Punktmutationen in den N-terminalen, cytoplasmatisch lokalisierten Regionen von TatC sowie im N-Terminus von TatB, die zu einem Aminosäureaustausch führten, konnten die Bereiche des TatBC-Rezeptorkomplexes bestimmt werden, welche direkt oder indirekt in die produktive Bindung des Tat-Substrats involviert sind. Da die mutierten Tat-Translokasen das unveränderte TorA[RR]-MalE -Protein nach wie vor transportierten, wurde hierbei nicht von einer spezifischen Erkennung des Lysin-Glutamin-Paars anstelle des Zwillingarginins nach einem „Schlüssel-Schloss“-Prinzip durch die substituierten Aminosäuren in TatB bzw. TatC ausgegangen (Kreutzenbeck *et al.*, 2007; Lausberg *et al.*, 2012). Auf der Basis dieser Ergebnisse

wurde stattdessen das in Abbildung 8 dargestellte Modell für die Art und Weise der Suppression des Exportdefekts von TorA[KQ]-MalE durch die TatBC-lokaliserten Mutationen vorgeschlagen.

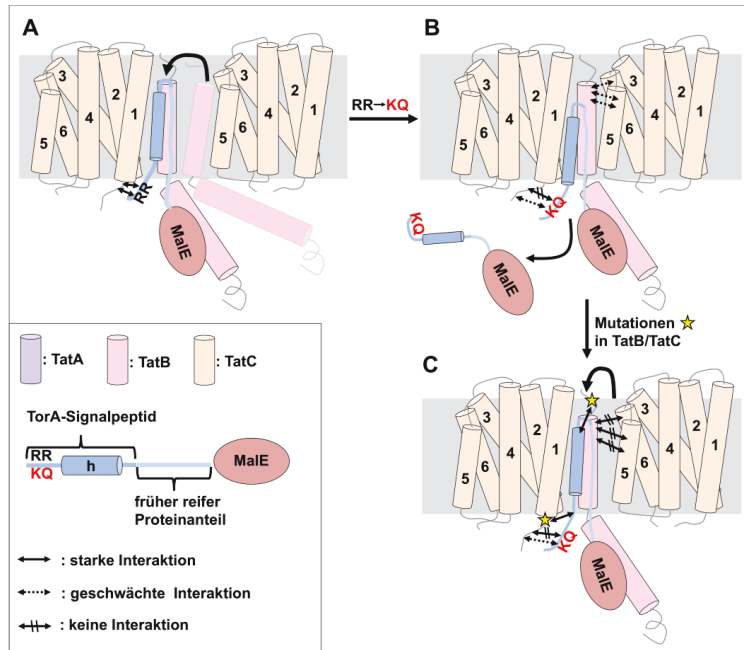


Abbildung 8: Modell der Wirkungsweise der TatBC-gekoppelten Suppressormutationen, welche den Transport der exportdefekten Reportervariante TorA[KQ]-MalE wiederherstellen. Die Beschreibung des Modells ist im nachfolgenden Text vorzufinden.

Im Falle des unveränderten TorA-MalE-Reporterproteins ist die Summe aller Bindungskontakte innerhalb der TatBC-Bindetasche während der „advanced-stage“-Bindung des Signalpeptids ausreichend, um die für die Rekrutierung und Oligomerisierung von TatA essentielle Konformationsänderung des TatBC-Rezeptorkomplexes zu induzieren (siehe auch 3.4.2 und 3.4.3) (Abbildung 8 A). Wird jedoch das hochkonservierte Zwillingarginin durch ein Lysin-Glutamin-Paar ersetzt, so führt dies zu einem Verlust wichtiger Bindungskontakte, sodass der Schwellenwert für die minimal benötigte Gesamtbindeaffinität des Signalpeptids an den TatBC-Rezeptorkomplex unterschritten wird. Da die Bindung an den TatBC-Rezeptorkomplex in diesem Fall nicht produktiv ist, wird das Tat-Substrat wieder freigesetzt (Abbildung 8 B). Die fehlenden Bindungskontakte können nun durch Mutationen im TatBC-Rezeptorkomplex, welche zur Einführung neuer oder zur Verstärkung bereits bestehender Interaktionen innerhalb der TatBC-Bindetasche führen, kompensiert werden (Abbildung 8 C). Diese neuen oder verstärkten Kontakte sind hierbei wahrscheinlich nicht im Tat-Konsensusmotiv, sondern an einer anderen Stelle des Signalpeptids lokalisiert (Kreutzenbeck *et al.*, 2007; Lausberg *et al.*, 2012). Mit Hilfe dieses genetischen Ansatzes sowie mehrerer Crosslinking-Studien konnten die für die Substratbindung funktionell relevanten Bereiche des TatBC-Rezeptorkomplexes inzwischen eingegrenzt werden. Im Gegensatz hierzu sind die genauen Regionen des Tat-Vorläuferproteins, welche zu dessen

Gesamtbindeaffinität an den TatBC-Rezeptorkomplex beitragen, – bis auf das Tat-Konsensusmotiv - noch nicht definiert worden. Daraus ergeben sich folgende Fragestellungen, die in der vorliegenden Arbeit untersucht werden sollen.

3.7 Ziele der vorliegenden Arbeit

Die bisherigen Studien zur Untersuchung der Bindung von Tat-Vorläuferproteinen an den TatBC-Rezeptorkomplex konzentrierten sich weitgehend auf das Tat-Konsensusmotiv. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist unklar, ob und welche anderen Regionen des Signalpeptids und/oder des reifen Proteinanteils von Tat-Substraten ebenfalls direkt in den Bindungsprozess an den TatBC-Rezeptorkomplex involviert sind. Dies soll nun mit Hilfe genetischer Ansätze unter der Verwendung des TorA-MalE-Reportersystems näher untersucht werden. Bisher ist die Rolle der h-Region von Tat-Signalpeptiden in der bakteriellen Tat-abhängigen Proteintranslokation noch weitgehend unaufgeklärt. Aus Crosslinking-Studien ist bekannt, dass die h-Region des Signalpeptids während der „*advanced-stage*“ –Bindung parallel zur THM von TatB ausgerichtet ist. Damit bietet die h-Region eine potentielle Interaktionsstelle für die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen der hydrophoben TatB-TMH und dem Signalpeptid. Um nun eine direkte Beteiligung der h-Region an der TatBC-Rezeptorbindung zu untersuchen, sollen ausgehend von einer Transport-inkompetenten TorA-30aa-MalE-Variante Suppressormutationen innerhalb der h-Region identifiziert werden, welche den Export durch die Wildtyp-Tat-Translokase wiederherstellen. Sollten derartige Suppressormutanten isoliert werden können, so gilt es zu überprüfen, ob sich die Mutationen innerhalb der h-Region tatsächlich direkt auf die Bindung des Signalpeptids an den TatBC-Rezeptorkomplex auswirken.

Im zweiten Teil dieser Arbeit soll mit ähnlicher Vorgehensweise die Rolle des frühen reifen Proteinanteils von TorA im Bindungsprozess an die Tat-Translokase untersucht werden. Dabei soll konkret die Frage beantwortet werden, ob der frühe reife Proteinanteil signifikant zur Gesamtbindeaffinität des Tat-Substrats an den TatBC-Rezeptorkomplex beiträgt. Die Isolierung von Mutationen in dieser Region des Tat-Substrats, welche den Exportdefekt einer mutierten TorA-30aa-MalE-Variante supprimieren, soll einen direkten Beweis für eine Wechselwirkung des frühen reifen Proteinanteils mit dem TatBC-Rezeptorkomplex liefern.

Die aus diesen Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse sollen einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des Mechanismus der produktiven TatBC-Rezeptorbindung auf molekularer Ebene leisten.

III. Material und Methoden

1 Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien (analysenrein) wurden von den Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Merck KGaA (Darmstadt), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) und SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg) bezogen. Biochemikalien und Enzyme mit den dazugehörigen Puffern stammten von den Firmen Novagen (gehört zu Merck KGaA, Darmstadt), Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, U.S.A.; ehemals Fermentas GmbH, St. Leon-Rot), GE Healthcare (München), Invitrogen (Life Technologies GmbH, Darmstadt), New England Biolabs GmbH (Frankfurt/Main), Qiagen (Hilden) und Roche Diagnostics GmbH (Mannheim). Zusätze für Nährmedien stammten von Becton Dickinson/Difco GmbH (Heidelberg). Die Nitrocellulose-Membranen wurden von GE Healthcare (München) bezogen. Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert. Produkte anderer Hersteller sind an entsprechender Stelle aufgelistet.

2 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

2.1 Bakterienstämme

Tabelle 1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten *Escherichia coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
XL1-Blue	<i>endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB⁺ lacI^f Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK⁻ mK⁺)</i>	(Bullock <i>et al.</i> , 1987) Agilent Technologies Life sciences and Chemical Analyses, Waldbronn (ursprünglich Stratagene)
DH5α	<i>F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK⁻ mK⁺), λ-</i>	(Hanahan, 1983)
GSJ101	<i>F- araD139 Δ(argF-lac)U169 rspL150 relA1 flbB5301 fruA25 deoC1 ptsF25 e14- ΔtatA-tatD ΔtatE x P1.MM129>TetR ΔmalE444 zjb729::Tn10</i>	(Blaudeck <i>et al.</i> , 2003)

2.2 Plasmide

Tabelle 2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

Plasmid	Relevante Eigenschaften	Referenz
pHSG575	pSC101 Replikon, <i>lacZα⁺</i> ; Cm ^R	(Takeshita <i>et al.</i> , 1987)
pHSG-TatABCE	Derivat von pHSG575; enthält die <i>E. coli</i> -Gene <i>tatABCE</i>	(Blaudeck <i>et al.</i> , 2005)
pHSG-TatAB[E8K]CE	Derivat von pHSG-TatABCE; TatB (E8K)	(Kreutzenbeck <i>et al.</i> , 2007)
pHSG-TatABC[L9F]E	Derivat von pHSG-TatABCE; TatC (L9F)	(Kreutzenbeck <i>et al.</i> , 2007)
pHSG-TatAB[E8K]C[L9F]E	Derivat von pHSG-TatABCE; TatB (E8K), TatC (L9F)	Diese Arbeit
pBBR1MCS-2	<i>mob rep lacZα⁺</i> ; Km ^R	(Kovach <i>et al.</i> , 1995)

Fortsetzung von Tabelle 2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

pTorA-30aa-MalE	Derivat von pBBR1MCS-2; enthält das Fusionsgen <i>torA-30aa-malE</i> mit einer Linkerregion aus den ersten 30 Aminosäuren des reifen TorA-Proteins	Persönliche Mitteilung S. Fleckenstein
pTorA[G25A]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (G25A)	Diese Arbeit
pTorA[G25C]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (G25C)	Diese Arbeit
pTorA[G25M]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (G25M)	Diese Arbeit
pTorA[G25N]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (G25N)	Diese Arbeit
pTorA[G25S]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (G25S)	Diese Arbeit
pTorA[G25T]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (G25T)	Diese Arbeit
pTorA[G25V]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (G25V)	Diese Arbeit
pTorA[KQ]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K und R12Q)	Persönliche Mitteilung S. Jurischka
pTorA[KQ,A16V]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, A16V)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,Q17L]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, Q17L)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,G19V]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, G19V)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,T22A]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, T22A)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,T22I]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, T22I)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,G25A]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, G25A)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,G25C]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, G25C)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,G25M]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, G25M)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,G25N]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, G25N)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,G25S]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, G25S)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,G25T]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, G25T)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,G25V]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, G25V)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,G25W]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, G25W)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,G28W]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, G28W)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,A16V,G19V]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, A16V, G19V)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,A16V,T22I]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, A16V, T22I)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,A16V,G25W]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, A16V, G25W)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,A16V,G28W]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, A16V, G28W)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,T22A,G28W]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, T22A, G28W)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,G25V,G28W]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, G25V, G28W)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,G25W,G28W]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, G25W, G28W)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,T44I]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, T44I)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,D45L]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, D45L)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,D45G]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, D45G)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,H58I]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, H58I)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,K50L]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, K50L)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,T55R,T65R]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, T55R, T65R)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,T65R]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, T65R)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,D68R]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, D68R)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,T44I,K50L]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, T44I, K50L)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,T44I,T65R]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, T44I, T65R)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,K50L,T65R]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, K50L, T65R)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,D45L,D68R]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, D45L, D68R)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,K50L,D68R]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, K50L, D68R)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,K50L,T55R,T65R]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, K50L, T55R, T65R)	Diese Arbeit

Fortsetzung von Tabelle 2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

pTorA[KQ,A16V,H58I]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, A16V, H58I)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,T22A,T65R]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, T22A, T65R)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,T22A,D68R]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, T22A, D68R)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,G28W,H58I]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, G28W, H58I)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,G25W,K50L]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, G25W, K50L)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,G28W,K50L]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, G28W, K50L)	Diese Arbeit
pTorA[KQ,G25W,G28W,K50L]-30aa-MalE	pTorA-30aa-MalE (R11K, R12Q, G25W, G28W, K50L)	Diese Arbeit
pNapA-30aa-MalE	Derivat von pBBR1MCS-2; enthält das Fusionsgen <i>napA-30aa-malE</i> mit dem NapA-Signalpeptid, einer Linkerregion aus den ersten 30 Aminosäuren des reifen NapA-Proteins und dem reifen MalE-Protein	Diese Arbeit
pNapA[A31R]-30aa-MalE	pNapA-30aa-MalE (A31R)	Diese Arbeit
pNapA[G27R,V28R]-30aa-MalE	pNapA-30aa-MalE (G27R, V28R)	Diese Arbeit
pNapA[KQ]-30aa-MalE	pNapA-30aa-MalE (R5K, R6Q)	Diese Arbeit
pNapA[KQ,A31R]-30aa-MalE	pNapA-30aa-MalE (R5K, R6Q, A31R)	Diese Arbeit
pNapA[KQ,G27R,V28R]-30aa-MalE	pNapA-30aa-MalE (R5K, R6Q, G27R, V28R)	Diese Arbeit
pNapA[KQ,A17V]-30aa-MalE	pNapA-30aa-MalE (R5K, R6Q, A17V)	Diese Arbeit
pNapA[KQ,A19I]-30aa-MalE	pNapA-30aa-MalE (R5K, R6Q, A19I)	Diese Arbeit
pNapA[KQ,A18V,A19V]-30aa-MalE	pNapA-30aa-MalE (R5K, R6Q, A18V, A19V)	Diese Arbeit
pET22b(+)	Vektor mit N-terminalem PelB-Signalpeptid, C-terminalem His-Tag, T7 Promotor, Amp ^R	Novagen
pET22b-TorA-30aa-MalE	Derivat von pET22b(+); enthält das Fusionsgen <i>torA-30aa-MalE</i> , Amp ^R	Diese Arbeit
pET22b-TorA[KQ]-30aa-MalE	Derivat von pET22b(+); enthält das Fusionsgen <i>torA[KQ]-30aa-MalE</i> , Amp ^R	Diese Arbeit
pET22b-TorA[KQ,A16V]-30aa-MalE	pET22b-TorA[KQ]-30aa-MalE (R11K, R12Q, A16V)	Diese Arbeit
pET22b-TorA[KQ,T22A]-30aa-MalE	pET22b-TorA[KQ]-30aa-MalE (R11K, R12Q, T22A)	Diese Arbeit
pET22b-TorA[KQ,T22I]-30aa-MalE	pET22b-TorA[KQ]-30aa-MalE (R11K, R12Q, T22I)	Diese Arbeit
pET22b-TorA[KQ,G25M]-30aa-MalE	pET22b-TorA[KQ]-30aa-MalE (R11K, R12Q, G25M)	Diese Arbeit
pET22b-TorA[KQ,G25V]-30aa-MalE	pET22b-TorA[KQ]-30aa-MalE (R11K, R12Q, G25V)	Diese Arbeit
pET22b-TorA[KQ,G28W]-30aa-MalE	pET22b-TorA[KQ]-30aa-MalE (R11K, R12Q, G28W)	Diese Arbeit
pET22b-TorA[KQ,A16V,G28W]-30aa-MalE	pET22b-TorA[KQ]-30aa-MalE (R11K,R12Q,A16V,G28W)	Diese Arbeit
pET22b-TorA[KQ,T22A,G28W]-30aa-MalE	pET22b-TorA[KQ]-30aa-MalE (R11K,R12Q,T22A,G28W)	Diese Arbeit
pET22b-TorA[KQ,G25V,G28W]-30aa-MalE	pET22b-TorA[KQ]-30aa-MalE (R11K,R12Q,G25V,G28W)	Diese Arbeit

2.3 Oligonukleotide

Tabelle 3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz 5' → 3'
Primer zur Konstruktion der TorA[KQ]-30aa-MalE-Mutantenbibliotheken mittels „error-prone“ (ep) -PCR	
intramut_torA30aaMalE_fw	GAAGTAGTGGATCCCCGGCGATAAG
Intramut_torA30aaMalE2_fw	ATTGTTAACGCCGCGACGTGCGACTGCG
intramut_torA30aaMalE_rev	CCAGTTTATCCGGATGCTCAACGG
Primer zur Sequenzierung von pTorA-30aa-MalE- und pNapA-30aa-MalE-Plasmidvarianten	
MC13pUCrev	TTGTGTGGAATTGTGAGCGG
MC13uniCSneu	AGGGTTTTCCAGTCACGACGTT

Fortsetzung von Tabelle 3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

seq_KQ30MalE_1_fw	TCCCGGCGATAAGAAGGAAG
seq_KQ30MalE_2_fw	TTTGGTGGCTACGCTCAATC
seq_KQ30MalE_3_fw	CGCCAGTCCGAACAAAGAGC
seq_KQ30MalE_1_rev	CGTTATAGCCTTTATCGCCG
seq_KQ30MalE_2_rev	CAGGAAGGTCAGACCCGCTT
seq_KQ30MalE_3_rev	CAGGAATTTCGATTTCGACGCC

Primer zur Sequenzierung von pHSG-TatABCE-Plasmidvarianten

TatAB_fw	GAATTCCCAATTTCGAGCTCG
TatAB_rev	CGCAGCTCAATCAGATGCGT
TatC_fw	ACCTGCTGCGGACGCTGAAC
TatC_rev	TAACCGGCAACAGAACGCGC
TatE_fw	TTCAACCGCCCTGCAGTTGT
TatE_rev	CCATTGCCATTTCAGGCTGC

Primer zur Konstruktion der TorA[KQ]-30aa*-MalE-Mutantenbibliothek mittels ortsgerichteter Mutagenese

30aa_qcA40_fw	CGTGCGACTGCGNNNCAAGCGGCGACT
30aa_qcA40_rev	AGTCGCCGCTTGNNNCGCAGTCGCACG
30aa_qcQ41_fw	GCGACTGCGGCGNNNCGCGCGACTGAC
30aa_qcQ41_rev	GTCAGTCGCCGCGNNNCGCCGAGTCGC
30aa_qcA42_fw	ACTGCGGCGCAANNNGCGACTGACGCT
30aa_qcA42_rev	AGCGTCAGTCGCGNNNTTTCGCCGCGAGT
30aa_qcA43_fw	GCGGCGCAAGCGNNNACTGACGCTGTC
30aa_qcA43_rev	GACAGCGTCAGTNNNCGCTTGCGCCGC
30aa_qcT44_fw	GCGCAAGCGGCGNNNGACGCTGTCATC
30aa_qcT44_rev	GATGACAGCGTCNNNCGCCGCTTGCGC
30aa_qcD45_fw	CAAGCGGCGACTNNNGCTGTCATCTCG
30aa_qcD45_rev	CGAGATGACAGCNNNAGTCGCCGCTTG
30aa_qcI48_fw	ACTGACGCTGTCNNNTCGAAAGAGGGC
30aa_qcI48_rev	GCCCTCTTTTCGANNNGACAGCGTCAGT
30aa_qcS49_fw	GACGCTGTCATCNNNAAAGAGGGCATT
30aa_qcS49_rev	AATGCCCTCTTTNNNGATGACAGCGTC
30aa_qcK50_fw	GCTGTCATCTCGNNNGAGGGCATTCTT
30aa_qcK50_rev	AAGAATGCCCTCANNNGCAGATGACAGC
30aa_qcE51_fw	GTCATCTCGAAANNNGGCATTCTTACC
30aa_qcE51_rev	GGTAAGAATGCCNNNTTCGAGATGAC
30aa_qcG52_fw	ATCTCGAAAGAGNNNATTCTTACCGGG
30aa_qcG52_rev	CCCGGTAAGAATNNNCTCTTTCGAGAT
30aa_qcT55_fw	GAGGGCATTCTTNNNGGGTCGCACTGG
30aa_qcT55_rev	CCAGTGCGACCCNNNAAGAATGCCCTC
30aa_qcG56_fw	GGCATTCTTACNNNTCGCACTGGGGG
30aa_qcG56_rev	CCCCAGTGCGANNNGGTAAGAATGCC
30aa_qcS57_fw	ATTCTTACCGGGNNNCACTGGGGGGCT
30aa_qcS57_rev	AGCCCCCAGTGNNNCCCGTAAGAAT
30aa_qcH58_fw	CTTACCGGGTCGNNNTGGGGGGCTATC
30aa_qcH58_rev	GATAGCCCCCANNNCGACCCGGTAAG
30aa_qcG60_fw	GGGTCGCACTGGNNNGCTATCCGCGCG
30aa_qcG60_rev	CGCGCGGATAGCNNNCCAGTCGACCC
30aa_qcR63_fw	TGGGGGGCTATCNNNGCGACGGTGAAG
30aa_qcR63_rev	CTTCACCGTCGCGNNNGATAGCCCCCA
30aa_qcT65_fw	GCTATCCGCGCGNNNGTGAAGGATGGT
30aa_qcT65_rev	ACCATCCTTCACNNNCGCGCGGATAGC

Fortsetzung von Tabelle 3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

30aa_qcK67_fw	CGCGCGACGGTGNNGATGGTAAATC
30aa_qcK67_rev	GATTTTACCATCNNNCACCGTCGCGCG
30aa_qcD68_fw	GCGACGGTGAAGNNNGTAAAAATCGAA
30aa_qcD68_rev	TTCGATTTTACNNNCTTCACCGTCGC
30aa_qcG69_fw	ACGGTGAAGGATNNAAAAATCGAAGAA
30aa_qcG69_rev	TTCTTCGATTTTNNNATCCTTCACCGT
Primer zur ortsgerichteten Mutagenese von TorA-30aa-MalE-Reporterproteinvarianten	
spTorA[KQ]_A16V_qc_fw	AAACAGCGTTTTCTGGTACAACCTCGGCGGCTTA
spTorA[KQ]_A16V_qc_rev	TAAGCCGCCGAGTTGTACACAGAAAACGCTGTTT
spTorA[KQ]_T22A_qc_fw	CAACTCGGCGGCTTAGCCGTCGCCGGGATGCTG
spTorA[KQ]_T22A_qc_rev	CAGCATCCCGGCGACGGCTAAGCCGCCGAGTTG
spTorA[KQ]_T22I_qc_fw	CTCGGCGGCTTAATCGTCGCCGGGATG
spTorA[KQ]_T22I_qc_rev	CATCCCGGCGACGATTAAGCCGCCGAG
spTorA[KQ]_G25A_qc_fw	GGCTTAACCGTCGCCGCGATGCTGGGGCCGTCA
spTorA[KQ]_G25A_qc_rev	TGACGGCCCCAGCATCGCGGCGACGGTTAAGCC
spTorA[KQ]_G25M_qc_fw	GGCTTAACCGTCGCCATGATGCTGGGGCCGTCA
spTorA[KQ]_G25M_qc_rev	TGACGGCCCCAGCATCATGGCGACGGTTAAGCC
spTorA[KQ]_G25N_qc_fw	GGCTTAACCGTCGCCAACATGCTGGGGCCGTCA
spTorA[KQ]_G25N_qc_rev	TGACGGCCCCAGCATGTTGGCGACGGTTAAGCC
spTorA[KQ]_G25C_qc_fw	GGCTTAACCGTCGCCTGTATGCTGGGGCCGTCA
spTorA[KQ]_G25C_qc_rev	TGACGGCCCCAGCATACAGGCGACGGTTAAGCC
spTorA[KQ]_G25S_qc_fw	GGCTTAACCGTCGCCAGCATGCTGGGGCCGTCA
spTorA[KQ]_G25S_qc_rev	TGACGGCCCCAGCATGCTGGCGACGGTTAAGCC
spTorA[KQ]_G25T_qc_fw	GGCTTAACCGTCGCCACTATGCTGGGGCCGTCA
spTorA[KQ]_G25T_qc_rev	TGACGGCCCCAGCATAGTGGCGACGGTTAAGCC
spTorA[KQ]_G25V_qc_fw	TTAACCGTCGCCGTATGCTGGGGCCG
spTorA[KQ]_G25V_qc_rev	CGGCCCCAGCATACGCGCGACGGTTAA
spTorA[KQ]_G25W_qc_fw	TTAACCGTCGCCGTGGATGCTGGGGCCG
spTorA[KQ]_G25W_qc_rev	CGGCCCCAGCATCCAGGCGACGGTTAA
spTorA[KQ]_M26I_qc_fw	ACCGTCGCCGGGATCCTGGGGCCGTCA
spTorA[KQ]_M26I_qc_rev	TGACGGCCCCAGGATCCCGGCGACGGT
spTorA[KQ]_G28W_qc_fw	GCCGGGATGCTGTGGCCGTCATTGTTA
spTorA[KQ]_G28W_qc_rev	TAACAATGACGGCCACAGCATCCCGGC
spTorA[KQ]_G25V+G28W_qc_fw	TTAACCGTCGCCGTATGCTGTGGCCGTCATTGTTA
spTorA[KQ]_G25V+G28W_qc_rev	TAACAATGACGGCCACAGCATGACGGCGACGGTTAA
spTorA[KQ]_G25W+G28W_qc_fw	TTAACCGTCGCCGTGGATGCTGTGGCCGTCATTGTTA
spTorA[KQ]_G25W+G28W_qc_rev	TAACAATGACGGCCACAGCATCCAGGGCGACGGTTAA
spTorA[KQ]_A16V+G19V_qc_fw	AAACAGCGTTTTCTGGTACAACCTCGTGGCTTAACCGTCGCC
spTorA[KQ]_A16V+G19V_qc_rev	GGCGACGGTTAAGCCGACGAGTTGTACCAGAAAACGCTGTTT
30aa_T44I_qc_fw	GCGCAAGCGGCGATAGACGCTGTCATC
30aa_T44I_qc_rev	GATGACAGCGTCTATCGCCGCTTGCGC
30aa_D45G_qc_fw	GCGCAAGCGGCGACTGGCGCTGTCATCTCGAAA
30aa_D45G_qc_rev	TTTCGAGATGACAGCGCCAGTCGCCGCTTGCGC
30aa_D45L_qc_fw	CAAGCGGCGACTCTTGCTGTCATCTCG
30aa_D45L_qc_rev	CGAGATGACAGCAAGAGTCGCCGCTTG
30aa_K50L_qc_fw	GCTGTCATCTCGCTCGAGGGCATTCTT
30aa_K50L_qc_rev	AAGAATGCCCTCGAGCGAGATGACAGC
30aa_H58I_qc_fw	CTTACCGGGTCGATTGGGGGGCTATC
30aa_H58I_qc_rev	GATAGCCCCCAAATCGACCCGGTAAG

Fortsetzung von Tabelle 3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide**Primer zur Sequenzierung von pET22b(+)-Plasmidvarianten**

pET22b_mcs_fw	GCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGG
pET22b_mcs_rev	GGCAGCAGCCAACTCAGCTTCC

Primer zur Umklonierung von TorA-30aa-MalE-Konstrukten aus dem pBBR-Vektor in den pET22b(+)-Vektor

pET22b_NdeI_TorAx_fw	GCGCCATATGAACAATAACGATCTCTTTCAGGCATCA
pET22b_XhoI_TorAx_rev	GCGCCTCGAGTTACTTGGTGATACGAGTCTGCGCGTCTTT

Primer zur Einföhrung der TatB-Mutation E8K in das pHSG-TatABC[L9F]E-Plasmid

TatABCE_B_E8K_qc_fw	GATATCGGTTTTAGCAAACGCTATTGGTGTTTC
TatABCE_B_E8K_qc_rev	GAACACCAATAGCAGTTTGCTAAAACCGATATC

Primer zur Konstruktion von pNapA-30aa-MalE mittels „cross-over“-PCR

Cross_NapA_1_fw	AGTGGATCCCAGCAGGAAGAGCAAGGTGAG
Cross_NapA_2_rev	CAGTTTACCTTCTTCGATTTTGCCACCACGTCCTGCTGCGT
Cross_NapA_3_fw	AAAATCGAAGAAGGTAACCTGGTAATCTGG
Cross_NapA_4_rev	AATGAATTCGATTCGACGCCGCATCC

Primer zur ortsgerichteten Mutagenese des NapA-30aa-MalE-Reporterproteins

NapA_R5K+R6Q_qc_fw	ACCATGAACTCAGTAAACAGAGCTTTATGAAAGCT
NapA_R5K+R6Q_qc_rev	AGCTTTCATAAAGCTCTGTTTACTGAGTTTCATGGT
NapA_A31R_qc_fw	GGCGTTGCCCGCCGCGTTGTTGGTCAG
NapA_A31R_qc_rev	CTGACCAACAACGCGGCGGCAACGCC
NapA_G27R+V28R_qc_fw	CTCAGCGTGCCGCGTCGTGCCCGCGCCGTT
NapA_G27R+V28R_qc_rev	AACGGCGCGGGCAGCAGCGGCGACGCTGAG
NapKQ-A17V_qc_fw	AACGCCGTTGCGGCCGTTGCGGCGGCTGCCGGT
NapKQ-A17V_qc_rev	ACCGGCAGCCGCCGCAACGGCCGCAACGGCGTT
NapKQ-A19I_qc_fw	GTTGCGGCCGCTGCGATCGCTGCCGGTCTCAGC
NapKQ-A19I_qc_rev	GCTGAGACCGGCAGCGATCGCAGCGGCCGCAAC
NapKQ_A18V+A19V_qc_fw	GCCGTTGCGGCCGCTGTTGTTGCTGCCGGTCTCAGC
NapKQ_A18V+A19V_qc_rev	GCTGAGACCGGCAGCAACAACAGCGGCCGCAACGGC

3 Mikrobiologische Methoden**3.1 Nährmedien****3.1.1 LB (Luria-Bertani) –Medium (Miller, 1972)**

Bacto-Trypton	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
NaCl	5 g/L

Die drei Komponenten des LB-Mediums wurden abgewogen, in 1 L ddH₂O gelöst und autoklaviert. Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurden dem Medium zuvor 20 g/L Agar zugegeben. Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die Kultivierung der *E. coli* –Stämme standardmäßig in LB-Medium.

3.1.2 MacConkey-Agar

Zur Herstellung von MacConkey-Maltose-Agarplatten (MCM) wurden 40 g MacConkey-Agar Base sowie 7,5 g Agar abgewogen, mit ddH₂O auf 960 ml aufgefüllt und autoklaviert. Anschließend

wurden 40 ml einer sterilen 25%-igen (w/v) Maltose-Lösung (Endkonzentration 1% (v/v)) hinzugegeben.

3.1.3 Maltose-Minimalmedium (Tanaka *et al.*, 1967)

Minimalmedium mit Maltose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle (MMM) wurde nach Tanaka *et al.* (1967) folgendermaßen angesetzt:

Lösung A (10x)

NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	46,9 g/L
K ₂ HPO ₄	111,5 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	26,4 g/L
mit ddH ₂ O auf 1 L auffüllen und autoklavieren	

Lösung B (100x)

MgSO ₄ x 7 H ₂ O	7,4 g/L
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	147 mg/L
ZnCl ₂	13,6 mg/L
Fe(II)SO ₄ x 7 H ₂ O	28 mg/L
1 M HCl	1 ml/L

mit ddH₂O auf 1 L auffüllen

Zunächst wurden 20 g Agar und 10 ml Lösung B mit ddH₂O auf ein Volumen von 880 ml aufgefüllt und autoklaviert. Anschließend wurden steril 100 ml Lösung A, 16 ml einer 25%-igen (w/v) Maltose-Lösung (Endkonzentration 0,4% (v/v)), 1 ml Thiamin-Lösung (100 mg/ml Stammlösung) und 1 ml 0,1 M IPTG-Lösung (Endkonzentration 0,1 mM) hinzugegeben.

Zur Selektion auf die jeweiligen Antibiotikaresistenzen wurden den Medien die entsprechenden Antibiotika in folgender Endkonzentration zugefügt:

Kanamycin (in ddH₂O): 50 mg/L

Chloramphenicol (in 70 % Ethanol): 25 mg/L

3.2 Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung

3.2.1 Kultivierungsbedingungen

Die Kultivierung der *E. coli* –Stämme erfolgte standardmäßig in Reagenzgläsern mit 5 ml LB-Medium bei 37 °C und 170 rpm. Ab einem Volumen von 10 ml wurden die Flüssigkulturen in Erlenmeyerkolben bei 37 °C und 120-160 rpm angezogen. Bei einer selektiven Kultivierung von Bakterienstämmen, die ein Gen für eine Antibiotikumresistenz trugen, wurden dem Medium die entsprechenden Antibiotika zugesetzt.

3.2.2 Stammhaltung

Die Kultivierung von *E. coli* zur Stammhaltung erfolgte in Reagenzgläsern mit 5 ml LB-Medium, die für 14-16 h bei 170 rpm und 37 °C inkubiert wurden. Anschließend wurden 1 ml Kultur mit 1 ml sterilem 80%-igen (w/v) Glycerin gemischt und in zwei Aliquots aufgeteilt. Die Kulturen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

3.3 Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli* -Zellen

Die Herstellung kompetenter *E. coli* -Zellen erfolgte nach der Rubidiumchlorid-Methode nach Hanahan (Hanahan, 1983; Hanahan, 1985). Durch eine Rubidiumchlorid-Behandlung erhalten logarithmisch wachsende *E. coli* – Zellen die Kompetenz, freie DNA aus dem Medium aufzunehmen. Dazu wurden einige Kolonien von einer frischen LB-Platte in 1 ml LB-Medium resuspendiert. Anschließend wurden damit 50 ml LB-Medium inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 bei 37 °C und 160 rpm inkubiert. Dann wurde die Kultur in einen 50-ml-Falcon überführt und 15 min auf Eis abgekühlt. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Die Zellen wurden 15 min bei 4 °C und 4500 rpm pelletiert und in 15 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte eine weitere Zentrifugation für 15 min (4 °C, 4500 rpm). Das Zellpellet wurde in 4 ml eiskalter RF2-Lösung resuspendiert und weitere 15 min auf Eis inkubiert. Zuletzt erfolgte die Aliquotierung zu 50 µl oder 100 µl in vorgekühlten Eppendorf-Reaktionsgefäßen, die unmittelbar danach in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert wurden.

RF1-Lösung

RbCl₂ 100 mM

MnCl₂·4H₂O 50 mM

K-Acetate 30 mM

CaCl₂·2H₂O 10 mM

Glycerin 15 % (v/v)

mit 0,2 M Essigsäure auf pH 5,8 eingestellt und steril filtriert.

RF2-Lösung

Morpholinopropansulfonsäure 10 mM

RbCl₂ 10 mM

CaCl₂·2H₂O 75 mM

Glycerin 15 % (v/v)

mit 6 M NaOH auf pH 6,8 eingestellt und steril filtriert.

Zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli* –Zellen wurden 100 µl Zellen zu 20 µl Ligationsansatz pipettiert, umgeschwenkt und 15 min auf Eis inkubiert. Bei einer Transformation mit sequenziertem Plasmid wurden 3-4 µl der Plasmidlösung zu 100 µl Zellen hinzugegeben.

Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 90 sec wurden 600 µl LB-Medium zugegeben und zur phänischen Expression der Plasmid-kodierten Antibiotikumresistenz für 1 h bei 37 °C und 600 rpm im Thermoschüttler inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf antibiotikumhaltigen LB-Agarplatten ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C.

4 Molekularbiologische Methoden

4.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit Hilfe des „GeneJET Plasmid Miniprep Kit“ (Thermo Scientific) nach den Angaben des Herstellers. Dieses Kit basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse von Zellen (Birnboim & Doly, 1979). Für die Plasmidpräparation wurden 5 ml LB-Medium unter Zusatz der erforderlichen Antibiotika mit Zellen inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 170 rpm inkubiert. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte standardmäßig mit 50 µl ddH₂O.

4.2 Reinigung von Nukleinsäuren

Die Reinigung von PCR-Produkten erfolgte mit Hilfe des „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Dabei wird die DNA von Enzymen, Nukleotiden, überschüssigen Primern, Puffern und Salzen befreit und aufgrund des geringen Elutionsvolumens (standardmäßig 30 µl) aufkonzentriert.

4.3 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Konzentration von Nukleinsäuren nach Plasmidpräparation oder nach erfolgter Reinigung von PCR-Ansätzen wurde photometrisch mittels Nanodrop[®] ND-1000 Spectrophotometer (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) bestimmt. Dazu wurde 1 µl Probe zwischen zwei optische Fasern pipettiert und die Konzentration durch Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt. Die Reinheit der DNA wurde anhand des Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ (Verunreinigung mit Proteinen) bzw. OD₂₆₀/OD₂₃₀ (Verunreinigung mit Kohlenhydraten) bestimmt, wobei der Wert zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte. Werte außerhalb dieses Bereichs weisen auf Verunreinigungen der DNA-Proben mit Proteinen (< 1,8), Kohlenhydraten oder anderen Kontaminanten hin.

4.4 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Überprüfung neu konstruierter Plasmide erfolgte durch Sequenzierung nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (Sanger *et al.*, 1977) bei der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg). Pro 15 µl Gesamtvolumen wurden 50 – 100 ng /µl Plasmid sowie 2 µl Primer (10 pmol/µl) eingesetzt. Pro Ansatz wurde nur ein Primer verwendet. Durch den Vergleich der Sequenzen mit der Matrizen-DNA konnten mögliche Mutationen wie Substitutionen oder Deletionen von Nukleinbasen identifiziert werden.

4.5 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden in einer horizontalen Elektrophoresekammer DNA-Fragmente der Größe nach aufgetrennt. In einem angelegten elektrischen Feld wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente durch die Gelmatrix zur positiv geladenen Anode, wobei sich die kleineren Fragmente schneller bewegen. Für die Gele wurde 1 %-ige (w/v) *my*-Budget Universal Agarose (Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld) in 1 x TAE-Puffer verwendet, der auch als Elektrophorese-Puffer diente. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben mit 1/10 Volumen 10x FastDigest Green Buffer (Thermo Scientific) versetzt. Die Auftrennung erfolgte je nach Gelgröße mit einer Spannung zwischen 90 und 120 V für 30 – 40 min. Das Anfärben der DNA erfolgte durch Inkubation des Gels in verdünnter Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml) für etwa 10 min. Nach einer Entfärbung des Agarosegels in Wasser für 5-10 min wurden die DNA-Banden durch Belichtung mit UV-Licht sichtbar gemacht. Zur Größenbestimmung der DNA wurde der DNA-Längenstandard O'GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder von Thermo Scientific verwendet.

10x TAE-Puffer

Tris	48,4 g/L
Essigsäure (96%)	11,42 ml/L
EDTA/Na ₂	7,44 g/L
mit ddH ₂ O auf 1 L auffüllen	

4.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen erfolgte mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ nach den Protokollen des Herstellers.

4.7 Restriktion

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen („FastDigest“) zur Spaltung von DNA wurden von Thermo Fisher Scientific (ehemals Fermentas) bezogen. Der Verdau von DNA erfolgte standardmäßig in 50 µl-Ansätzen unter Verwendung der mitgelieferten Puffer nach Angaben des Herstellers. Bevor die verdauten Fragmente ligiert wurden, wurde der Restriktionserfolg mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Im Anschluss wurden die Restriktionsansätze gereinigt (siehe Abschnitt 4.2) und die Konzentrationen mittels NanoDrop® bestimmt (siehe Abschnitt 4.3).

4.8 Behandlung von DNA mit alkalischer Phosphatase

Die Entfernung von 5' -Phosphatresten zur Verhinderung der Religation von linearisierten Vektoren erfolgte durch eine Behandlung mit alkalischer Phosphatase aus Schrimps „*Shrimp alkaline phosphatase*“ (SAP). Hierzu wurden die Enzyme (Fermentas) und die mitgelieferten Puffer nach Angaben des Herstellers verwendet.

4.9 Ligation

Für Ligationen wurde die „Rapid T4 DNA Ligase“ (Thermo Scientific) oder die T4 DNA-Ligase (Fermentas) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dabei wurden Vektor und PCR-Produkt im molaren Verhältnis 1:3 eingesetzt. Bei der Verwendung der „Rapid T4 DNA Ligase“ wurde der Ligationsansatz 30 min bei RT inkubiert. Bei der Verwendung der T4 DNA-Ligase erfolgte die Ligation bei 16 °C über Nacht. Anschließend wurden die Ligationsansätze zur Transformation zu 100 µl chemisch kompetenter *E. coli* -Zellen hinzugegeben.

4.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) wurde zur *in vitro*-Amplifizierung von DNA-Fragmenten (Mullis & Faloona, 1987) eingesetzt. Hierzu wurden zwei komplementäre, konvergierende Oligonukleotide (Primer) verwendet, die das zu amplifizierende Fragment flankieren. Diese wurden durch Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert. Für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde entweder die KOD Hot Start DNA-Polymerase (Novagen) oder der High Fidelity PCR Enzym-Mix (Thermo Scientific), der neben der *Taq*-DNA-Polymerase auch die *Tgo*-DNA-Polymerase mit 3'-5'-Exonukleaseaktivität enthält, verwendet. Die Kombination beider Polymerasen bewirkt eine Verringerung der Fehlerrate der DNA-Synthese um den Faktor drei. Für analytische Zwecke (Überprüfung von Transformanden) wurden die Dream*Taq*-DNA-Polymerase und der zugehörige Puffer aus dem PCR-Kit von Thermo Scientific eingesetzt (Kolonie-PCR). Hierzu wurden für jeden PCR-Ansatz Zellen der zu untersuchenden Bakterienkolonien mit einem sterilen Zahnstocher von der Agarplatte gepickt und direkt in den jeweiligen PCR-Reaktionsansatz gegeben. Die PCR wurde in einem Thermo-Cycler (Biometra T3000, Göttingen) durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen für die PCR wurden entsprechend den Angaben der jeweiligen Polymerase-Hersteller gewählt. Das Reaktionsvolumen betrug standardmäßig 50 µl. Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde entweder Plasmid-DNA (5-20 ng) oder chromosomale DNA (300-500 ng) eingesetzt. Die Annealing-Temperatur wurde üblicherweise 5 °C unter der niedrigsten Schmelztemperatur der eingesetzten Primer gewählt. Die Schmelztemperatur der DNA kann mit der Formel $T_m [^{\circ}\text{C}] = [(G + C) \times 4] + [(A + T) \times 4]$ abgeschätzt werden. Zur Überprüfung des Erfolges der PCR wurden Aliquots der PCR-Ansätze mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Gegebenfalls wurde der gesamte PCR-Ansatz elektrophoretisch aufgetrennt und das gewünschte PCR-Produkt anschließend über das „QIAquick Gel Extraction Kit“ nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die erhaltenen Fragmente wurden dann vor der Ligation in einen Zielvektor mit Restriktionsenzymen nach den Protokollen der jeweiligen Hersteller verdaut.

4.11 Konstruktion des Reporterproteins NapA-30aa-MalE mittels „cross-over“ – PCR

Das Reporterprotein NapA-30aa-MalE besteht aus dem Signalpeptid der Tat-abhängig translozierten Nitrat-Reduktase NapA, welches über die ersten 30 Aminosäuren des reifen NapA-Proteins an den reifen Proteinanteil von MalE fusioniert wurde. Die Konstruktion des Reporterplasmids pNapA-30aa-MalE erfolgte mittels „cross-over“ –PCR und ist in Abbildung 9 schematisch dargestellt.

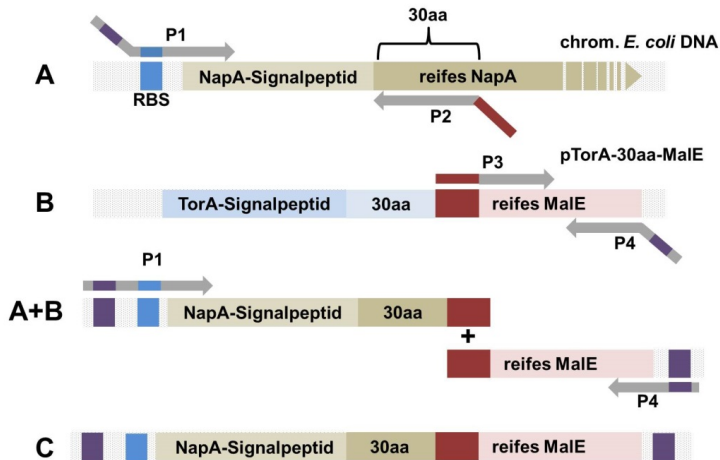


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Konstruktion von pNapA-30aa-MalE mittels „cross-over“ –PCR. Die Restriktionsschnittstellen (BamHI und EcoRI) in den Primern P1 und P4 sind violett, der überlappende Bereich der Fragmente A und B rot und die Ribosomenbindestelle in blau dargestellt. Die Erläuterungen zu den einzelnen Teilschritten sind dem Text zu entnehmen.

Das erste PCR-Fragment A umfasst den *napA*-Genbereich, welcher für das NapA-Signalpeptid sowie die ersten 30 Aminosäuren des frühen reifen Proteinanteils von NapA kodiert, und wurde unter Verwendung der chromosomalen DNA des *E. coli* –Stamms XL1-Blue als Matrice sowie der Primer Cross_NapA_1_fw (P1) und Cross_NapA_2_rev (P2) generiert. Zusätzlich enthält der Primer P2 am 5'-Ende einen Überhang, der zu den ersten 22 bp des *malE*-Genbereichs, welcher für den reifen MalE-Proteinanteil kodiert, komplementär ist. Das zweite Fragment B für die „cross-over“ –PCR wurde mit den Primern Cross_NapA_3_fw (P3) und Cross_NapA_4_rev (P4) unter Verwendung des Plasmids pTorA-30aa-MalE als Matrice amplifiziert und umfasst den gesamten Bereich des *malE* –Gens, welcher für den reifen MalE-Proteinanteil kodiert. Die Fragmente A und B beinhalten einen identischen, überlappenden Bereich aus 22 bp, welcher in der darauffolgenden PCR zur Fusion beider Fragmente dient (A+B). Das generierte Fragment C wurde über die Restriktionsschnittstellen BamHI und EcoRI, welche durch die flankierenden Primer P1 und P4 eingeführt wurden, in einen mit dem Restriktionsenzympaar BamHI/EcoRI verdauten, linearisierten pBBR1MCS-2-Vektor eingeführt.

4.12 Ortsgerichtete Mutagenese von TorA-30aa-MalE- und NapA-30aa-MalE-Reporterproteinvarianten sowie der Komponenten der Tat-Translokase

Das Einführen von einzelnen oder mehreren Mutationen in die TorA-30aa-MalE- und NapA-30aa-MalE-Reporterproteinvarianten sowie in die Komponenten der Tat-Translokase (kodiert durch den pHSG-TatABCE-Vektor) erfolgte durch ortsgerichtete Mutagenese mit Hilfe des „QuikChange® Site Directed Mutagenesis Kit“ (Agilent) nach Angaben des Herstellers. Die hierfür verwendeten Primer sind in Tabelle 3 aufgeführt. Ein Schema zur Einführung von Basenaustauschen in einen pTorA-30aa-MalE-Vektor ist in Abbildung 10 dargestellt.

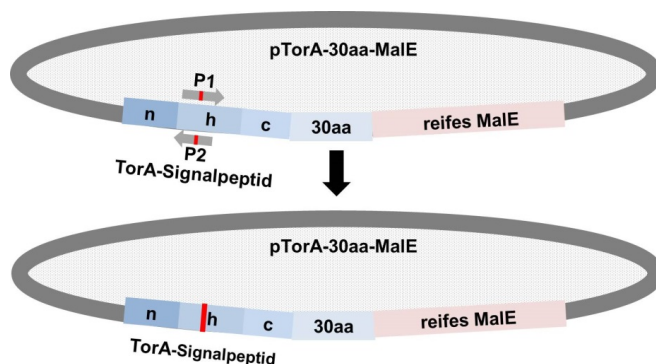


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Einführung von Mutationen in TorA-30aa-MalE-Reporterproteinvarianten mittels ortsgerichteter Mutagenese. Dargestellt ist die beispielhafte Einführung eines Basenaustausches in die h-Region des TorA-Signalpeptids des TorA-30aa-MalE-Reporterproteins, kodiert durch den schematisch dargestellten pTorA-30aa-MalE-Vektor. Der gewünschte Basenaustausch ist sowohl in den Primern als auch in der Plasmid-DNA als roter Balken dargestellt

Es wurden zwei zueinander komplementäre Primer (P1 und P2) verwendet, die an den entsprechenden Bereich des Plasmid-kodierten Fusionsgens *torA*[KQ]-30aa-malE binden, in welchem ein oder mehrere Basenaustausche erfolgen sollen. Im Zentrum der Primersequenz befindet sich der gewünschte Basenaustausch, welcher von jeweils 12 oder 15 bp, die komplementär zu der Plasmid-DNA sind, flankiert wird. Sollte in eine TorA-30aa-MalE-Reporterproteinvariante, in welcher bereits eine Mutation vorliegt, eine zweite Mutation eingeführt werden, so diene die entsprechende pTorA-30aa-MalE-Plasmidvariante anstelle des unveränderten pTorA-30aa-MalE-Vektors als Matrize für die PCR. Anschließend folgte die Transformation von *E. coli* DH5 α -Zellen mit dem Reaktionsansatz. Die Zellen wurden auf Kanamycin-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Schließlich wurden aus Übernachtskulturen der Transformanten die entsprechenden pTorA[KQ]-30aa-MalE-Plasmidvarianten präpariert. Der korrekte Einbau der Mutationen wurde durch eine Sequenzierung der Plasmide überprüft.

4.13 Konstruktion von pET22b(+)-Derivaten für *in vitro* Crosslinking-Experimente

Für die *in vitro* Crosslinking-Experimente, welche in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Matthias Müller (Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Freiburg) durchgeführt wurden, wurden verschiedene *torA-30aa-malE* -Reportergenvarianten aus dem *medium copy* Vektor pBBR1MCS-2 in den *high copy* -Vektor pET22b(+) umkloniert. Die Konstruktion der Plasmide pET22b-TorA-30aa-MalE und pET22b-TorA[KQ]-30aa-MalE erfolgte mittels PCR, wobei das gesamte *torA-30aa-malE* bzw. *torA[KQ]-30aa-malE* -Fusionsgen unter Verwendung der Primer pET22b_NdeI_TorAx_fw und pET22b_XhoI_TorAx_rev sowie des Plasmids pTorA-30aa-MalE bzw. pTorA[KQ]-30aa-MalE als Matrize amplifiziert wurde. Das PCR-Produkt wurde anschließend mit den Restriktionsenzymen NdeI und XhoI verdaut und in einen mit dem Restriktionsenzympaar NdeI/XhoI verdauten, linearisierten pET22b(+)-Vektor ligiert. Die verschiedenen pET22b-TorA[KQ]-30aa-MalE-Plasmidvarianten mit Mutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids wurden in gleicher Weise konstruiert, wobei pET22b_NdeI_TorAx_fw und pET22b_XhoI_TorAx_rev als Primer und die entsprechende pTorA[KQ]-30aa-MalE-Plasmidvariante als Matrize eingesetzt wurde.

4.14 Konstruktion von Mutantenbibliotheken

4.14.1 Konstruktion einer TorA[KQ]-30aa-MalE-Mutantenbibliothek mittels „error-prone“ (ep) –PCR zur Isolierung h-Region-lokalisierter Suppressormutationen

Zur Isolierung von Mutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids, welche den Exportdefekt der Reporterproteinvariante TorA[KQ]-30aa-MalE supprimieren können, wurde eine geeignete Mutantenbibliothek erstellt.

Die Konstruktion der Mutantenbibliothek erfolgte durch „error-prone“ (ep) –PCR mit dem „GeneMorph II Random Mutagenesis Kit“ (Agilent) nach Angaben des Herstellers. Der Mutazyme II DNA-Polymerase-Mix enthält zwei verschiedene Polymerasen, die Mutazyme I DNA - Polymerase und eine mutierte Version der *Taq*-DNA-Polymerase, welche in einem Gen mit einer gewünschten Frequenz zufällige Basenaustausche einführen. Aufgrund des erforderlichen Vorhandenseins von Restriktionsschnittstellen im amplifizierten Fragment wurden neben dem TorA[KQ]-Signalpeptid auch die ersten 30 Aminosäuren des reifen TorA-Proteins (30aa-Region) sowie die ersten 38 Aminosäuren des reifen MalE-Proteins mutagenisiert. Die Mutationsrate wurde hierbei durch entsprechende Anpassung der Reaktionsbedingungen (eingesetzte Plasmidmenge als Matrize, Zyklenanzahl) auf 1-9 Mutationen pro kb eingestellt. Für die ep-PCR wurden das pTorA[KQ]-30aa-MalE-Plasmid als Matrize und intramut_torA30aaMalE_fw (P1) sowie intramut_torA30aaMalE_rev (P2) als Primer eingesetzt, welche in einem Bereich des Plasmids vor dem *torA[KQ]-30aa-malE* -Fusionsgen bzw. zu Beginn des *malE* -Gens binden und die Restriktionsschnittstellen BamHI bzw. Kpn2I enthalten (Abbildung 11).

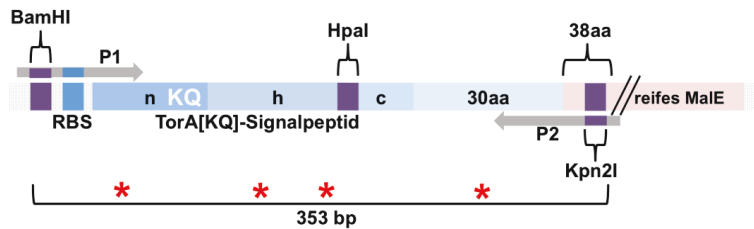


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Konstruktion einer TorA[KQ]-30aa-MaIE-Mutantenbibliothek mittels ep-PCR zur Isolierung von h-Region-lokalisierten Suppressormutationen. Restriktionsschnittstellen sind als violette Balken und die Ribosomenbindestelle (RBS) vor dem *torA[KQ]-30aa-maIE*-Fusionsgens als blauer Balken dargestellt. Die möglichen Positionen eingeführter Aminosäureaustausche sind durch rote Sterne markiert. Die Länge des amplifizierten Fragments beträgt nach der Restriktion mit BamHI/Kpn2I 353 bp. Die 30aa-Region entspricht den ersten 30 Aminosäuren des reifen TorA-Proteins. Weitere Details sind im Text vorzufinden.

Das amplifizierte Fragment (353 bp nach Restriktion mit BamHI/Kpn2I) wurde anschließend über diese Restriktionsschnittstellen in einen pTorA[KQ]-30aa-MaIE-Vektor ligiert. Das Zielplasmid wurde zuvor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und der linearisierte Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese vom ursprünglichen Fragment (Insert) abgetrennt. Anschließend wurden mehrere Aliquots chemisch kompetenter *E. coli* DH5 α -Zellen mit den Ligationsansätzen transformiert. Die Zellen wurden auf Kanamycin-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Alle Kolonien wurden mit LB-Medium von den einzelnen Platten abgeschwemmt und vereint, in 20 ml LB-Medium mit Kanamycin überführt und für 4 h bei 160 rpm inkubiert. Schließlich wurde aus den Zellen eine Bibliothek mutagenisierter pTorA[KQ]-30aa-MaIE-Plasmide präpariert. Die Überprüfung der Mutationsvielfalt innerhalb der generierten Mutantenbibliothek erfolgte durch Sequenzierung von zehn zufällig ausgewählten, präparierten pTorA[KQ]-30aa-MaIE-Plasmidvarianten.

4.14.2 Konstruktion einer TorA[KQ]-30aa-MaIE Mutantenbibliothek mittels ep-PCR zur Isolierung 30aa-Region-lokalisierter Suppressormutationen

Zur Isolierung von Mutationen in der 30aa-Region, welche den Exportdefekt des TorA[KQ]-30aa-MaIE-Reporterproteins supprimieren können, wurde eine Mutantenbibliothek mittels ep-PCR unter Verwendung des „GeneMorph II Random Mutagenesis Kit“ (Agilent) nach Angaben des Herstellers erstellt.

Die Konstruktion erfolgte hierbei analog zu der Erstellung der Mutantenbibliothek zur Isolierung von h-Region-lokalisierter Suppressormutationen im TorA[KQ]-Signalpeptid (siehe Abschnitt 4.14.1). Der mutagenisierte Bereich enthielt aufgrund der Lage der Restriktionsschnittstellen neben der 30aa-Region auch die c-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids sowie die ersten 38 Aminosäuren des reifen MaIE-Proteins. Die Mutationsrate wurde hierbei durch entsprechende Anpassung der Reaktionsbedingungen (eingesetzte Plasmidmenge als Matrize, Zyklenanzahl) auf 1-9 Mutationen pro kb eingestellt. Für die ep-PCR wurden das pTorA[KQ]-30aa-MaIE-Plasmid als Matrize und intramut_torA30aaMaIE2_fw (P1) sowie intramut_torA30aaMaIE_rev (P2) als Primer eingesetzt, welche an die entsprechenden Bereiche des Plasmid-lokalisierten *torA[KQ]-30aa-maIE*-Fusionsgens binden und die Restriktionsschnittstellen HpaI bzw. Kpn2I enthalten

(Abbildung 12). Das amplifizierte Fragment (229 bp nach Restriktion mit HpaI/Kpn2I) wurde anschließend über diese Restriktionsschnittstellen in einen entsprechend verdauten pTorA[KQ]-30aa-MaIE-Vektor nach Abtrennung des ursprünglichen Fragments (Insert) ligiert. Zusätzlich wurde die in 4.14.1 erstellte Mutantenbibliothek mit dem Restriktionsenzympaar HpaI/Kpn2I verdaut und die gewünschten Fragmente nach elektrophoretischer Auftrennung und Aufreinigung ebenfalls zur Ligation in den pTorA[KQ]-30aa-MaIE-Vektor eingesetzt. Anschließend folgte die Transformation von *E. coli* DH5 α -Zellen mit den Ligationsansätzen. Die Zellen wurden auf Kanamycin-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Alle Kolonien wurden mit LB-Medium von den einzelnen Platten abgeschwemmt und vereinigt, in 20 ml LB-Medium mit Kanamycin überführt und für 4 h bei 160 rpm inkubiert. Schließlich wurde aus den Zellen eine Bibliothek mutagenisierter pTorA[KQ]-30aa-MaIE-Plasmide präpariert. Die Überprüfung der Mutationsvielfalt innerhalb der generierten Mutantenbibliothek erfolgte durch Sequenzierung von zehn zufällig ausgewählten, präparierten pTorA[KQ]-30aa-MaIE-Plasmidvarianten.

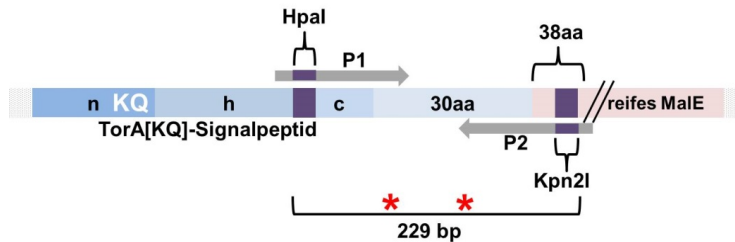


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Konstruktion einer TorA[KQ]-30aa-MaIE-Mutantenbibliothek mittels ep-PCR zur Isolierung 30aa-Region-lokalisierter Suppressormutationen. Die in den Primern P1 und P2 enthaltenen Restriktionsschnittstellen sind als violette Balken dargestellt. Die Länge des amplifizierten Fragments beträgt nach der Restriktion mit HpaI/Kpn2I 229 bp. Die möglichen Positionen eingeführter Aminosäureaustausche sind durch rote Sterne markiert. Die 30aa-Region entspricht den ersten 30 Aminosäuren des reifen TorA-Proteins. Weitere Details sind im Text vorzufinden.

4.14.3 Konstruktion einer TorA[KQ]-30aa*-MaIE-Mutantenbibliothek mittels ortsgerichteter Mutagenese zur Isolierung 30aa-Region-lokalisierter Suppressormutationen

Die Konstruktion einer TorA[KQ]-30aa-MaIE-Mutantenbibliothek zur Isolierung von Mutationen in der 30aa-Region, die den Exportdefekt von TorA[KQ]-30aa-MaIE supprimieren, erfolgte zusätzlich zu der in Abschnitt 4.14.2 beschriebenen ep-PCR durch ortsgerichtete Mutagenese mit Hilfe des „QuikChange® Site Directed Mutagenesis Kit“ (Agilent) nach Angaben des Herstellers (siehe auch Abschnitt 4.12). Hierzu wurden in mehreren Ansätzen einzelne Positionen innerhalb der 30aa-Region mutagenisiert. Die hierfür verwendeten, zueinander komplementären, degenerierten Primerpaare sind in der Tabelle 3 aufgeführt. Diese enthalten im Zentrum ihrer Sequenz anstelle des Codons für eine bestimmte Aminosäure, welche variiert werden soll, das Basentriplett „NNN“. Nach der PCR erfolgte die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* DH5 α -Zellen mit den einzelnen Ansätzen. Die Zellen wurden auf Kanamycin-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Alle Kolonien wurden mit LB-Medium von den einzelnen Platten

abgeschwemmt und vereinigt, in 20 ml LB-Medium mit Kanamycin überführt und für 4 h bei 160 rpm inkubiert. Schließlich wurde aus den Zellen eine Bibliothek mutagenisierter pTorA[KQ]-30aa*-MalE-Plasmide präpariert. Insgesamt wurden drei verschiedene Bibliotheken erstellt (A, B, C), in welchen jeweils unterschiedliche Aminosäurepositionen mutagenisiert wurden (Abbildung 13). Die Überprüfung der Mutationsvielfalt innerhalb der generierten Mutantenbibliotheken erfolgte durch Sequenzierung von zehn zufällig ausgewählten, präparierten pTorA[KQ]-30aa*-MalE-Plasmidvarianten.

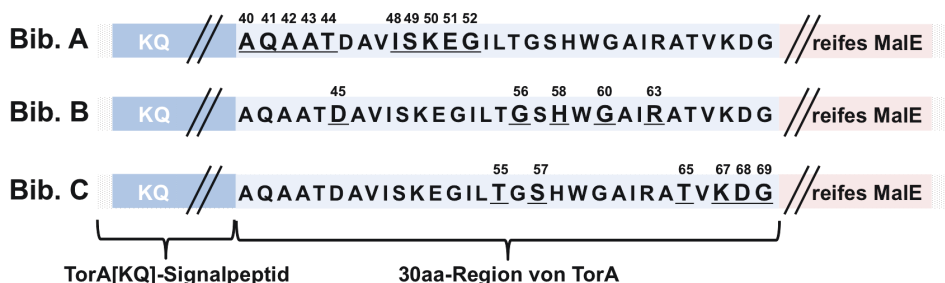


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Konstruktion einer TorA[KQ]-30aa*-MalE-Mutantenbibliothek mittels ortsgerichteter Mutagenese zur Isolierung 30aa-Region-lokalisierter Suppressormutationen. Die Aminosäurepositionen, welche variiert wurden, sind unterstrichen. Zur Konstruktion der Bibliothek A wurden die Positionen A40, Q41, A42, A43, T44, I48, S49, K50, E51 und G52, der Bibliothek B die Positionen D45, G56, H58, G60 und R63, der Bibliothek C die Positionen T55, S57, T65, K67, D68 und G69 in der 30aa-Region mutagenisiert. Die 30aa-Region entspricht den ersten 30 Aminosäuren des reifen TorA-Proteins. Weitere Details sind dem Text zu entnehmen.

5 Biochemische und proteinchemische Methoden

5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe erfolgte nach der Standardmethode von Lämmli (Laemmli, 1970). Hierzu wurden die Proteinproben 1:1 mit 2x Protein-Probenpuffer gemischt und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Als Proteinstandard wurde der „PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder“ (Fermentas) eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte in Minigel-Elektrophoresekammern der Firma Biometra in 1x Laufpuffer bei 16 mA pro Minigel.

10 x Laufpuffer	144 g/L	Glycin
	30 g/L	Tris
	10 g/L	SDS
Trenngel (12,5 %)	7,5 ml	Acrylamid/N,N-Methylenbisacrylamid (30:0,8)
	3,8 ml	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
	100 µl	10% (w/v) SDS
	1,9 ml	ddH ₂ O
	1,62 ml	Glycerin (87%)
	10 µl	TEMED
	150 µl	APS (10%)

Sammelgel (6,5 %)	1,1 ml	Acrylamid/N,N-Methylenbisacrylamid (30:0,8)
	0,6 ml	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
	50 µl	10% (w/v) SDS
	3,2 ml	ddH ₂ O
	3 µl	TEMED
	50 µl	APS (10%)
2xProtein-Probenpuffer (100 ml)	40 ml	0,2 M Tris 0,02 M EDTA pH 7,0 HCl (2 M)
	50 ml	83,3 mM Tris 8,3 % SDS 29 % Glycerin 0,15 % Bromphenolblau
	10 ml	1 M DTT

5.2 Färbung von SDS-Gelen

Nach der SDS-PAGE wurde das Gel zunächst insgesamt drei Mal für jeweils 10 min in ddH₂O gewaschen. Die Färbung des SDS-Gels erfolgte anschließend über Nacht mittels kolloidaler Coomassie-Lösung [0,02 % (w/v) Coomassie Brilliant blue G250, 5 % (w/v) Aluminiumsulfat-(14-18)-Hydrat, 10 % (v/v) Ethanol (96 %), 2 % (v/v) ortho-Phosphorsäure (100 %)] modifiziert nach Kang *et al.* (Kang *et al.*, 2002). Die Entfärbung des SDS-Gels erfolgte in ddH₂O.

5.3 Western-Blot

Der immunologische Nachweis einzelner Proteine mit spezifischen Antikörpern wurde modifiziert nach der Methode von Towbin *et al.* durchgeführt (Towbin *et al.*, 1979). Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden anschließend mittels Elektroblood (Mini Trans-Blot™ Kammer; Biorad, München) auf eine Nitrocellulose-Membran (Amersham™ Protran™ Premium 0,2 µm Nitrocellulose Blotting Membrane, GE Healthcare, München) übertragen. Der Aufbau der Blotapparatur erfolgte nach Angaben des Herstellers. Das Blotten erfolgte dabei in Tris/Glycin Westernblot-Puffer (pro L: 3 g Tris; 14,4 g Glycin) für 50 min bei 350 mA. Sowohl die Nitrocellulose-Membran als auch das Whatman-Filterpapier wurden vorher mit Westernblot-Puffer getränkt. Nach dem Blotten wurde die Membran zur Blockierung unspezifischer Bindestellen für 1 h in TBS-T mit 5 % Magermilchpulver bei Raumtemperatur geschwenkt. Anschließend wurde die Membran einmal kurz in TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit spezifischen Antikörpern erfolgte über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schwenken. Die Antikörper wurden hierzu 1:1000 in TBS-T verdünnt. Im Anschluss wurde die Membran insgesamt 3 x für je 10 min in TBS-T unter leichtem Schwenken gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte für 90 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken in TBS-T. Anschließend folgten drei Waschschrte für je 5 min in TBS-T. Der Nachweis von Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten sekundären

Antikörpern erfolgte über die Erzeugung von Chemilumineszenz mit Hilfe des „Amersham ECL™ Western Blotting System“ (GE Healthcare, München) oder „Western Bright™ ECL HRP substrate Kit“ (Advansta) nach Angaben des Herstellers. Zur Detektion der Chemilumineszenz wurde die „LAS-3000 Mini“ CCD-Kamera (Fujifilm) verwendet. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der Software AIDA Image Analyzer Version 4.50 (Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt).

TBS-T	8 g/L 20 ml/L 0,1%	NaCl 1 M Tris/HCl pH 7,5 Tween 20
Primäre Antikörper (1:1000 in TBS-T)	• Anti-MalE <i>E. coli</i> (Maltose-Bindeprotein), aus Hase (Dr. K-L Schimz) • Anti-GroEL <i>E. coli</i>, aus Hase (Dr. K-L Schimz) • Anti-SecA <i>E. coli</i>, aus Hase (Dr. K-L Schimz)	
Sekundäre Antikörper (1:10000 in TBS-T)	ECL™	Anti-Rabbit IgG Meerrettich-Peroxidase-gekoppelt (GE Healthcare, München)

5.4 Fraktionierungen von *E. coli*-Zellen mittels osmotischen Schocks

Die Fraktionierung von *E. coli*-Zellen in eine Periplasma (PP)- und eine kombinierte Cytoplasma- und Membranfraktion (C/M) erfolgte mittels osmotischen Schocks. Diese Methode beruht auf der Destabilisierung der äußeren *E. coli* Membran durch Zugabe von EDTA sowie der Zellwand durch Lysozymbehandlung.

Hierzu wurden 50 ml Kulturen (LB-Medium mit 0,1 mM IPTG und den erforderlichen Antibiotika) in 250 ml Erlenmeyerkolben aus Übernachtskulturen der entsprechenden *E. coli*-Stämme auf eine OD₆₀₀ von 0,06 inokuliert und bei 37 °C und 200 rpm für vier Stunden inkubiert. Für den osmotischen Schock wurden je 55 x 10⁹ Zellen (OD₆₀₀ von 1 bei *E. coli* entspricht in etwa 10⁹ Zellen/ml) in ein 50 ml Falcon-Gefäß überführt und abzentrifugiert (15 min, 4000 rpm, 4°C). Anschließend wurden die Zellpellets vorsichtig in 2,5 ml eiskaltem 30 mM Tris/HCl pH 8,0 resuspendiert. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert und nach sorgfältigem Abpipettieren des Überstandes in 40 µl eiskalter Saccharoselösung (20 % Saccharose; 30 mM Tris/HCl pH 8,0) vorsichtig resuspendiert und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 20 µl Lysozymlösung (1 mg/ml in 0,1 M EDTA pH 8,0) wurde kurz vorsichtig „gevortext“ und die Proben wurden genau 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (17 min, 15000 rpm, 4°C) wurden vom Überstand (PP-Fraktion) vorsichtig 30 µl abpipettiert und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Diese Proteinprobe wurde 1:1 mit 2x Protein-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Der restliche Überstand wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration der PP-Fraktion verwendet. Das Pellet (Sphäroplasten) wurde zur Verhinderung vorzeitiger Lyse mit 100 µl Saccharoselösung abgespült und in 1 ml 30 mM Tris/HCl pH 8,0 gleichmäßig resuspendiert. Nach der Zugabe von 300 mg Glaskugeln (Ø 0,1–0,2 mm, Clauss, Nidderau) wurden die Sphäroplasten in einer Kugelmühle (Retsch) für 10 min bei maximaler Schüttelfrequenz aufgeschlossen. Anschließend wurden die Zelltrümmer und die Glaskugeln durch Zentrifugation (15 min bei 15000

rpm, 4°C) vom Überstand (C/M-Fraktion) getrennt. 100 µl des Überstandes wurden in ein neues Eppendorfgefäß überführt, 1:1 mit 2x Protein-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Der Rest des Überstandes wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration der C/M-Fraktion verwendet.

5.5 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte entweder nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976) oder mit dem „Pierce™ BCA Protein Assay Kit“ (Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers.

Das Prinzip der Bradford-Methode beruht auf der Bindung des Säurefarbstoffs "Coomassie Brilliant Blue" G250 an aromatische und basische Aminosäurereste, insbesondere Arginin. Die Komplexbildung zwischen Farbstoff und Protein führt zu einer Stabilisierung des Farbstoffs in unprotonierter, anionischer Sulfonat-Form, was in saurer Umgebung eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 zu 595 nm bewirkt. Hierzu wurden 200 µl verdünnter Proteinprobe mit 800 µl Bradford-Reagenz [0,01 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250, 5 % (v/v) Ethanol (100%), 10 % (v/v) ortho-Phosphorsäure (100%)] in einer Küvette gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion der Proben bei 595 nm mit einem Ultrospec 3100 *pro* Spectrophotometer (Amersham Biosciences) gemessen.

Das Prinzip des BCA-Tests beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{+} -Ionen durch Proteine in alkalischer Lösung. Aufgrund der anschließenden Chelatbildung von zwei BCA-Molekülen wird ein blauvioletter Komplex gebildet, der bei 562 nm absorbiert. Die Absorption bei dieser Wellenlänge ist innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereichs linear zur Proteinkonzentration. Die Extinktion der Proben wurde bei 562 nm mit einem Ultrospec 3100 *pro* Spectrophotometer (Amersham Biosciences) oder dem Mikrotiterplatten-Reader infinite M200 Pro Tecan gemessen.

6 Bioinformatische Ansätze

6.1 Bestimmung des GRAVY-Index von Tat-Signalpeptiden nach Kyte & Doolittle (1982)

Der GRAVY (*grand average of hydropathy*) -Index entspricht der mittleren Hydrophobizität bzw. Hydrophilität einer Polypeptidkette. Zur Berechnung des GRAVY-Index werden die Hydropathie-Werte für die einzelnen Aminosäuren einer ausgewählten Sequenz auf der Hydrophobizitätsskala von Kyte & Doolittle addiert (Kyte & Doolittle, 1982). Die Hydropathie-Werte liegen in einem Bereich zwischen 4,6 und - 4,6. Ein hoher Hydropathie-Wert ist dabei gleichbedeutend mit der hohen Hydrophobizität eines Aminosäurerestes. Aminosäuren mit polaren, hydrophilen Seitenketten weisen hingegen negative Hydropathie-Werte auf.

6.2 Erstellung eines Hydropathie-Plots für TorA-Signalpeptide nach Kyte & Doolittle (1982)

Der Hydropathie-Plot nach Kyte & Doolittle liefert Informationen über die mögliche Struktur eines Proteins und deutet potentielle transmembrane oder Oberflächen-exponierte Regionen im Protein an (Kyte & Doolittle, 1982). Zur Erstellung eines Hydropathie-Plots wurde die Hydrophobizitätsskala von Kyte & Doolittle verwendet. Im ersten Schritt wird die Fenstergröße bestimmt. Diese entspricht der Anzahl an Aminosäureresten, deren Hydropathie-Werte gemittelt werden. Der Mittelwert wird derjenigen Aminosäure zugeordnet, welche sich im Zentrum des Fensters befindet (y-Koordinate). Anschließend wird das Fenster um eine Aminosäure verschoben und die Hydropathie-Werte der entsprechenden Aminosäurereste innerhalb des zweiten Fensters werden gemittelt. Dies wird solange fortgesetzt bis das Ende der Polypeptidkette erreicht wurde. Nach Kyte & Doolittle (1982) maximieren Fenstergrößen zwischen 7 und 11 Aminosäureresten den Informationsgehalt des Hydropathie-Plots. Für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurde daher eine Fenstergröße von 9 gewählt. Die gemittelten Hydropathie-Werte werden schließlich mittels Excel gegen die Positionen der Aminosäuren (x-Koordinate), denen die entsprechenden Mittelwerte jeweils zugeordnet wurden, aufgetragen. Final erfolgt die Analyse der Form des Graphen. Befindet sich ein Abschnitt des Graphen im Bereich positiver y-Werte, könnte diese Region der Polypeptidkette eine transmembrane α -Helix repräsentieren. Bereiche des Graphen, welche sich unterhalb der x-Achse befinden, deuten hingegen an, dass sich diese Aminosäurereste in Kontakt mit einem Lösungsmittel oder Wasser befinden und daher auf der hydrophilen Oberfläche des Proteins lokalisiert sein könnten.

IV. Ergebnisse

1 Untersuchung der Rolle der h-Region von Tat-Signalpeptiden in der Tat-abhängigen Proteintranslokation in *E. coli*

Die meisten bisherigen Studien zur Untersuchung der direkten Wechselwirkungen zwischen Tat-Substraten und der Tat-Translokase fokussierten sich auf das hochkonservierte Tat-Konsensusmotiv, welches die wichtigste Bindungs determinante von Tat-Signalpeptiden an den TatBC-Rezeptorkomplex darstellt. Bislang wurde nicht untersucht, ob und inwiefern die übrigen Bereiche des Tat-Signalpeptids oder des reifen Proteinanteils zu der Gesamtbindeaffinität des Tat-Substrats beitragen und infolgedessen ebenfalls in den Bindungsprozess an den TatBC-Rezeptorkomplex involviert sind. Eine weitere Komponente des Tat-Signalpeptids, welche möglicherweise eine Rolle in der TatBC-Rezeptorbindung spielen könnte, stellt die h-Region dar. Da die genaue Rolle der h-Region in der bakteriellen Tat-abhängigen Proteintranslokation noch nicht definiert wurde, wurde in vorhergehenden Untersuchungen in dieser Arbeitsgruppe erst einmal die generelle Frage geklärt, ob eine intakte h-Region im Tat-Signalpeptid zwingend für den Tat-Transport in *E. coli* benötigt wird. Die Ergebnisse dieser Voruntersuchungen werden in dem nachfolgenden Unterkapitel 1.1 beschrieben und stellen den Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit dar.

1.1 Eine minimale, funktionale h-Region von Tat-Signalpeptiden wird für den *E. coli* Tat-Transport benötigt

1.1.1 Die Mutation V23D im Zentrum der h-Region des TorA-Signalpeptids führt zur vollständigen Blockierung des Tat-abhängigen Exports von TorA-MalE in *E. coli*

Zuvor wurde von Cline und Mori (2001) gezeigt, dass sowohl das Zwillingsarginin-Motiv als auch die h-Region des Tat-Signalpeptids für einen effizienten Tat-abhängigen Proteintransport über die Thylakoidmembran pflanzlicher Chloroplasten notwendig sind. Die Einführung einer negativ geladenen Aminosäure in das Zentrum der h-Region führte in dieser Studie zur vollständigen Inhibierung des Tat-Transports (Cline & Mori, 2001). Um den Einfluss eines negativ geladenen Aminosäurerests in der h-Region eines Tat-Signalpeptids auf den bakteriellen Tat-Transport in *E. coli* zu untersuchen, wurde in vorhergehenden Experimenten mittels ortsgerichteter Mutagenese ein Valinrest an der Position 23 in der h-Region des Signalpeptids von TorA-MalE durch ein Aspartat substituiert, was zu einer Unterbrechung der h-Region führte (Abbildung 14 A). Anschließend wurde der Export der mutierten Reporterproteinvariante TorA[V23D]-MalE in dem *malE*- und *tat*- negativen *E. coli* –Stamm GSJ101 (pHSG-TatABCE), welcher die Plasmid-lokalisieren *tat*-Gene exprimiert, im Plattenassay (MMM/MCM) wie auch auf Proteinebene untersucht (Abbildung 14 B). Als Positivkontrolle diente hierbei der Stamm GSJ101 (pTorA-MalE, pHSG-TatABCE), welcher das unveränderte pTorA-MalE-Reporterprotein enthielt und als Negativkontrolle der Stamm GSJ101 (pTorA-MalE, pHSG-LV), der das TorA-MalE-

Reporterprotein in Abwesenheit einer Tat-Translokase exprimierte. Die beobachteten Phänotypen der jeweiligen Stämme auf MMM und MCM nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden in tabellarischer Form unter der in Abbildung 14 B dargestellten Western-Blot-Analyse zusammengefasst.

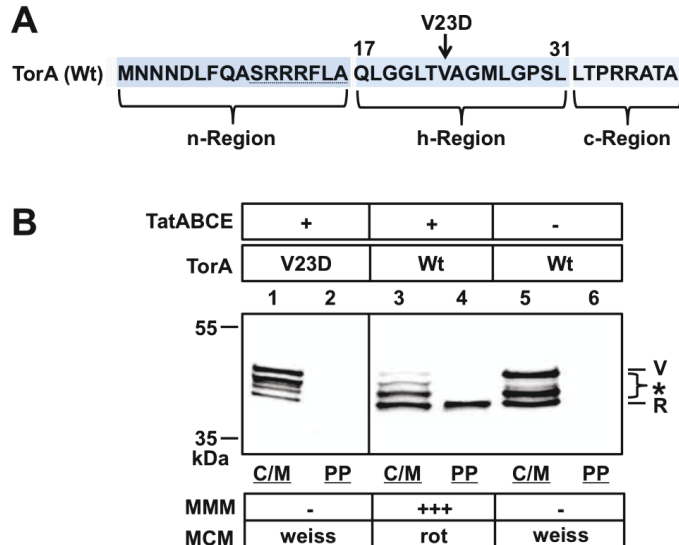


Abbildung 14: Auswirkung der Mutation V23D in der h-Region des TorA-Signalpeptids auf den Export von TorA-MalE. (A) Aminosäuresequenz des TorA-Signalpeptids. Die n-Region enthält das konservierte Tat-Konsensusmotiv (gepunktete Linie). Die Position der eingeführten V23D-Mutation ist durch einen Pfeil markiert. (B) Subzelluläre Lokalisation der TorA-MalE-Reportervarianten. Die Zellen wurden mittels osmotischen Schocks in eine Periplasma-Fraktion (PP) und eine kombinierte Cytoplasma/Membran-Fraktion (C/M) getrennt. Proben der Zellfraktionen, welche einer identischen Zellanzahl entsprachen, wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend mittels Western-Blot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Der Nachweis der *malE*-Genprodukte erfolgte durch MalE-spezifische Antikörper. Als Positivkontrolle diente *E. coli* GSJ101 (pTorA-MalE, pHSG-TatABCE), welcher die Plasmide pTorA-MalE (Wt) und pHSG-TatABCE (+) (Spuren 3 und 4) enthält. Die übrigen Proben entsprechen dem Stamm GSJ101 (pTorA[V23D]-MalE, pHSG-TatABCE) mit der Tat-Translokase (+) und dem mutierten TorA[V23D]-MalE-Reporter (V23D) (Spuren 1 und 2) bzw. dem Stamm GSJ101 (pTorA-MalE, pHSG-LV) mit dem unveränderten TorA-MalE-Reporter (Wt) und einem pHSG-Leervektor (-) (Spuren 5 und 6). Im Periplasma liegt die reife MalE-Form (R) vor, während in der C/M-Fraktion die oberste Bande das TorA-MalE- bzw. TorA[V23D]-Vorläuferprotein (V) und die darunter liegenden Banden cytoplasmatische Abbauprodukte (*) von MalE repräsentieren. Die Positionen der 35 kDa- und 55 kDa-Markerbande sind am linken Rand der Abbildung markiert. Die Ergebnisse des MMM/MCM-Plattenassays sind in tabellarischer Form unter der Western-Blot-Analyse zusammengefasst. Beschrieben sind die beobachteten Phänotypen von *E. coli* GSJ101 mit den jeweiligen Plasmiden auf MCM- und MMM-Agarplatten nach einer Inkubationszeit von 24 h. Phänotypen auf MMM: +++: effizientes Wachstum; -: kein signifikantes Wachstum. Phänotypen auf MCM: weisse, rote Kolonienfärbung. Die dargestellte Zellfraktionierung wurde von A.K. Heide durchgeführt und später in der Arbeit von Ulfig *et al.*, 2017 veröffentlicht.

Wie der Tabelle zu entnehmen ist, führte die Mutation V23D im Zentrum der h-Region des TorA-Signalpeptids zu einer vollständigen Blockierung des Tat-abhängigen Exports von MalE ins Periplasma. Der entsprechende *E. coli* -Stamm wuchs deshalb nicht mit Maltose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle und bildete weisse Kolonien auf MCM im Gegensatz zur Positivkontrolle GSJ101, welche ein effizientes Wachstum auf MMM sowie eine Rotfärbung der Kolonien auf MCM zeigte (vgl. Spuren 1 und 2 mit 3 und 4). Der beobachtete Phänotyp gleicht dem der Negativkontrolle *E. coli* GSJ101 (pTorA-MalE, pHSG-LV), welche TorA-MalE aufgrund einer fehlenden Tat-Translokase nicht exportieren kann (Spuren 5 und 6). Der Exportdefekt von

TorA[V23D] konnte auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Hierzu wurden die Zellen der entsprechenden *E. coli* –Stämme mittels osmotischen Schocks in eine kombinierte Cytoplasma/Membran-Fraktion (C/M) und in eine Periplasma-Fraktion (PP) getrennt. Die Proteine der einzelnen Zellfraktionen wurden anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt und per Western-Blot auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Der Nachweis der *malE* –Genprodukte erfolgte schließlich mittels MalE-spezifischer Antikörper. Während der unveränderte TorA-MalE-Reporter effizient durch die Tat-Translokase ins Periplasma des *E. coli* -Stamms GSJ101 (pTorA-MalE, pHSG-TatABCE) exportiert wurde (Abbildung 14 B, Spuren 3 und 4), konnte in der PP-Fraktion des Stamms GSJ101 (pTorA[V23D]-MalE, pHSG-TatABCE), welcher die mutierte TorA[V23D]-MalE-Reportervariante exprimiert, erwartungsgemäß kein reifes MalE nachgewiesen werden. Stattdessen wurde eine Akkumulation des unprozessierten TorA[V23D]-MalE-Vorläuferproteins in der C/M-Fraktion beobachtet, welche auf den fehlenden Transport des Reporters über die Cytoplasmamembran zurückgeführt werden kann. Offensichtlich wird ein negativ geladener Aminosäurerest im Zentrum der h-Region des TorA-Signalpeptids nicht von der Wildtyp-Tat-Translokase toleriert und führt zu einer vollständigen Blockierung des Tat-abhängigen Exports in *E. coli* (Ulfig *et al.*, 2017).

1.1.2 Die Länge einer intakten h-Region des TorA-Signalpeptids korreliert mit der Translokationseffizienz von TorA-MalE

In den Arbeiten von Kreutzenbeck *et al.* (2007) und Lausberg *et al.* (2012) wurden bereits Varianten von TorA-MalE beschrieben welche, wie auch das TorA[V23D]-MalE-Reporterprotein, nicht von der Wildtyp-Tat-Translokase exportiert werden können. Die exportdefekten Reportervarianten TorA[KQ]-MalE und TorA[F14D]-MalE weisen Mutationen des konservierten Zwillingsarginins bzw. des Phenylalanins im Tat-Konsensusmotiv auf. Es wird angenommen, dass sich diese Mutationen dabei direkt auf die Erkennung und Bindung des Tat-Signalpeptids durch den TatBC-Rezeptorkomplex auswirken. Die Veränderungen im Tat-Konsensusmotiv des Tat-Signalpeptids könnten demzufolge zu einem Verlust wichtiger Bindungskontakte zum TatBC-Rezeptorkomplex führen, sodass die Gesamtbindeaffinität des Tat-Signalpeptids drastisch verringert wird (siehe Kapitel II, Abschnitt 3.6). Ausgehend von diesen exportdefekten Reportervarianten konnten Suppressormutationen im TatBC-Rezeptorkomplex identifiziert werden, welche die produktive Erkennung und Bindung des veränderten Tat-Signalpeptids wahrscheinlich durch das Einfügen neuer Bindungskontakte oder die Verstärkung bereits bestehender Interaktionen innerhalb der TatBC-Bindetasche wiederherstellen (Kreutzenbeck *et al.*, 2007; Lausberg *et al.*, 2012).

Um zu prüfen, ob der Exportdefekt von TorA[V23D]-MalE durch Mutationen in der Tat-Translokase auf die gleiche Weise supprimiert werden kann, wurde im nächsten Experiment der *E. coli* –Stamm GSJ101 (pTorA[V23D]-MalE, Δtat) mit einer Bibliothek zufällig mutagenisierter Plasmid-kodierter *tat* -Gene transformiert. Die Transformanten wurden anschließend auf MMM ausplattiert und etwa 5 Tage inkubiert bis das Wachstum einzelner Kolonien beobachtet werden

konnte. Aus den *E. coli* –Stämmen, welche ein reproduzierbares Wachstum auf MMM zeigten, wurden die enthaltenen Plasmide isoliert und zur Identifizierung der Mutationen sequenziert. Überraschenderweise waren die für die Suppression des Exportdefekts von TorA[V23D]-MalE verantwortlichen Mutationen nicht in den Plasmid-kodierten *tat* –Genen lokalisiert. Stattdessen wurden Mutationen innerhalb der h-Region des TorA[V23D]-Signalpeptids identifiziert, welche sich während der Selektion auf Wachstum mit Maltose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle spontan ereignet haben (Abbildung 15 A). Insgesamt wurden vier verschiedene Typen mutierter Reporterproteine identifiziert, welche strikt Tat-abhängig transloziert wurden. Die Tat-Spezifität wurde durch Untersuchung des Exports dieser Reportervarianten in dem *malE*- und *tat* –negativen *E. coli* –Stamm GSJ101 ($\Delta malE$, Δtat) bestätigt. In allen Fällen konnte kein Wachstum auf MMM in Abwesenheit der Tat-Translokase nachgewiesen werden (Abbildung 15 B, untere Box). Während in den Reportervarianten TorA[V23G]-MalE und TorA[V23Y]-MalE die negativ geladene Aminosäure Aspartat durch einen neutralen Glycin- bzw. aromatischen Tyrosinrest substituiert wurde, wiesen die TorA-MalE-Varianten TorA[Δ T22-V23]-MalE und TorA[Δ G19-G25]-MalE eine Deletion von zwei bzw. sieben Aminosäuren innerhalb der h-Region auf, welche nicht nur das Aspartat, sondern auch benachbarte Aminosäurereste umfasste. Der Export der isolierten Reporterproteinvarianten wurde anschließend in dem *malE* –negativen *E. coli* –Stamm GSJ101 ($\Delta malE$, pHSG-TatABCE), welcher Plasmid-kodierte *tat* –Gene enthält, mittels Plattenassay und auf Proteinebene untersucht. Wie in Abbildung 15 B zu erkennen ist, wurden alle isolierten Reporterproteine durch die Wildtyp-Tat-Translokase über die Cytoplasmamembran transportiert – jedoch mit unterschiedlichen Effizienzen. Die Stämme, welche die Tat-Translokase und die Reportervariante TorA[V23G]-MalE, TorA[V23Y]-MalE bzw. TorA[Δ T22-V23]-MalE coexprimierten, ähnelten phänotypisch der Positivkontrolle GSJ101 (pTorA-MalE; pHSG-TatABCE) und zeigten ein effizientes Wachstum auf MMM sowie die Bildung roter Kolonien auf MCM (vgl. Spuren 3-5 mit Spur 1). Einen vergleichsweise reduzierten Export wies die Reportervariante TorA[Δ G19-G25]-MalE mit einer drastisch verkürzten h-Region im Signalpeptid auf. Der entsprechende Stamm zeichnete sich durch eine moderate Wachstumsrate auf MMM und einen pinken Phänotyp auf MCM aus (Spur 6).

Offensichtlich liegt eine positive Korrelation zwischen der Länge einer intakten h-Region und der Translokationseffizienz der jeweiligen Reporterproteine vor. Die negative Auswirkung einer drastischen Verkürzung der h-Region im Signalpeptid auf den Export von TorA-MalE wurde insbesondere auf Proteinebene deutlich. Die Deletion zweier Aminosäuren im Zentrum der h-Region der Reportervariante TorA[Δ T22-V23]-MalE erlaubte einen deutlich höheren Export ins Periplasma im Vergleich zu einer Verkürzung der h-Region um sieben Aminosäuren, welche zu einer drastischen Reduzierung der exportierten MalE-Menge in der PP-Fraktion des entsprechenden Stamms führte (vgl. Spur 5 mit Spur 6).

Diese kombinierten Ergebnisse zeigen deutlich, dass eine minimale ununterbrochene h-Region des TorA-Signalpeptids für den Tat-abhängigen Proteintransport in *E. coli* benötigt wird (Ulfig *et al.*, 2017).

1.2 Isolierung von Mutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids, die den Exportdefekt von TorA[KQ]-30aa-MalE suppressieren

Im vorhergehenden Abschnitt wurde gezeigt, dass neben einem intakten Zwillingsarginin-Motiv auch eine minimale funktionale h-Region im TorA-Signalpeptid vorliegen muss, um einen signifikanten Tat-abhängigen Proteinexport in *E. coli* zu erlauben.

Jedoch konnte bisher nicht gezeigt werden, für welchen Schritt des Translokationsprozesses die h-Region des Signalpeptids von Bedeutung ist. Aus Crosslinking-Studien ist bekannt, dass die h-Region nach der tiefen Haarnadel-ähnlichen Insertion des Signalpeptids in die TatBC-Bindetasche parallel zur TMH von TatB ausgerichtet wird (Alami *et al.*, 2003; Blümmel *et al.*, 2015; Gerard & Cline, 2006; Panahandeh *et al.*, 2008). Damit bietet die h-Region eine potentielle Interaktionsstelle für die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen der TatB-TMH und dem Signalpeptid. Deshalb erscheint es nicht abwegig, dass eine bestimmte Hydrophobizität des Signalpeptids notwendig ist, um die kritische Anzahl an Interaktionen innerhalb der hydrophoben TatBC-Bindetasche auszubilden, welche für eine produktive Bindung und folglich auch den effektiven Export des Tat-Substrats nötig ist. In den nachfolgenden Experimenten sollte nun überprüft werden, ob die h-Region des TorA-Signalpeptids tatsächlich zur Gesamtbindeaffinität an den TatBC-Rezeptorkomplex beiträgt und somit direkt in den Bindungsschritt des Tat-abhängigen Translokationsprozesses involviert ist.

Analog zu der Isolierung von Suppressormutationen im TatBC-Rezeptorkomplexes, welche den Export des normalerweise Transport-inkompetenten TorA[KQ]-MalE-Reporters wiederherstellten (Kreutzenbeck *et al.*, 2007; Lausberg *et al.*, 2012), sollten nun intragene Mutationen innerhalb der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids identifiziert werden, welche den Exportdefekt auf eine ähnliche Weise suppressieren könnten. Als Ausgangspunkt für die Mutagenesestudien diente das exportdefekte Reporterprotein TorA[KQ]-30aa-MalE. Im Vergleich zum TorA[KQ]-MalE-Reporter aus den früheren Untersuchungen wurde das TorA-Signalpeptid in dieser Reportervariante über die ersten 30 Aminosäuren des reifen TorA-Proteins an den reifen Proteinanteil von MalE fusioniert. Für die Selektion h-Region-gekoppelter Suppressormutanten wurde zunächst eine Mutantenbibliothek des Reporterproteins mittels „error-prone“ (ep) -PCR wie in Kapitel III, Abschnitt 4.14.1 beschrieben konstruiert. Dabei wurden neben dem TorA[KQ]-Signalpeptid auch die ersten 30 Aminosäuren des reifen TorA-Proteins sowie die ersten 38 Aminosäuren des reifen MalE-Proteinanteils zufällig mutagenisiert. Anschließend erfolgte die Transformation des *malE* -negativen *E. coli* -Stamms GSJ101 ($\Delta malE$, pHSG-TatABCE), welcher Plasmid-lokalisierte *tat* - Gene coexprimierte, mit der konstruierten Bibliothek mutagenisierter pTorA[KQ]-30aa-MalE-Plasmide. Zur Selektion von intragenen Suppressoren des Exportdefekts von TorA[KQ]-30aa-MalE wurde der Transformationsansatz auf MMM ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von bis zu 5 Tagen konnte das Wachstum einzelner Kolonien beobachtet werden, welche aufgrund von Mutationen die Fähigkeit zurückerhalten haben mit Maltose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen. Insgesamt wurden in vier Selektionen 130 Kolonien zufällig ausgewählt und im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit ihres Wachstums auf MMM untersucht.

Nur diejenigen Stämme, welche nach spätestens 48 h signifikantes Wachstum auf MMM aufwiesen, wurden weiter analysiert. Um zu überprüfen, ob die Mutationen, welche für die Suppression des Exportdefekts von TorA[KQ]-30aa-MalE verantwortlich waren, tatsächlich im Reporterprotein lokalisiert sind, wurden die Plasmide aus den entsprechenden *E. coli*-Stämmen isoliert und voneinander getrennt. Anschließend wurde der Stamm GSJ101 ($\Delta malE$, pHSG-TatABCE), welcher über eine Wildtyp-Tat-Translokase verfügt, mit den isolierten Reporterplasmiden transformiert. Konnten die zuvor beobachteten Phänotypen auf MMM reproduziert werden, so mussten die für das wiederhergestellte Wachstum mit Maltose verantwortlichen Mutationen im Reporterplasmid und nicht in den *tat*-Genen vorliegen. Die isolierten Reporterplasmide wurden daraufhin zum Ausschluss einer Sec-abhängigen Translokation der kodierten Reporterproteine für die Transformation des Stamms GSJ101 ($\Delta malE$, Δtat), welcher keine *tat*-Gene enthielt, eingesetzt und parallel sequenziert. Konnte in Abwesenheit einer Tat-Translokase kein Wachstum der entsprechenden Stämme auf MMM mehr beobachtet werden, so musste der wiederhergestellte Export der isolierten Reporterproteinvarianten spezifisch über den Tat-Weg erfolgt sein. Durch DNA-Sequenzierung der isolierten Reporterplasmide konnten sechs verschiedene Typen mutierter TorA[KQ]-30aa-MalE-Vorläuferproteine identifiziert werden, welche entweder einzelne oder multiple Aminosäureaustausche innerhalb ihrer TorA[KQ]-Signalpeptide aufwiesen (Tabelle 4).

Tabelle 4: Isolierte TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterproteinvarianten mit Mutationen innerhalb des TorA[KQ]-Signalpeptids, die für die Suppression des Exportdefekts verantwortlich sind.

Suppressor-Kategorie	Anzahl an Isolaten	Mutierte Region	Mutationen
1	62	c-Region	im „Sec avoidance“-Motiv: R35C; R35L; R35Q; R36P; R36C; R36H
2	23	nur Tat-Konsensusmotiv in der n-Region	<u>K11R+Q12R</u> ; <u>K11R</u> ; <u>Q12L</u> ; <u>A16V</u>
3	5	n-Region und Tat-Konsensusmotiv	<u>N3D+K11R</u>
4	5	n-Region außerhalb des Tat-Konsensusmotivs	N3K+Q8R; Q8R
5	10	n-Region und h-Region	R13H+ Q17L ; N2S+ P29L ; N3K+ Q12L+M26I
6	25	h-Region und früher reifer Proteinanteil	G19V ; G19V +V66M+G85D; Q17L ; T22A +D45G; T22I ; G25V ; G25W ; G28W ; P29L

Aufgeführt sind die isolierten mutierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten, welche in Abhängigkeit von der Position der enthaltenen Mutationen innerhalb des TorA[KQ]-Signalpeptids in sechs Kategorien eingeteilt werden können (Suppressortyp 1-6). Mutationen, welche im Tat-Konsensusmotiv liegen, sind unterstrichen. Mutationen innerhalb der h-Region sind fett hervorgehoben. Stille Mutationen wurden nicht berücksichtigt.

Bei ca. der Hälfte aller isolierten Reportervarianten konnten Mutationen im „Sec avoidance“-Motiv (R35, R36) festgestellt werden, welches in der c-Region des TorA-Signalpeptids für die Erhaltung der Tat-Spezifität und die Verhinderung eines Sec-abhängigen Exports essentiell ist (Suppressor-Kategorie 1) (Blaudeck *et al.*, 2003; Bogsch *et al.*, 1997; Cristobal *et al.*, 1999). Dabei wurden die beiden positiv geladenen Argininreste durch ungeladene Aminosäuren wie Leucin oder Cystein substituiert. Solche Mutationen können sich spontan aufgrund des Selektionsdrucks auf MMM ereignen. In diesem Fall wurde ihr Auftreten jedoch dadurch

begünstigt, dass bei der Konstruktion der Mutantenbibliothek mittels ep-PCR die c-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids ebenfalls mutagenisiert wurde. Eine Sec-abhängige Translokation dieser Reportervarianten wurde durch Transformation des *tat*-defizienten Stamms GSJ101 ($\Delta malE$, Δtat) mit den entsprechenden Reporterplasmidvarianten bestätigt. In allen Fällen wurde in Abwesenheit der Tat-Translokase ein effizientes Wachstum auf MMM nach 24 h beobachtet. Diese Sec-abhängig translozierten Reportervarianten wurden für die nachfolgende Analyse nicht berücksichtigt.

In 23 isolierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten konnten Aminosäureaustausche ausschließlich innerhalb des Tat-Konsensusmotivs in der n-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids festgestellt werden (Suppressor-Kategorie 2). In einigen Fällen lag dabei eine vollständige oder partielle Reversion des Lysin-Glutamin-Paars an der Zwillingsarginin-Position vor. Dabei wurden die beiden mutierten Aminosäurereste Lysin und Glutamin zu einem Zwillingsarginin oder einem RQ-Paar verändert. In anderen Reportervarianten reichte ein Austausch des mutierten Glutaminrests durch ein hydrophobes Leucin aus um den Exportdefekt zu supprimieren. Zudem wurde in einigen weiteren TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten dieser Suppressor-Kategorie eine Mutation des Alanins⁺⁴ innerhalb des Tat-Konsensusmotivs festgestellt. Offensichtlich kann durch die Substitution dieser Aminosäure durch ein hydrophobes Valin der Export von TorA[KQ]-30aa-MalE wiederhergestellt werden.

Fünf isolierte TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten wiesen neben der Mutation K11R im Tat-Konsensusmotiv den Aminosäureaustausch N3D im extremen N-Terminus der n-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids auf (Suppressor-Kategorie 3). In diesen Fällen ist sehr wahrscheinlich die Reversion des Lysin-Restes zu einem Arginin hauptsächlich für die Suppression des Exportdefekts verantwortlich, da die entsprechenden Stämme keine signifikanten Unterschiede im Wachstum auf MMM gegenüber den Stämmen zeigten, welche die TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervariante mit der Einzelmutation K11R exprimierten.

Fünf Reportervarianten enthielten Mutationen in der n-Region außerhalb des Tat-Konsensusmotivs (Suppressor-Kategorie 4). Dabei lag der Aminosäureaustausch Q8R entweder einzeln oder mit der Mutation N3K kombiniert vor. Da die Doppelmutation N3K+Q8R signifikant höhere Suppressoreigenschaften aufwies als die Einzelmutation Q8R, ist davon auszugehen, dass beide Mutationen den Exportdefekt im einzelnen Kontext supprimieren können. Dadurch, dass diese Mutationen nicht innerhalb der hydrophoben Region lagen, wurden diese jedoch nicht weiter analysiert.

Die übrigen 35 TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten wiesen schließlich auch Mutationen außerhalb der n-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids auf. In zehn Reporterproteinen lagen Mutationen in der n-Region in Kombination mit h-Region-lokalisierten Aminosäureaustauschen vor: R13H+Q17L, N2S+P29L und N3K+Q12L+M26I (Suppressor-Kategorie 5). Bei 25 mutierten Reportern wurden Mutationen nur innerhalb der h-Region (Q17L, G19V, T22I, G25V, G25W, G28W, P29L) bzw. in Kombination mit Aminosäuresubstitutionen im frühen reifen Proteinanteil

(G19V+V66M+G85D, T22A+D45G) nachgewiesen (Suppressor-Kategorie 6). Dabei handelte es sich überwiegend um Einzelmutationen.

In diesen beiden Suppressor-Kategorien 5 und 6 lagen die h-Region-lokaliserten Aminosäureaustausche Q17L, G19V und P29L entweder einzeln oder kombiniert mit den Mutationen R13H (n-Region), V66M+G85D (früher reifer Proteinanteil) bzw. N2S (n-Region) vor. Der Vergleich der Suppressorstärken ergab, dass die Exporteffizienz der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit den Einzelmutationen in der h-Region durch die zusätzlichen Aminosäureaustausche in der n-Region bzw. im frühen reifen Proteinanteil nicht signifikant gesteigert wurde. Daher ist davon auszugehen, dass die Mutationen Q17L, G19V und P29L hauptsächlich für die Wiederherstellung des Exports von TorA[KQ]-30aa-MalE verantwortlich sind. Im Falle der mutierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten, in welcher die Substitutionen N3K, Q12L und M26I kombiniert vorlagen, war der Beitrag der h-Region-Mutation M26I zur Suppression des Exportdefekts unklar, da diese nicht zusätzlich als Einzelmutation isoliert wurde. Wurde der Aminosäureaustausch M26I in die h-Region von TorA[KQ]-30aa-MalE mittels ortgerichteter Mutagenese eingeführt, so konnte keine signifikante Suppressoraktivität nachgewiesen werden. Der entsprechende Stamm wuchs nach wie vor nicht auf MMM. Daher kann angenommen werden, dass die übrigen Mutationen N3K und/oder Q12L in der n-Region für die Suppression des Exportdefekts verantwortlich sind. Im Falle der Doppelmutation T22A+D45G konnte durch die Trennung beider Mutationen gezeigt werden, dass die h-Region-lokalisierte Substitution T22A die Wiederherstellung des Exports von TorA[KQ]-30aa-MalE bewirkte. Die Mutation D45G im frühen reifen Proteinanteil hatte hingegen keinen Einfluss auf den Export dieser Transportinkompetenten Reportervariante.

Insgesamt wurden somit acht verschiedene Einzelmutationen in der h-Region identifiziert, welche den Exportdefekt von TorA[KQ]-30aa-MalE signifikant supprimieren. Zusätzlich wurde der Aminosäureaustausch A16V an der Grenze zwischen der n- und der h-Region berücksichtigt. Die Reportervarianten mit diesen Aminosäuresubstitutionen werden nachfolgend als iKQ-X bezeichnet, wobei X für die jeweilige intragene KQ-Suppressormutation steht (Tabelle 5).

Die Mutationen verteilen sich über die gesamte h-Region. Während die Aminosäureaustausche A16V, Q17L und G19V in der N-terminalen Hälfte der h-Region lokalisiert sind, befinden sich die Substitutionen T22A und T22I im Zentrum der h-Region. Im C-terminalen Bereich der h-Region konnten die Mutationen G25V, G25W, G28W und P29L identifiziert werden. Interessanterweise handelte es sich bei allen Einzelmutationen in der h-Region um Substitutionen der jeweiligen Aminosäuren durch jeweils hydrophobere Aminosäurereste. Dies deutet darauf hin, dass die Suppression des Exportdefekts von TorA[KQ]-30aa-MalE in diesen Fällen durch eine Erhöhung der Gesamthydrophobizität und damit auch der Qualität der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids erfolgte. In den Arbeiten von Cristobal *et al.* (1999) wurde gezeigt, dass eine Erhöhung der Hydrophobizität der h-Region des TorA-Signalpeptids das Vorliegen eines intakten „Sec avoidance“-Motivs in der c-Region kompensieren kann und daher ausreichend ist, um das Tat-Substrat in den Sec-Weg umzuleiten (Cristobal *et al.*, 1999). Um zu überprüfen, ob der Export der

TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit h-Region-lokaliserten Suppressormutationen strikt Tat-abhängig erfolgte, wurde der *malE*- und *tat*-defiziente Stamm GSJ101 ($\Delta malE$, Δtat) mit den entsprechenden Reporterplasmiden transformiert. Bei sechs mutierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Varianten erfolgte der Export Tat-spezifisch, da in Abwesenheit einer funktionalen Tat-Translokase kein Wachstum mit Maltose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle nachgewiesen werden konnte (Tabelle 5, Spalte 4). Die Mutationen Q17L, G19V und P29L in den Reportervarianten iKQ-Q17L, iKQ-G19V bzw. iKQ-P29L erlaubten hingegen einen partiellen Transport über den Sec-Weg. Diese duale Spezifität dieser Reporterproteine für beide Translokationssysteme wird im Abschnitt 1.9 analysiert. Zunächst wird der Fokus auf diejenigen Reportervarianten gerichtet, welche nur Tat-abhängig über die Cytoplasmamembran transportiert werden.

Tabelle 5: Isolierte TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit Mutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids, welche den Exportdefekt supprimieren.

Reporter- variante iKQ-X	Mutationen in der h-Region des TorA[KQ]- Signalpeptids	Wachstum von <i>E. coli</i> GSJ101 (pTorA[KQ, X]-30aa-MalE, pHSG-TatABCE) auf MMM nach 24 h	Wachstum von <i>E. coli</i> GSJ101 (pTorA[KQ, X]-30aa-MalE, Δtat) auf MMM nach 24 h
iKQ-A16V	A16V	+	-
iKQ-Q17L	Q17L	++(+)	+
iKQ-G19V	G19V	++	+
iKQ-T22A	T22A	+	-
iKQ-T22I	T22I	+++	-
iKQ-G25V	G25V	+++	-
iKQ-G25W	G25W	++	-
iKQ-G28W	G28W	+	-
iKQ-P29L	P29L	++	+
1	2	3	4

iKQ-X: Reportervariante mit der intragenen KQ-Suppressormutation X. Phänotypen auf MMM: +++: effizientes Wachstum; ++: moderates Wachstum; +: langsames Wachstum; -: kein signifikantes Wachstum mit Maltose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle (MMM).

1.3 Untersuchung der Suppression des Exportdefekts von TorA[KQ]-30aa-MalE durch h-Region-lokalisierte Mutationen im TorA[KQ]-Signalpeptid

Der Export der Tat-spezifischen mutierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten wurde nun indirekt auf MMM/MCM-Agarplatten sowie direkt durch die Bestimmung der reifen MalE-Proteinmengen in den Periplasmafraktionen der entsprechenden Stämme nach erfolgter Zellfraktionierung analysiert. Hierzu wurde der *E. coli* –Stamm GSJ101 ($\Delta malE$, pHSG-TatABCE), welcher die Plasmid-kodierten *tat* –Gene coexprimierte, mit den jeweiligen Reporterplasmiden transformiert.

Anschließend wurden die Zellen wie in Kapitel III Abschnitt 5.4 beschrieben mittels osmotischen Schocks in eine kombinierte C/M-Fraktion und in eine PP-Fraktion getrennt. Nach Auftrennung der Proteine der beiden Zellfraktionen durch SDS-PAGE (Kapitel III, Abschnitt 5.1) und Übertragung auf eine Nitrocellulosemembran via Western-Blot (Kapitel III, Abschnitt 5.3), erfolgte der Nachweis der *malE* –Genprodukte mit MalE-spezifischen Antikörpern. Die Qualität der

Zellfraktionierung wurde durch den Nachweis der membranassoziierten Komponente des Sec-Systems, SecA, überprüft. Wurde die PP-Fraktion vollständig von der C/M-Fraktion getrennt, so kann SecA nur in der C/M-Fraktion nachgewiesen werden. Diese Lysekontrolle wird in den folgenden Experimenten nur dann gezeigt, wenn signifikante SecA-Mengen auch in der PP-Fraktion detektiert wurden. Die MalE-Polypeptide wurden über die Erzeugung von Chemilumineszenz mit Hilfe des ECL-Systems visualisiert, wobei die Signale mit einer CCD-Kamera dokumentiert wurden. Zusätzlich erfolgte zur Bestimmung der relativen Exporteffizienzen der jeweiligen Reportervarianten eine Quantifizierung der Chemilumineszenz-Signale auf der Basis von mindestens drei unabhängigen Zellfraktionierungsexperimenten mit Hilfe des Programms Aida. Dabei wurde die exportierte Menge der Positivkontrolle TorA[RR]-30aa-MalE durch die Wildtyp-Tat-Translokase als 100% festgesetzt.

Wie in Abbildung 16 dargestellt, zeigten die *E. coli* -Stämme GSJ101 ($\Delta malE$, Δtat), welche die verschiedenen Reportervarianten zusammen mit der Wildtyp-Tat-Translokase exprimierten, unterschiedliche *in situ* Phänotypen im MMM/MCM-Plattenassay. Sie unterschieden sich in der Rotfärbung der Kolonien auf MCM und wiesen zudem verschiedene Wachstumsraten mit Maltose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle auf.

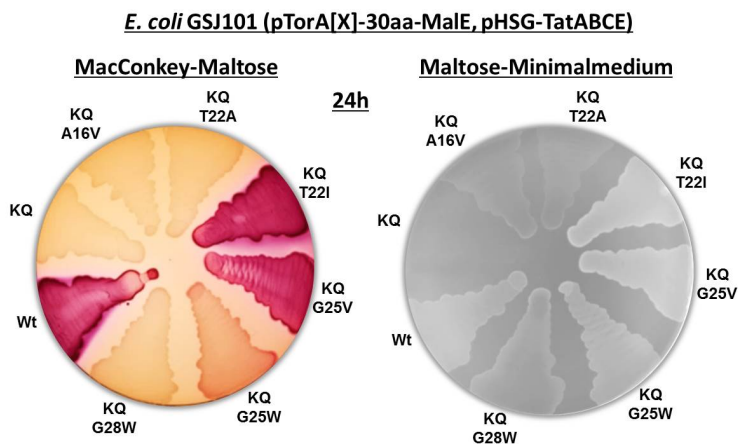


Abbildung 16: Phänotypen von *E. coli* GSJ101 ($\Delta malE$, pHSG-TatABCE) mit den verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten auf MCM (links) und MMM (rechts) nach einer Inkubationszeit von 24 h. Die jeweiligen Mutationen (X) im TorA-Signalpeptid des TorA-30aa-MalE-Reporterproteins sind neben den einzelnen Sektoren aufgeführt. Als Positivkontrolle diente der Stamm GSJ101, welcher die Tat-Translokase und den unveränderten TorA-30aa-MalE Reporter (Wt) coexprimierte und als Negativkontrolle der Stamm GSJ101 (pHSG-TatABCE), der die exportdefekte TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervariante (KQ) enthielt.

Die Mutationen T22I, G25V und G25W, welche relativ im Zentrum der h-Region lokalisiert sind, zeigten dabei die höchsten Suppressoraktivitäten. Die entsprechenden Stämme bildeten rote oder im Falle von G25W rosafarbige Kolonien auf MCM und wuchsen effizient bzw. moderat auf MMM. Im Vergleich dazu bewirkten die Mutationen A16V, T22A und G28W eine deutlich geringere Suppression des Exportdefekts von TorA[KQ]-30aa-MalE, welche sich in dem langsamen Wachstum der jeweiligen *E. coli* -Stämme auf MMM und der Bildung von weissen Kolonien auf

MCM widerspiegelte. Dennoch konnte im Gegensatz zur Negativkontrolle GSJ101 (pTorA[KQ]-30aa-MalE, pHSG-TatABCE), die den TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporter mit unveränderter h-Region exprimierte, in allen Fällen ein signifikantes Wachstum der entsprechenden Stämme auf MMM nachgewiesen werden. Daher kann angenommen werden, dass die Aminosäureaustausche innerhalb der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids die Ursache für die beobachtete Wiederherstellung des Transports des normalerweise exportdefekten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterproteins darstellen. Des Weiteren deutete das Exportverhalten der einzelnen Reportervarianten mit h-Region-lokalisierten Suppressormutationen auf eine funktionale Beziehung zwischen der Hydrophobizität des TorA-Signalpeptids und der beobachteten Exporteffizienz hin. Die Substitution der polaren bzw. neutralen Aminosäure Threonin an der Position 22 bzw. Glycin an der Position 25 im Zentrum der h-Region durch einen stark hydrophoben Isoleucin- bzw. Valinrest resultierte offensichtlich in einem viel höheren Export der entsprechenden Reportervarianten (effizientes Wachstum auf MMM; rote Kolonien auf MCM) im Vergleich zu einem Austausch dieser Aminosäuren durch weniger hydrophobe Aminosäurereste wie Alanin oder Tryptophan (langsames bzw. moderates Wachstum auf MMM; weisse bzw. rosafarbige Kolonien auf MCM).

Die darauffolgende Untersuchung des Exports der isolierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Varianten auf Proteinebene sollte einen Aufschluss über die genauen Exporteffizienzen geben. Wie in Abbildung 17 A gezeigt, konnten verschiedene MalE-Polypeptide, welche dem unprozessierten Vorläuferprotein sowie dessen Abbauprodukten entsprechen, in den C/M-Fractionen der *E. coli* - Stämme GSJ101 ($\Delta malE$, pHSG-TatABCE) nachgewiesen werden, die entweder das unveränderte Reporterprotein TorA-30aa-MalE (Positivkontrolle; Spur 1), den exportdefekten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporter (Negativkontrolle; Spur 2) oder die verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit h-Region-lokalisierten Suppressormutationen (Spuren 3-8) exprimierten (Blaudeck *et al.*, 2005). Signifikante Mengen reifen MalE-Proteins wurden nur in den PP-Fractionen der Stämme, welche die Positivkontrolle oder die Reportervariante iKQ-T22I bzw. iKQ-G25V enthielten, detektiert (Spuren 1, 5, 6). Dies weist darauf hin, dass die exportierten MalE-Mengen in den übrigen Fällen zu gering sind, um auf Proteinebene nachgewiesen zu werden. Die darauffolgende Quantifizierung der Chemilumineszenz-Signale bestätigte, dass die Exporteffizienzen der mutierten Reportervarianten ins Periplasma im Vergleich zur Positivkontrolle (100%) zumeist eher gering waren (Abbildung 17 B). Die höchsten Translokationseffizienzen wurden für die Reportervarianten iKQ-G25V und iKQ-T22I bestimmt, und betrugen 13,5% bzw. 10,9%. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den beobachteten Phänotypen der entsprechenden Stämme im Plattenassay, welche hierbei das stärkste Wachstum auf MMM sowie eine rote Kolonienfarbe auf MCM aufwiesen.

Die übrigen Reportervarianten iKQ-G25W, iKQ-G28W und iKQ-A16V wurden mit einer geringen Effizienz von 1,4% (iKQ-G28W, iKQ-A16V) bis 3,7% (iKQ-G25W) exportiert, welche deutlich unterhalb der Exporteffizienzen von iKQ-G25V und iKQ-T22I liegt. Bei der Mutation T22A konnte mit 0,9% relativer Translokationseffizienz die geringste Suppression des Exportdefekts von

TorA[KQ]-30aa-MalE beobachtet werden. An dieser Stelle wird deutlich, wie sensitiv der MMM/MCM-Plattenassay ist: ein geringfügiger MalE-Export von 3,7% im Falle der Reportervariante iKQ-G25W, welcher auf Proteinebene nicht detektierbar ist, erlaubte bereits ein moderates Wachstum des entsprechenden Stamms auf MMM sowie die Bildung rosafarbiger Kolonien auf MCM.

Dennoch zeigen diese Ergebnisse deutlich, dass Mutationen in der h-Region, welche eine Erhöhung der Gesamthydrophobizität des TorA[KQ]-Signalpeptids bewirken, den Verlust des Zwillingsarginin-Motivs zumindest partiell kompensieren und den Export von TorA[KQ]-30aa-MalE wiederherstellen können. Es ist möglich, dass durch die erhöhte Hydrophobizität des Signalpeptids die Substrat-Rezeptor-Wechselwirkungen innerhalb der hydrophoben TatBC-Bindetasche verstärkt werden. Damit wurde die Hypothese, dass die h-Region direkt in die produktive Bindung des TorA-Signalpeptids an den TatBC-Rezeptorkomplex involviert sein könnte, bekräftigt.

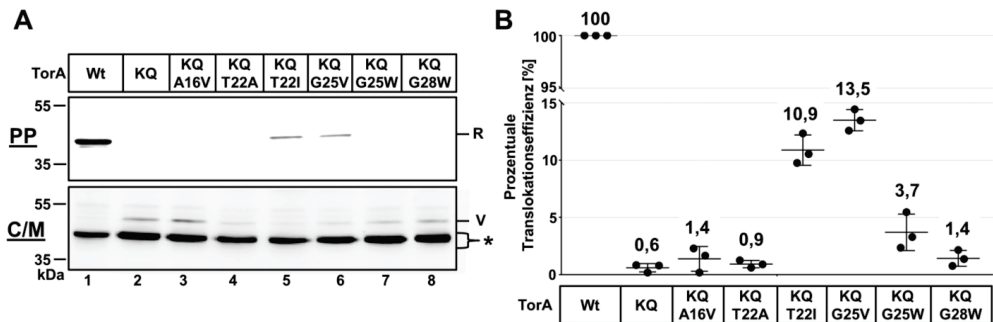


Abbildung 17: Untersuchung des Tat-abhängigen Exports der isolierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit Mutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids in *E. coli* GSJ101 (pHSG-TatABCE). (A) Subzelluläre Lokalisation der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit h-Region-lokaliserten Mutationen nach erfolgter Zellfraktionierung von *E. coli* GSJ101 zur Untersuchung des Exports aus dem Cytosol ins Periplasma auf Proteinebene. Dargestellt sind Proben des Stamms GSJ101 mit Plasmid-kodierter Tat-Translokase und den verschiedenen isolierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten. Die vorliegenden Mutationen im TorA-Signalpeptid der entsprechenden Reportervarianten sind über den jeweiligen Spuren angegeben. Wt: TorA-30aa-MalE; KQ: TorA[KQ]-30aa-MalE; KQ X: TorA[KQ,X]-30aa-MalE mit X= A16V, T22A, T22I, G25V, G25W bzw. G28W. Als Positivkontrolle diente *E. coli* GSJ101 (pTorA-30aa-MalE, pHSG-TatABCE), welcher die Tat-Translokase und den unveränderten TorA-30aa-MalE-Reporter (Wt) coexprimiert (Spur 1), und als Negativkontrolle der Stamm GSJ101 (pTorA[KQ]-30aa-MalE, pHSG-TatABCE), der das exportdefekte Reporterprotein TorA[KQ]-30aa-MalE (KQ) enthält (Spur 2). Die Zellen wurden mittels osmotischen Schocks in eine Periplasma-Fraktion (PP) und eine kombinierte Cytoplasma/Membran-Fraktion (C/M) getrennt. Anschließend wurden Proben der Zellfraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Für die C/M-Fraktion wurden 10 µg Gesamtprotein aufgetragen und für die PP-Fraktion 4 µg. Die Proteine wurden anschließend mittels Western-Blot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Der Nachweis der malE-Genprodukte erfolgte durch MalE-spezifische Antikörper. Im Periplasma liegt die reife MalE-Form (R) vor, während in der C/M-Fraktion die oberste Bande das jeweilige MalE-Vorläuferprotein (V) und die darunter liegenden Banden cytoplasmatische Abbauprodukte (*) von MalE repräsentieren. Die Positionen der 35 kDa- und 55 kDa-Markerbande sind am linken Rand der Abbildung markiert. Der Nachweis des Anti-Rabbit IgG Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers erfolgte mit Hilfe des „Amersham ECL™ Western Blotting System“ (GE Healthcare, München). Die Chemilumineszenzsignale wurden mit der „LAS-3000 Mini“ CCD-Kamera (Fujifilm) detektiert. (B) Die prozentualen Translokationseffizienzen [%] wurden in drei unabhängigen Experimenten über die Quantifizierung der Chemilumineszenzsignale mit Hilfe der Software AIDA Image Analyzer Version 4.50 (Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt) bestimmt. Die schwarzen Punktsymbole repräsentieren jeweils die Werte aus den drei durchgeführten Experimenten, wobei der Mittelwert als Zahl über den Werten ausgeschrieben sowie durch eine horizontale Linie markiert ist. Dargestellt sind zudem die jeweiligen Standardabweichungen als Fehlerbalken.

1.4 Untersuchung der Auswirkung von Kombinationen der h-Region-lokalisierten Suppressormutationen auf den Export von TorA[KQ]-30aa-MalE

Im vorhergehenden Abschnitt wurde gezeigt, dass eine einzige Mutation in der h-Region, welche die Hydrophobizität des TorA[KQ]-Signalpeptids erhöht, prinzipiell ausreichend ist um den Transportdefekt von TorA[KQ]-30aa-MalE zu supprimieren und signifikantes Wachstum mit Maltose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle zu ermöglichen. Die Mutation G25V wies dabei die stärksten Suppressoreigenschaften auf und stellte den Export der entsprechenden TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervariante iKQ-G25V zu 13,5% wieder her. Nun galt es zu untersuchen, ob eine Kombination der h-Region-lokalisierten Einzelmutationen den Export von TorA[KQ]-30aa-MalE weiter verbessern und einen additiven oder sogar synergistischen Effekt auf die Translokationseffizienz haben würde. Insgesamt wurden sieben verschiedene Reportervarianten mit einer Doppelmutation in der h-Region konstruiert: iKQ-G25V+G28W, iKQ-G25W+G28W, iKQ-A16V+G19V, iKQ-A16V+G25W, iKQ-A16V+G28W, iKQ-A16V+T22I und iKQ-T22A+G28W. Hierfür wurden, wie in Kapitel III Abschnitt 4.12 beschrieben, die jeweiligen Mutationen durch ortsgerichtete Mutagenese in das pTorA[KQ]-30aa-MalE-Plasmid eingeführt, wobei die Reporterplasmidvarianten, in denen bereits eine Mutation vorlag als Matrize eingesetzt wurden. Da eine Substitution von zwei Aminosäuren durch jeweils hydrophobere Aminosäurereste die Gesamthydrophobizität des TorA[KQ]-Signalpeptids deutlich erhöht und dadurch einen Export über das Sec-System begünstigt, musste zunächst zwingend die Tat-Spezifität der neu konstruierten Reportervarianten überprüft werden. Hierzu wurde der *tat*-defiziente *E. coli*-Stamm GSJ101 mit den entsprechenden Reporterplasmidvarianten transformiert. Wie in Abbildung 18 gezeigt, erfolgte der Transport von fünf Reportervarianten strikt Tat-abhängig, da kein Wachstum der entsprechenden *E. coli* Stämme GSJ101 ($\Delta malE$, Δtat) auf MMM sowie keine Rotfärbung der Kolonien auf MCM in Abwesenheit einer funktionalen Tat-Translokase nachgewiesen werden konnte.

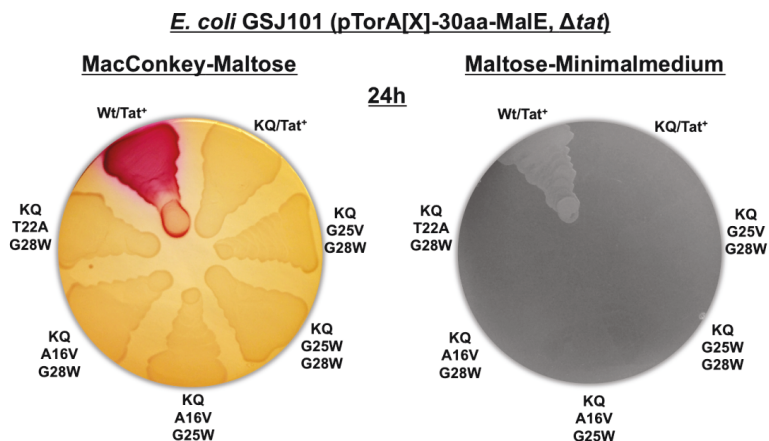


Abbildung 18: Ausschluss einer Sec-abhängigen Translokation der neu konstruierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit Doppelmutationen innerhalb der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids.

Dargestellt sind die Phänotypen von *E. coli* GSJ101 ($\Delta malE$, Δtat) mit den verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten auf MCM (links) und MMM (rechts) nach einer Inkubationszeit von 24 h. Die jeweiligen Mutationen (X) im TorA-Signalpeptid des TorA-30aa-MalE-Reporterproteins sind neben den einzelnen Sektoren aufgeführt. Wt: TorA-30aa-MalE; KQ: TorA[KQ]-30aa-MalE; KQ X: TorA[KQ,X]-30aa-MalE mit X= G25V+G28W, G25W+G28W, A16V+G25W, A16V+G28W bzw. T22A+G28W. Als Positivkontrolle diente der Stamm GSJ101, welcher die Tat-Translokase und den unveränderten TorA-30aa-MalE Reporter (Wt/Tat⁺) coexprimierte und als Negativkontrolle der Stamm GSJ101 (pHSG-TatABCE), der die exportdefekte TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervariante enthielt (KQ/Tat⁺).

Im Falle der Reportervarianten iKQ-A16V+G19V und iKQ-A16V+T22I konnte ein signifikantes Wachstum des *tat* –defizienten Stamms mit Maltose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle beobachtet werden (nicht gezeigt). Die Untersuchung des zumindest partiellen Sec-abhängigen Exports dieser Reporterproteine wird im Abschnitt 1.9 beschrieben.

Nach Ausschluss einer Sec-abhängigen Translokation, wurde der Export der Tat-spezifischen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten auf MMM/MCM-Agarplatten sowie auf Proteinebene untersucht. Hierzu wurde der *E. coli* –Stamm GSJ101 ($\Delta malE$, pHSG-TatABCE), welcher über eine Plasmid-kodierte Tat-Translokase verfügte, mit den entsprechenden pTorA[KQ]-30aa-MalE-Plasmidvarianten transformiert. Der Stamm GSJ101 (pTorA-30aa-MalE, pHSG-TatABCE), der den unveränderten TorA-30aa-MalE-Reporter enthielt, diente hierbei als Positivkontrolle und GSJ101 (pTorA[KQ]-30aa-MalE, pHSG-TatABCE), welcher die exportdefekte TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervariante exprimiert, als Negativkontrolle.

Bei den Reportervarianten iKQ-G25V+G28W und iKQ-G25W+G28W wurden die Einzelmutationen G25V bzw. G25W, welche bereits starke oder mäßige Suppressoreigenschaften in den *in situ* –Plattenassays zeigten und ein effizientes bzw. moderates Wachstum der entsprechenden Stämme auf MMM sowie die Bildung roter bzw. rosafarbiger Kolonien auf MCM erlaubten, mit der Suppressormutation G28W kombiniert. Diese ist im extremen C-Terminus der h-Region lokalisiert und bewirkt nur einen geringfügigen Export der jeweiligen Reportervariante ins Periplasma (1,4%). Wie in Abbildung 19 gezeigt, führte die Kombination zweier Suppressormutationen in beiden Fällen zu einer deutlich stärkeren Suppression des Exportdefekts von TorA[KQ]-30aa-MalE im Vergleich zu den Suppressorphänotypen, welche durch die jeweiligen Einzelmutationen G25V, G25W bzw. G28W erzeugt werden. Die entsprechenden Stämme unterschieden sich phänotypisch nicht von der Positivkontrolle GSJ101 (pTorA-30aa-MalE, pHSG-TatABCE) und zeichneten sich durch ein effizientes Wachstum auf MMM sowie eine tiefe Rotfärbung der Kolonien auf MCM aus. Um zu prüfen, ob sich die Kombinationen der Mutationen additiv oder synergistisch auf die Exporteffizienz auswirken, wurden die exportierten MalE-Mengen in den Periplasmafraktionen der jeweiligen Stämme quantifiziert (Abbildung 22 A, D). Im Einklang mit den beobachteten *in situ* Phänotypen im Plattenassay, konnte eine erhebliche Zunahme des MalE-Exports ins Periplasma durch die Doppelmutationen G25V+G28W bzw. G25W+G28W auch auf Proteinebene nachgewiesen werden (Abbildung 22 A, vgl. Spuren 3-5 mit 6 und 7). Diese Auswirkung der Kombinationen zweier Mutationen kann hierbei als synergistisch angesehen werden, da die Exporteffizienzen der Reportervarianten iKQ-G25V+G28W (28,2%) bzw. iKQ-G25W+G28W (19,2%) signifikant höher waren als die Summe der Translokationseffizienzen der Reporterproteine iKQ-G25V (13,5%), iKQ-G25W (3,7%) bzw. iKQ-G28W (1,4%) mit den jeweiligen Einzelmutationen (Abbildung 22 D, vgl.

Spuren 8 und 9 mit 5-7). Dieser synergistische Effekt wird insbesondere bei der Kombination der zwei schwächeren Suppressormutationen G25W und G28W deutlich, welche im einzelnen Kontext keinen ausreichenden MalE-Export erlaubten um eine Rotfärbung der Kolonien der entsprechenden Stämme auf MCM zu induzieren – in Kombination jedoch zu einem starken Suppressorphänotyp führen, welcher sich durch ein effizientes Wachstum auf MMM sowie durch die Bildung tiefroter Kolonien auf MCM auszeichnet (Abbildung 19; Abbildung 22 A, vgl. Spuren 4 und 5 mit 7).

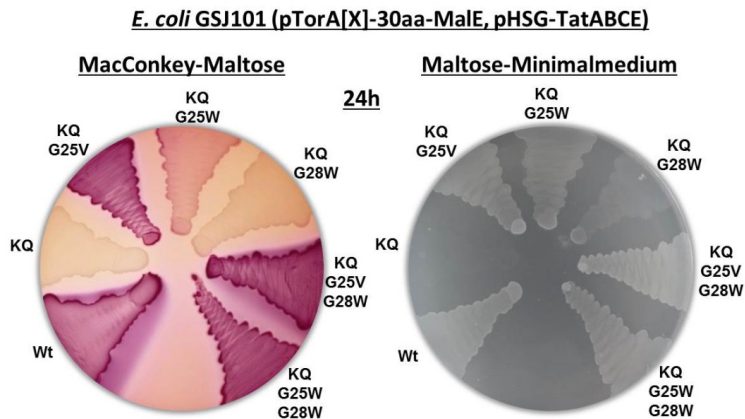


Abbildung 19: Phänotypen von *E. coli* GSJ101 ($\Delta malE$, pHSG-TatABCE) mit den verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten auf MCM (links) und MMM (rechts) nach einer Inkubation von 24 h. Die jeweiligen Mutationen (X) im TorA-Signalpeptid des TorA-30aa-MalE-Reporterproteins sind neben den einzelnen Sektoren aufgeführt. Wt: TorA-30aa-MalE; KQ: TorA[KQ]-30aa-MalE; KQ X: TorA[KQ,X]-30aa-MalE mit X= G25V, G25W, G28W, G25V+G28W bzw. G25W+G28W. Als Positivkontrolle diente der Stamm GSJ101, welcher die Tat-Translokase und den unveränderten TorA-30aa-MalE Reporter (Wt) coexprimierte und als Negativkontrolle der Stamm GSJ101 (pHSG-TatABCE), der die exportdefekte TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervariante (KQ) enthielt.

Die Lage der bisher kombinierten Suppressormutationen beschränkte sich auf die C-terminale Hälfte der h-Region. Um zu prüfen, ob der beobachtete synergistische Effekt von Doppelmutationen auf die Exporteffizienz von TorA[KQ]-30aa-MalE von der genauen Position der Mutationen innerhalb der h-Region abhängig ist, wurden die Aminosäureaustausche A16V, T22A, G25W und G28W, welche über die gesamte h-Region verteilt sind, miteinander kombiniert. Sollte sich auch eine Kombination von Mutationen, welche an den beiden extremen Termini der h-Region lokalisiert sind, gleichermaßen synergistisch auf die Translokationseffizienz von TorA[KQ]-30aa-MalE auswirken, so kann davon ausgegangen werden, dass die gesamte h-Region des TorA-Signalpeptids in die TatBC-Rezeptorbindung involviert ist.

Die Mutation A16V liegt an der Grenze zwischen der n- und h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids und bewirkt nur einen geringfügigen MalE-Export von 1,4%, welcher für eine Rotfärbung der Kolonien des jeweiligen Stamms auf MCM nicht ausreichend ist. Wurde diese jedoch mit der Mutation G25W bzw. G28W in der C-terminalen Hälfte der h-Region, welche den Export von TorA[KQ]-30aa-MalE zu 3,7% bzw. 1,4% wiederherstellen, kombiniert, so konnte, wie auch bei den zuvor beschriebenen Kombinationen G25V+G28W und G25W+G28W, eine starke Zunahme der Exporteffizienz von TorA[KQ]-30aa-MalE durch die Wildtyp-Tat-Translokase sowohl im

Plattenassay als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden (Abbildung 20; Abbildung 22 B und D). Die entsprechenden *E. coli* –Stämme zeigten eine tiefe Rotfärbung der Kolonien auf MCM und wiesen im Vergleich zu den Stämmen, welche die Reportervarianten iKQ-A16V, iKQ-G25W bzw iKQ-G28W mit den entsprechenden Einzelmutationen enthielten, ein effizienteres Wachstum auf MMM auf (Abbildung 20).

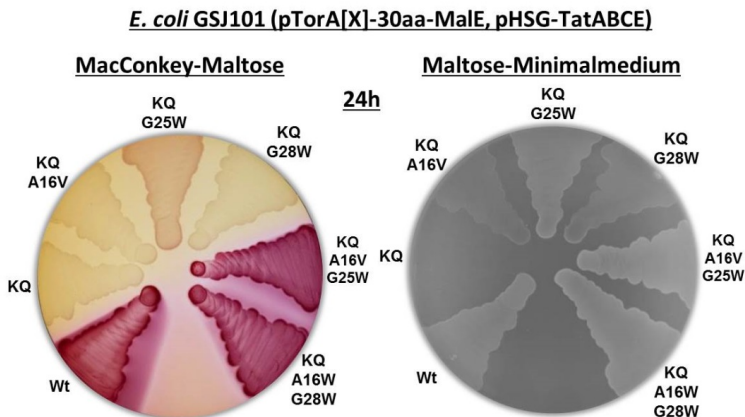


Abbildung 20: Phänotypen von *E. coli* GSJ101 ($\Delta malE$, pHSG-TatABCE) mit den verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten auf MCM (links) und MMM (rechts) nach einer Inkubation von 24 h. Die jeweiligen Mutationen (X) im TorA-Signalpeptid des TorA-30aa-MalE-Reporterproteins sind neben den einzelnen Sektoren aufgeführt. Wt: TorA-30aa-MalE; KQ: TorA[KQ]-30aa-MalE; KQ X: TorA[KQ,X]-30aa-MalE mit X= A16V, G25W, G28W, A16V+G25W bzw. A16V+G28W. Als Positivkontrolle diente der Stamm GSJ101, welcher die Tat-Translokase und den unveränderten TorA-30aa-MalE Reporter (Wt) coexprimierte und als Negativkontrolle der Stamm GSJ101 (pHSG-TatABCE), der die exportdefekte TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervariante (KQ) enthielt.

Durch die Bestimmung der relativen Translokationseffizienzen konnte bestätigt werden, dass diese Mutationen hierbei synergistisch bei der Suppression des Exportdefekts von TorA[KQ]-30aa-MalE agieren (Abbildung 22 D). Während die Einzelmutationen A16V, G25W und G28W nur einen geringfügigen Transport von TorA[KQ]-30aa-MalE mit einer Effizienz von 1,4% bis 3,7% durch die Wildtyp-Tat-Translokase vermittelten, konnten für die Reportervarianten iKQ-A16V+G25W bzw. iKQ-A16V+G28W, welche die entsprechenden Doppelmutationen aufwiesen, deutlich höhere Translokationseffizienzen von 14,7% bzw. 25,2% nachgewiesen werden (Abbildung 22 B, vgl. Spuren 3-5 mit 6 und 7; D, vgl. Spuren 3, 6 und 7 mit 10 und 11). Überraschenderweise war die Zunahme der Exporteffizienz von TorA[KQ]-30aa-MalE im Falle der Kombination der zwei schwächsten Suppressormutationen A16V und G28W, welche im einzelnen Kontext den Export lediglich zu 1,4% wiederherstellen können, deutlich höher als bei einer Kombination der Aminosäuresubstitution A16V mit der stärkeren Suppressormutation G25W (3,7%). Da bei beiden Mutationen ein neutrales Glycin durch einen aromatischen Tryptophanrest substituiert wurde, scheint die Position der jeweiligen Mutationen innerhalb der h-Region einen Einfluss auf die Suppressorstärke zu haben.

Die synergistische Zusammenwirkung zweier Mutationen bei der Wiederherstellung des TorA[KQ]-30aa-MalE-Exports konnte auch für die zuletzt konstruierte Reportervariante iKQ-

T22A+G28W gezeigt werden (Abbildung 21; Abbildung 22 C, D). Die Mutation T22A befindet im Zentrum der h-Region und weist mit den Aminosäureaustauschen A16V und G28W die schwächsten Suppressoreigenschaften auf. Sowohl die Mutation T22A als auch die Substitution G28W im C-Terminus der h-Region erlauben zwar ein langsames, jedoch signifikantes Wachstum der entsprechenden Stämme mit Maltose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle. Die Metabolisierung von Maltose ist jedoch in beiden Fällen nicht ausreichend um einen Farbumschlag auf MCM zu induzieren. Wurden beide Mutationen miteinander kombiniert, so konnte eine deutliche Zunahme der Exporteffizienz von TorA[KQ]-30aa-MalE beobachtet werden, welche sich im effizienten Wachstum auf MMM sowie der Ausbildung tiefroter Kolonien auf MCM des entsprechenden Stamms widerspiegelte (Abbildung 21). Auf Proteinebene konnte für die Reportervariante iKQ-T22A+G28W eine Exporteffizienz von 12,6% bestimmt werden, welche deutlich oberhalb der Summe der Translokationseffizienzen lag, die durch die jeweiligen Einzelmutationen T22A (0,9%) und G28W (1,4%) vermittelt wurden (Abbildung 22 C, vgl. Spuren 3 und 4 mit Spur 5; D, vgl. Spuren 4 und 7 mit 12).

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die isolierten Mutationen in der h-Region des TorA[KQ] – Signalpeptids, im Falle von Kombinationen, synergistisch bei der Suppression des Exportdefekts von TorA[KQ]-30aa-MalE zusammenwirken. Da der synergistische Effekt von Doppelmutationen auf die Exporteffizienz von TorA[KQ]-30aa-MalE bei allen getesteten Kombinationen (unabhängig von der genauen Lage der jeweiligen Einzelmutationen innerhalb der h-Region) beobachtet werden konnte, kann angenommen werden, dass die gesamte h-Region in den Bindeprozess von Tat-Signalpeptiden an den TatBC-Rezeptorkomplex involviert ist.

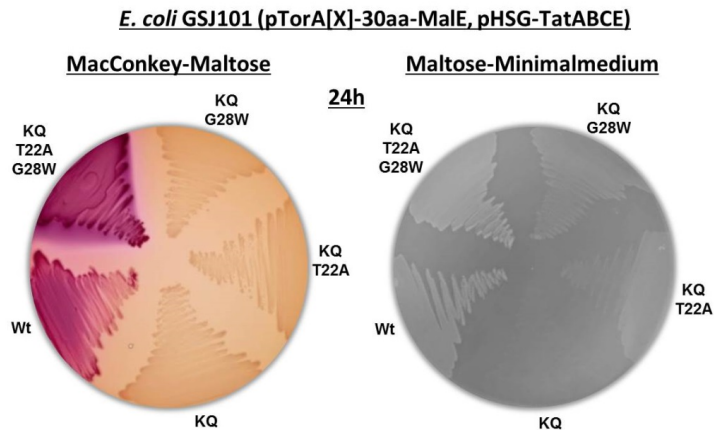


Abbildung 21: Phänotypen von *E. coli* GSJ101 ($\Delta malE$, pHSG-TatABCE) mit den verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten auf MCM (links) und MMM (rechts) nach einer Inkubation von 24 h. Die jeweiligen Mutationen (X) im TorA-Signalpeptid des TorA-30aa-MalE-Reporterproteins sind neben den einzelnen Sektoren aufgeführt. Wt: TorA-30aa-MalE; KQ: TorA[KQ]-30aa-MalE; KQ X: TorA[KQ,X]-30aa-MalE mit X= T22A, G28W bzw. T22A+G28W. Als Positivkontrolle diente der Stamm GSJ101, welcher die Tat-Translokase und den unveränderten TorA-30aa-MalE Reporter (Wt) coexprimierte und als Negativkontrolle der Stamm GSJ101 (pHSG-TatABCE), der die exportdefekte TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervariante (KQ) enthielt.

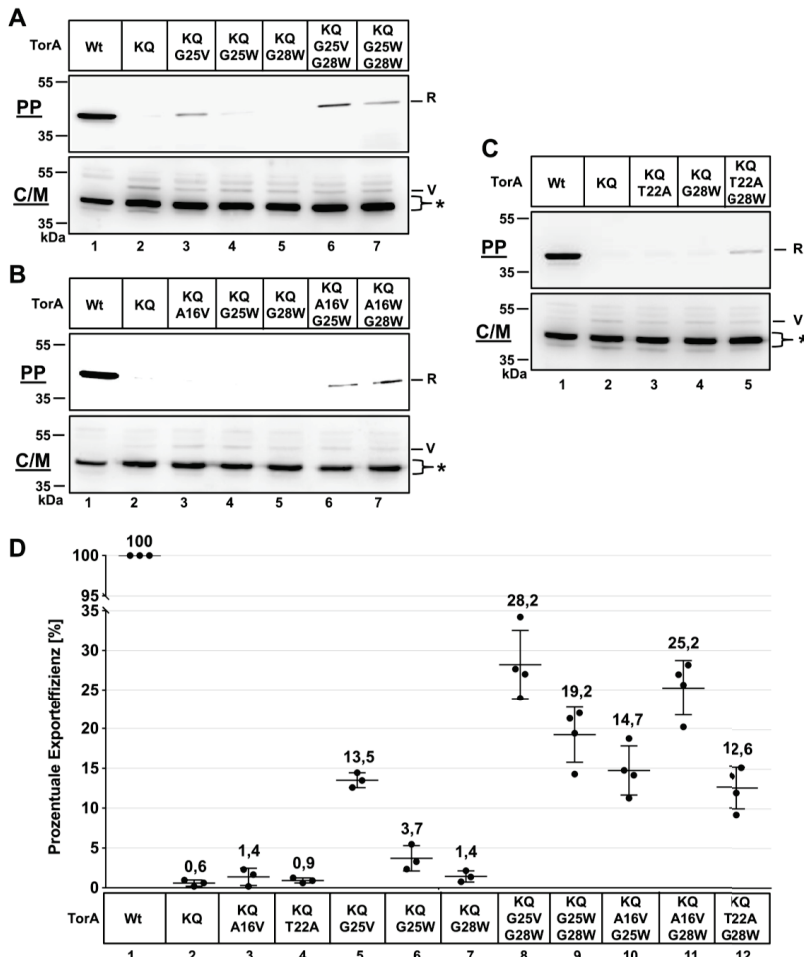


Abbildung 22: Untersuchung des Tat-abhängigen Exports der verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit Einzel- und Doppelmutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids in *E. coli* GSJ101 (pHSG-TatABCE). (A, B, C) Subzelluläre Lokalisation der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit h-Region-lokalisierten Mutationen nach erfolgter Zellfraktionierung von *E. coli* GSJ101 zur Untersuchung des Exports aus dem Cytosol ins Periplasma auf Proteinebene. Dargestellt sind Proben des Stamms GSJ101 mit Plasmid-kodierter Tat-Translokase und den verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten. Die vorliegenden Mutationen im TorA-Signalpeptid der entsprechenden Reportervarianten sind über den jeweiligen Spuren angegeben. Wt: TorA-30aa-MalE; KQ: TorA[KQ]-30aa-MalE; KQ X: TorA[KQ,X]-30aa-MalE mit (A) X= G25V, G25W, G28W, G25V+G28W bzw. G25W+G28W, (B) X= A16V, G25W, G28W, A16V+G25W bzw. A16V+G28W, (C) X= T22A, G28W bzw. T22A+G28W. Als Positivkontrolle diente *E. coli* GSJ101 (pTorA-30aa-MalE, pHSG-TatABCE), welcher die Tat-Translokase und den unveränderten TorA-30aa-MalE-Reporter (Wt) coexprimiert (Spur 1), und als Negativkontrolle der Stamm GSJ101 (pTorA[KQ]-30aa-MalE, pHSG-TatABCE), der das exportdefekte Reporterprotein TorA[KQ]-30aa-MalE enthält (Spur 2). Die Zellen wurden mittels osmotischen Schocks in eine Periplasma-Fraktion (PP) und eine kombinierte Cytoplasma/Membran-Fraktion (C/M) getrennt. Anschließend wurden Proben der Zellfraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Für die C/M-Fraktion wurden 10 µg Gesamtprotein aufgetragen und für die PP-Fraktion 4 µg. Die Proteine wurden anschließend mittels Western-Blot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Der Nachweis der malE-Genprodukte erfolgte durch MalE-spezifische Antikörper. Im Periplasma liegt die reife MalE-Form (R) vor, während in der C/M-Fraktion die oberste Bande das jeweilige MalE-Vorläuferprotein (V) und die darunter liegenden Banden cytoplasmatische Abbauprodukte (*) von MalE repräsentieren. Die Positionen der 35 kDa- und 55 kDa-Markerbande sind am linken Rand der Abbildung markiert. Der Nachweis des Anti-Rabbit IgG Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers erfolgte mit Hilfe des „Amersham ECL™ Western Blotting System“ (GE Healthcare, München). Die Chemilumineszenzsignale wurden mit der „LAS-3000 Mini“ CCD-Kamera (Fujifilm) detektiert. (D) Die prozentualen Translokationseffizienzen [%] wurden in mind. drei unabhängigen Experimenten über die Quantifizierung der Chemilumineszenzsignale mit Hilfe der Software AIDA Image Analyzer Version 4.50 (Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt) bestimmt. Die schwarzen Punktsymbole repräsentieren die Werte aus den jeweils durchgeführten Experimenten, wobei der Mittelwert als Zahl über den Werten ausgeschrieben sowie durch eine horizontale Linie markiert ist. Dargestellt sind zudem die jeweiligen Standardabweichungen als Fehlerbalken.

1.5 Untersuchung einer möglichen Korrelation zwischen der Hydrophobizität der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids und der Translokationseffizienz der jeweiligen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervariante

Bei den zuvor beschriebenen Experimenten wurde beobachtet, dass die Hydrophobizität der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids mit der Exporteffizienz der entsprechenden TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervariante zu korrelieren scheint, da eine Erhöhung der Hydrophobizität in einem erhöhten Export ins Periplasma resultierte. Dies wurde einerseits durch den Austausch derselben Aminosäure durch einen stark bzw. schwach hydrophoben Aminosäurerest demonstriert (Abschnitt 1.3, Abbildung 16, vgl. Suppressorstärken von T22I bzw. G25V mit T22A bzw. G25W). Dabei führte jene Substitution, welche eine stärkere Zunahme der Gesamthydrophobizität der h-Region bewirkte, zu einer höheren Exporteffizienz von TorA[KQ]-30aa-MalE. Andererseits konnte durch die Kombination zweier Mutationen, welche im einzelnen Kontext bereits eine geringfügige Zunahme der Hydrophobizität des TorA-Signalpeptids bewirkten, ein synergistischer Effekt auf die Translokationseffizienz von TorA[KQ]-30aa-MalE nachwiesen werden (Abschnitt 1.4). Um diese funktionale Beziehung zwischen der Hydrophobizität der h-Region und der Translokationseffizienz des entsprechenden Tat-Vorläuferproteins genauer zu untersuchen, wurden daraufhin ortsgerichtete Mutagenesestudien durchgeführt. Hierzu wurde im exportdefekten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterprotein die Aminosäure Glycin an der Position 25 relativ im Zentrum der h-Region durch hydrophobe Aminosäuren (Methionin, Cystein oder Alanin) oder neutrale bzw. hydrophile Aminosäurereste (Threonin, Serin oder Asparagin) substituiert.

Bis heute wurde eine Vielzahl verschiedener Hydrophobizitätsskalen für Aminosäuren publiziert, welche in den jeweiligen Hydrophobizitätswerten teilweise stark variieren (Argos *et al.*, 1982; Eisenberg D., 1982; Engelman *et al.*, 1986; Hopp & Woods, 1981; Kyte & Doolittle, 1982; Monera *et al.*, 1995). Für die nachfolgenden Vergleichsanalysen wurden daher sechs Skalen ausgewählt, welche auf unterschiedlichen Messmethoden basieren (Tabelle 6).

Tabelle 6: Hydrophobizitätsskalen für Aminosäuren.

Aminosäure	Monera <i>et al.</i> (Monera <i>et al.</i> , 1995)	Kyte und Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982)	Hopp und Woods (Hopp & Woods, 1981)	Argos (Argos <i>et al.</i> , 1982)	Eisenberg und Weiss (Eisenberg D., 1982)	Engelman <i>et al.</i> (Engelman <i>et al.</i> , 1986)
Met	74	1,9	- 1,3	2,96	0,26	3,4
Val	76	4,2	- 1,5	1,14	0,54	2,6
Cys	49	2,5	- 1,0	1,23	0,04	2,0
Ala	41	1,8	- 0,5	1,56	0,25	1,6
Gly	0	- 0,4	0	0,62	0,16	1,0
Thr	13	- 0,7	- 0,4	0,91	- 0,18	1,2
Ser	- 5	- 0,8	0,3	0,81	- 0,26	0,6
Asn	- 28	- 3,5	0,2	0,27	- 0,64	- 4,8

Dargestellt sind die Hydrophobizitätswerte nur für die in diesem Experiment relevanten Aminosäuren Methionin, Valin, Cystein, Alanin, Glycin, Threonin, Serin und Asparagin.

Trotz signifikanter Unterschiede lassen sich auch Gemeinsamkeiten in der Verteilung der Aminosäuren innerhalb der einzelnen Skalen erkennen. Während unpolaren Aminosäuren wie Alanin, Methionin und Valin im Allgemeinen höhere Hydrophobizitätswerte zugeordnet werden als Glycin, können die polaren Aminosäuren Serin und Asparagin als hydrophilere Aminosäurereste betrachtet werden. Die Aminosäure Cystein wird in den meisten Hydrophobizitätsskalen oberhalb von Glycin bei den hydrophoben Aminosäuren platziert. In vier von sechs Skalen wird Threonin den hydrophoben Aminosäuren zugeordnet. Den Hydrophobizitätsskalen von Kyte und Doolittle (1982) sowie Eisenberg und Weiss (1982) nach weist Threonin im Vergleich zu Glycin hingegen einen deutlich hydrophileren Charakter auf.

Aufgrund der Ergebnisse der in den Abschnitten 1.3 und 1.4 beschriebenen Mutagenesestudien wurde erwartet, dass ein Austausch von G25 gegen die hydrophoberen Aminosäuren Methionin, Cystein oder Alanin zu einer Wiederherstellung des Exports von TorA[KQ]-30aa-MalE führt, wobei die Exporteffizienzen der jeweiligen Reporterproteinvarianten in Abhängigkeit von der Hydrophobizität der eingeführten Aminosäure variieren sollten. Um diese Theorie zu überprüfen, wurde der *E. coli* –Stamm GSJ101 ($\Delta malE$, pHSG-TatABCE), welcher Plasmid-kodierte *tat* –Gene enthält, mit den neu konstruierten pTorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterplasmidvarianten transformiert. Zum Ausschluss einer Sec-abhängigen Translokation dieser Reporterproteine erfolgte parallel eine Transformation des Stamms GSJ101 ($\Delta malE$, Δtat), welcher über keine Tat-Translokase verfügt. Ein Ausstrich der resultierenden Stämme auf MMM bestätigte einen strikt Tat-spezifischen Export der Reportervarianten (nicht gezeigt). Diese wurden anschließend im Hinblick auf die jeweiligen Translokationseffizienzen mittels Plattenassay analysiert (Abbildung 23). Zudem wurde der Export ins Periplasma auch auf Proteinebene in Zellfraktionierungsstudien untersucht (Abbildung 25 A, C). Wie in Abbildung 23 gezeigt, wurden alle TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten, in denen der native Glycinrest durch die hydrophobere Aminosäure Valin, Methionin, Cystein oder Alanin substituiert wurde, Tat-abhängig ins Periplasma transloziert. Die entsprechenden Stämme wuchsen signifikant auf MMM und bildeten rote oder rosafarbige Kolonien auf MCM. Während die Mutationen G25V und G25M den Exportdefekt von TorA[KQ]-30aa-MalE am stärksten supprimierten (effizientes Wachstum auf MMM; rote Kolonienfarbe auf MCM), konnten den Mutationen G25A und G25C deutlich schwächere Suppressoreigenschaften zugesprochen werden, welche sich in einem langsamen Wachstum der jeweiligen Stämme auf MMM und der Bildung rosafarbiger Kolonien auf MCM widerspiegeln. Die Unterschiede in den Kolonienfarben auf MCM sowie der Wachstumsraten auf MMM weisen bereits auf einen funktionalen Zusammenhang zwischen der Hydrophobizität der eingeführten Aminosäure und der beobachteten Exporteffizienz der jeweiligen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervariante hin. Dieser konnte auch auf Proteinebene durch die Quantifizierung der MalE-Mengen in den Periplasmafraktionen der entsprechenden Stämme nachgewiesen werden (Abbildung 25 A, C). Die Mutation G25V in der h-Region wurde bereits in den zuvor beschriebenen Experimenten als eine relativ starke Suppressormutation klassifiziert, welche den Export von TorA[KQ]-30aa-MalE zu 13,8% wiederherstellt (Abbildung 25 A und C, Spur 3). Überraschenderweise führte der

Austausch von Glycin gegen einen Methioninrest, welcher in den meisten Hydrophobizitätsskalen generell als weniger hydrophob als Valin beschrieben wird, zu einer noch höheren Exporteffizienz (19,8%) (Abbildung 25 A und C, Spur 4). Im Einklang mit den meisten Hydrophobizitätsskalen und den beobachteten *in situ* Phänotypen im Plattenassay, führte eine Substitution des Glycinrestes durch Cystein oder Alanin, welche im Vergleich zu einem Austausch gegen Valin oder Methionin eine geringere Erhöhung der Hydrophobizität des TorA[KQ]-Signalpeptids bewirkt, folglich zu einer geringeren Exporteffizienz von 11,2% (G25C) bzw. 6,4% (G25A) der entsprechenden TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervariante (Abbildung 25 A und C, vgl. Spuren 3 und 4 mit 5 und 6).

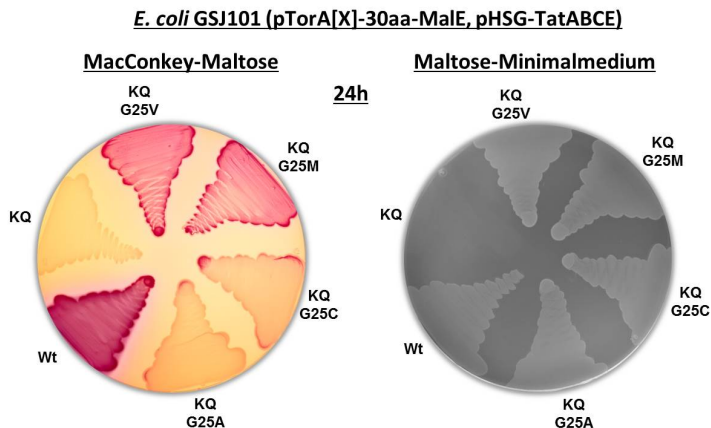


Abbildung 23: Phänotypen von *E. coli* GSJ101 ($\Delta malE$, pHSG-TatABCE) mit den verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten auf MCM (links) und MMM (rechts) nach einer Inkubation von 24 h. Die jeweiligen Mutationen (X) im TorA-Signalpeptid des TorA-30aa-MalE-Reporterproteins sind neben den einzelnen Sektoren aufgeführt. Wt: TorA-30aa-MalE; KQ: TorA[KQ]-30aa-MalE; KQ X: TorA[KQ,X]-30aa-MalE mit X= G25V, G25M, G25C bzw. G25A. Als Positivkontrollen dienten die Stämme GSJ101, welche die Tat-Translokase und den unveränderten TorA-30aa-MalE Reporter (Wt) bzw. die Reportervariante TorA[KQ,G25V]-30aa-MalE (iKQ-G25V) mit bekannter Translokationseffizienz coexprimierten und als Negativkontrolle der Stamm GSJ101 (pHSG-TatABCE), der die exportdefekte TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervariante (KQ) enthielt.

Im nächsten Schritt wurde G25 durch die neutralen bzw. hydrophilen Aminosäurereste Threonin, Serin und Asparagin substituiert. In Übereinstimmung mit den entsprechenden Hydropathiewerten, wurde bei den Aminosäureaustauschen G25S und G25N keine Suppression des Exportdefekts von TorA[KQ]-30aa-MalE erwartet, da diesen Aminosäuren auf nahezu allen betrachteten Hydrophobizitätsskalen ein eher hydrophiler Charakter zugesprochen wird (Tabelle 6). Die Auswirkung eines Austauschs von Glycin gegen Threonin auf den Export von TorA[KQ]-30aa-MalE konnte aufgrund der signifikanten Unterschiede in den Hydrophobizitätswerten zwischen den einzelnen Skalen nicht eindeutig vorhergesagt werden.

Zur Überprüfung des Exports dieser neu konstruierten Reporterproteine wurde der Stamm GSJ101 ($\Delta malE$, pHSG-TatABCE), welcher die *tat*-Gene coexprimierte, mit den entsprechenden pTorA[KQ]-30aa-MalE-Plasmidvarianten transformiert. In Abbildung 24 ist das Wachstum der resultierenden Stämme auf MMM und MCM nach einer Inkubationszeit von 24 h dargestellt.

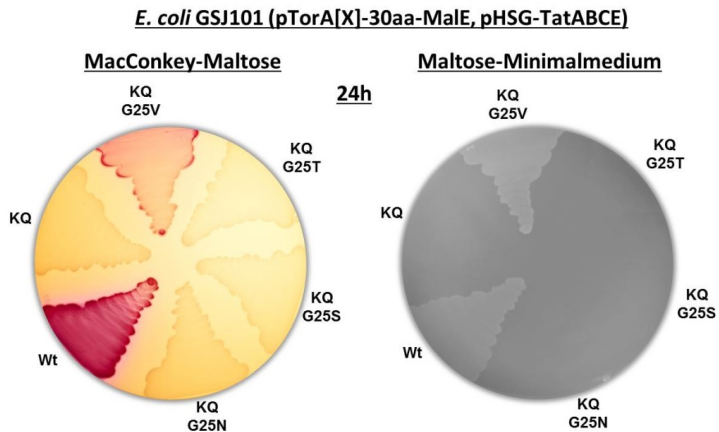


Abbildung 24: Phänotypen von *E. coli* GSJ101 (Δ malE, pHSG-TatABCE) mit den verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten auf MCM (links) und MMM (rechts) nach einer Inkubation von 24 h. Die jeweiligen Mutationen (X) im TorA-Signalpeptid des TorA-30aa-MalE-Reporterproteins sind neben den einzelnen Sektoren aufgeführt. Wt: TorA-30aa-MalE; KQ: TorA[KQ]-30aa-MalE; KQ X: TorA[KQ,X]-30aa-MalE mit X= G25V, G25T, G25S bzw. G25N. Als Positivkontrollen dienten die Stämme GSJ101, welche die Tat-Translokase und den unveränderten TorA-30aa-MalE Reporter (Wt) bzw. die Reportervariante TorA[KQ,G25V]-30aa-MalE (iKQ-G25V) mit bekannter Translokationseffizienz coexprimierten und als Negativkontrolle der Stamm GSJ101 (pHSG-TatABCE), der die exportdefekte TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervariante (KQ) enthielt.

Offensichtlich führte die Substitution von Glycin durch die neutralen bzw. hydrophilen Aminosäurereste Serin, Asparagin wie auch Threonin zu keiner Wiederherstellung des Exports von TorA[KQ]-30aa-MalE. Die entsprechenden Stämme wuchsen im Gegensatz zu den Positivkontrollen GSJ101 (pTorA-30aa-MalE, pHSG-TatABCE) und GSJ101 (pTorA[KQ, G25V]-30aa-MalE, pHSG-TatABCE), welche die Tat-Translokase und den unveränderten TorA-30aa-MalE-Reporter bzw. die mutierte Reporterproteinvariante iKQ-G25V coexprimierten, nicht mit Maltose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle und bildeten demnach weisse Kolonien auf MCM. Der fehlende Export dieser Reporterproteinvarianten ins Periplasma wurde auch auf Proteinebene bestätigt (Abbildung 25 B, vgl. Spuren 4-6 mit 1 und 3; C). Es konnten keine signifikanten Unterschiede in den Translokationseffizienzen dieser mutierten Reportervarianten im Vergleich zur Negativkontrolle, dem exportdefekten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterprotein festgestellt werden (Abbildung 25 C, vgl. Spuren 7-9 mit 2). In allen Fällen wurde in der kombinierten C/M-Fraktion aufgrund des nicht möglichen Tat-abhängigen Transports ins Periplasma eine starke Akkumulation des Vorläuferproteins detektiert (Abbildung 25 B, Spuren 2 und 4-6).

Offensichtlich führt nicht jede beliebige Substitution des Glycinrestes an der Position 25 *per se* zur Wiederherstellung des TorA[KQ]-30aa-MalE-Exports. Die Suppression dieses Exportdefekts erfordert konkret die Einführung hydrophoberer Aminosäuren in die h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids, wobei eine Korrelation zwischen der Hydrophobizität der veränderten Aminosäurereste und der Translokationseffizienz der jeweiligen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten beobachtet werden kann. Diese Ergebnisse bestätigen, dass für den Export von MalE in Abwesenheit eines intakten Zwillingsarginin-Motivs eine Erhöhung der

Gesamthydrophobizität der h-Region des TorA-Signalpeptids erfolgen muss und liefern damit weitere Beweise für eine direkte Beteiligung der h-Region an der produktiven Bindung von Tat-Signalpeptiden an den TatBC-Rezeptorkomplex.

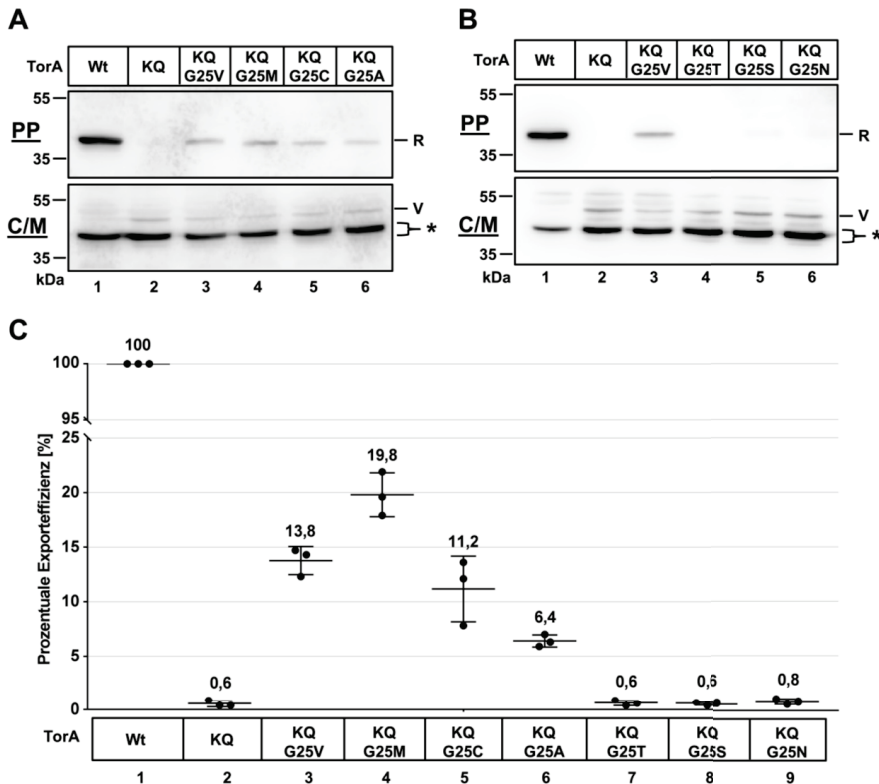


Abbildung 25: Untersuchung des Tat-abhängigen Exports von TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit verschiedenen Aminosäuresubstitutionen an der Position G25 in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids in *E. coli* GSJ101 (pHSG-TatABCE). (A, B) Subzelluläre Lokalisation der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit Mutationen an der Position G25 in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids nach erfolgter Zellfraktionierung von *E. coli* GSJ101 zur Untersuchung des Exports aus dem Cytosol ins Periplasma auf Proteinebene. Dargestellt sind Proben des Stamms GSJ101 mit Plasmid-kodierter Tat-Translokase und den verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten. Die vorliegenden Mutationen im TorA-Signalpeptid der entsprechenden Reportervarianten sind über den jeweiligen Spuren angegeben. Wt: TorA-30aa-MalE; KQ: TorA[KQ]-30aa-MalE; KQ X: TorA[KQ.X]-30aa-MalE mit (A) X= G25V, G25M, G25C bzw. G25A, (B) X= G25V, G25T, G25S bzw. G25N. Als Positivkontrollen dienten die *E. coli* -Stämme GSJ101 (pTorA-30aa-MalE, pHSG-TatABCE) und GSJ101 (pTorA[KQ.G25V]-30aa-MalE, pHSG-TatABCE) welche die Tat-Translokase und den unveränderten TorA-30aa-MalE-Reporter (Wt) bzw. die mutierte Reportervariante TorA[KQ.G25V]-30aa-MalE (iKQ-G25V) coexprimieren (Spuren 1 und 3), und als Negativkontrolle der Stamm GSJ101 (pTorA[KQ]-30aa-MalE, pHSG-TatABCE), der das exportdefekte Reporterprotein TorA[KQ]-30aa-MalE (KQ) enthält (Spur 2). Die Zellen wurden mittels osmotischen Schocks in eine Periplasma-Fraktion (PP) und eine kombinierte Cytoplasma/Membran-Fraktion (C/M) getrennt. Anschließend wurden Proben der Zellfraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Für die C/M-Fraktion wurden 10 µg Gesamtprotein aufgetragen und für die PP-Fraktion 4 µg. Die Proteine wurden anschließend mittels Western-Blot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Der Nachweis der *malE*-Genprodukte erfolgte durch MalE-spezifische Antikörper. Im Periplasma liegt die reife MalE-Form (R) vor, während in der C/M-Fraktion die oberste Bande das jeweilige MalE-Vorläuferprotein (V) und die darunter liegenden Banden cytoplasmatische Abbauprodukte (*) von MalE repräsentieren. Die Positionen der 35 kDa- und 55 kDa-Markerbande sind am linken Rand der Abbildung markiert. Der Nachweis des Anti-Rabbit IgG Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärintikörpers erfolgte mit Hilfe des „Amersham ECL™ Western Blotting System“ (GE Healthcare, München). Die Chemilumineszenzsignale wurden mit der „LAS-3000 Mini“ CCD-Kamera (Fujifilm) detektiert. (C) Die prozentualen Translokationseffizienzen [%] wurden in drei unabhängigen Experimenten über die Quantifizierung der Chemilumineszenzsignale mit Hilfe der Software AIDA Image Analyzer Version 4.50 (Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt) bestimmt. Die schwarzen Punktsymbole repräsentieren die Werte aus den jeweils durchgeführten Experimenten, wobei der Mittelwert als Zahl über den Werten ausgeschrieben sowie durch eine horizontale Linie markiert ist. Dargestellt sind zudem die jeweiligen Standardabweichungen als Fehlerbalken.

1.6 Auswirkung von Veränderungen der Hydrophobizität der h-Region des nativen TorA-Signalpeptids auf den Export von TorA-30aa-MalE

In den vorhergehenden Abschnitten wurde gezeigt, dass die Einführung hydrophoberer Aminosäuren in die h-Region des Tor[KQ]-Signalpeptids den Verlust des Zwillingsarginin-Motivs im TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterprotein kompensieren kann. Je hydrophober die eingeführte Aminosäure war, desto höher war auch die beobachtete Translokationseffizienz der entsprechenden Reportervariante. Diese Beobachtung warf die Frage auf, ob eine Erhöhung der Hydrophobizität der h-Region im TorA-Signalpeptid den Export des unveränderten TorA-30aa-MalE-Reporterproteins weiter steigern könnte. Zur Kontrolle sollte auch die Auswirkung der Einführung weniger hydrophober, d.h. polarer und hydrophiler Aminosäuren an die entsprechende Position in die h-Region des TorA-Signalpeptids untersucht werden. Hierzu wurden die Aminosäuresubstitutionen G25V, G25M, G25C, G25A, G25T, G25S und G25N in den TorA-30aa-MalE-Reporter durch ortsgerichtete Mutagenese eingeführt. Nach Ausschluss einer Sec-abhängigen Translokation der resultierenden Reporterproteine, erfolgte eine Transformation des *E. coli* -Stamms GSJ101 ($\Delta malE$, pHSG-TatABCE), welcher Plasmid-kodierte *tat* -Gene enthielt, mit den neu konstruierten pTorA-30aa-MalE-Plasmidvarianten. Der Export der TorA-30aa-MalE-Reportervarianten wurde sowohl im Plattenassay als auch auf Proteinebene untersucht. Wie in Abbildung 26 A und B zu erkennen ist, konnten in den meisten Fällen keine signifikanten Unterschiede im Wachstum auf MMM sowie in der Kolonienfarbe auf MCM zwischen den entsprechenden Stämmen und der Positivkontrolle GSJ101 ($\Delta malE$, pHSG-TatABCE), welche den unveränderten TorA-30aa-MalE-Reporter enthielt, festgestellt werden. Die maximale Farbtiefe der Kolonien auf MCM wird allerdings bereits bei einer Exporteffizienz von etwa 8% nach einer 24-stündigen Inkubation erreicht. Bei höheren Translokationseffizienzen, welche in der Regel in Anwesenheit eines intakten Zwillingsarginin-Motivs im Signalpeptid beobachtet werden können, lassen sich anhand des Plattenassays nach dieser Inkubationszeit keine genauen Rückschlüsse mehr auf das Exportverhalten der einzelnen Reportervarianten ziehen. Aus diesem Grund wurde die Inkubationszeit auf 15 h verkürzt. Im Falle einer Substitution von G25 durch einen hydrophilen Asparaginrest konnte nach 15 h eine negative Auswirkung dieser Mutation auf den Export von TorA-30aa-MalE im Plattenassay festgestellt werden (Abbildung 26 B). Der Stamm GSJ101 ($\Delta malE$, pHSG-TatABCE), welcher die Tat-Translokase und die TorA[G25N]-30aa-MalE-Reportervariante coexprimierte, zeigte ein drastisch reduziertes Wachstum auf MMM und bildete nur rosafarbige Kolonien auf MCM im Vergleich zu der Positivkontrolle GSJ101 (pTorA-30aa-MalE, pHSG-TatABCE) mit dem unveränderten TorA-30aa-MalE-Reporter, welche wiederum ein effizientes Wachstum auf MMM und einen roten Phänotyp auf MCM aufwies. Ein ähnlicher Effekt wurde bei der zuvor beschriebenen Substitution eines Valins durch einen negativ geladenen Aspartatrest in der h-Region von TorA-MalE beobachtet, welche in diesem Fall sogar zu einer vollständigen Blockierung der Tat-abhängigen Translokation führte (siehe Abschnitt 1.1).

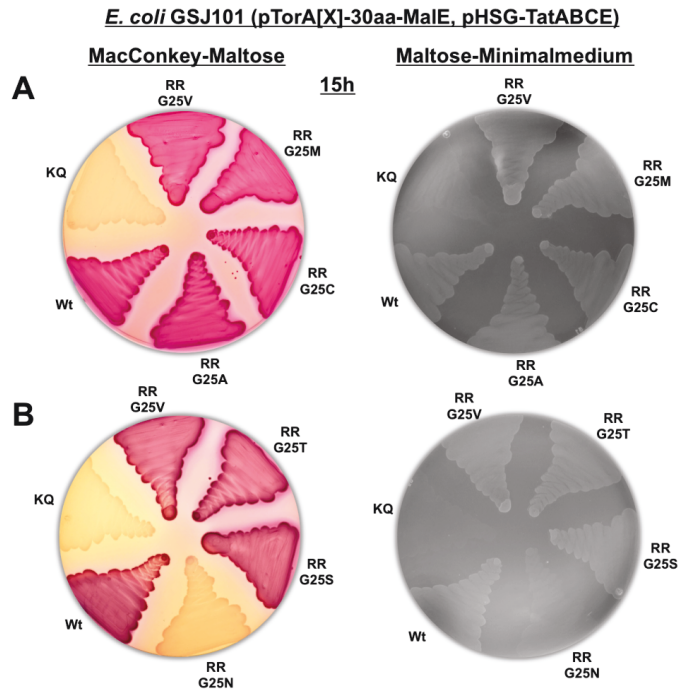


Abbildung 26: Phänotypen von *E. coli* GSJ101 ($\Delta malE$, pHSG-TatABCE) mit den verschiedenen TorA-30aa-MalE-Reportervarianten auf MCM (links) und MMM (rechts) nach einer Inkubation von 15 h. Die jeweiligen Mutationen (X) im TorA-Signalpeptid des TorA-30aa-MalE-Reporterproteins sind neben den einzelnen Sektoren aufgeführt. Wt: TorA-30aa-MalE; KQ: TorA[KQ]-30aa-MalE; RR X: TorA[RR,X]-30aa-MalE mit (A) X= G25V, G25M, G25C bzw. G25A, (B) X= G25V, G25T, G25S bzw. G25N. Als Positivkontrolle diente der Stamm GSJ101, welche die Tat-Translokase und den unveränderten TorA-30aa-MalE Reporter (Wt) coexprimierte und als Negativkontrolle der Stamm GSJ101 (pHSG-TatABCE), der die exportdefekte TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervariante (KQ) enthielt.

Während keine weitere Zunahme des Wachstums auf MMM im Verlauf der nächsten 9 h beobachtet werden konnte, wies der Stamm nach einer Inkubationszeit von insgesamt 24 h überraschenderweise einen roten Phänotyp auf MCM auf (nicht gezeigt). Diese fehlende Korrelation zwischen der Wachstumsrate auf MMM und der Kolonienfarbe auf MCM weist auf eine Zelllyse hin. Offensichtlich wirkt sich der Export der TorA[G25N]-30aa-MalE-Reporterproteine durch die Wildtyp-Tat-Translokase toxisch auf die *E. coli*-Zellen aus. Während nur ein sehr schwaches Wachstum mit Maltose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle beobachtet werden kann, wird durch die Lyse der Zellen der pH-Wert des umgebenden Maltose-haltigen MacConkey-Mediums ausreichend erniedrigt, um einen Farbumschlag von Weiss nach Rot zu induzieren.

Eine leichte Zelllyse konnte bei dem entsprechenden Stamm auch auf Proteinebene durch die Western-Blot-Analyse der Proteine der C/M- und PP-Fraktion festgestellt werden (Abbildung 27 B). Dabei wurde eine signifikante Menge des membranassoziierten Proteins SecA, welches normalerweise nur in der C/M-Fraktion vorzufinden ist, in der PP-Fraktion von GSJ101 (pTorA[G25N]-30aa-MalE, pHSG-TatABCE) detektiert (Abbildung 27 B, Spur 9). Die Translokationseffizienz von TorA-30aa-MalE wurde durch die Einführung des Asparaginrestes in die h-Region hingegen überraschenderweise nicht drastisch beeinflusst und betrug ca. 75% (Abbildung 27 C, Spur 9).

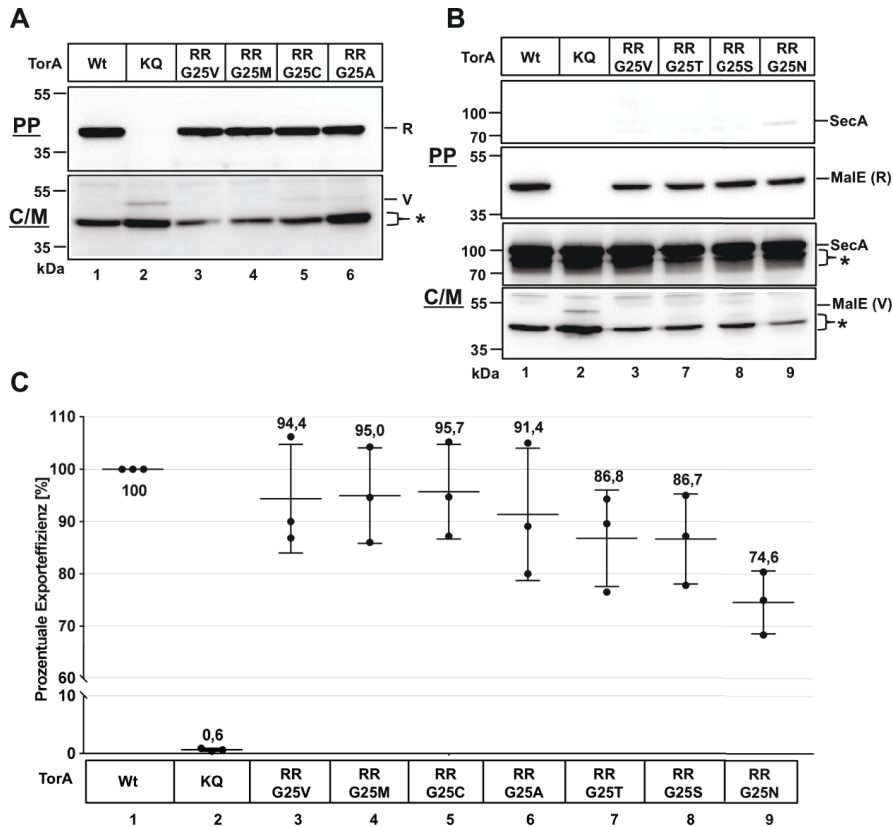


Abbildung 27: Untersuchung des Tat-abhängigen Exports von TorA-30aa-MalE-Reportervarianten mit verschiedenen Aminosäuresubstitutionen an der Position G25 in der h-Region des TorA-Signalpeptids in *E. coli* GSJ101 (pHSG-TatABCE). (A, B) Subzelluläre Lokalisation der TorA-30aa-MalE-Reportervarianten mit Mutationen an der Position G25 in der h-Region des TorA-Signalpeptids nach erfolgter Zellfraktionierung von *E. coli* GSJ101 zur Untersuchung des Exports aus dem Cytosol ins Periplasma auf Proteinebene. Dargestellt sind Proben des Stamms GSJ101 mit Plasmid-kodierter Tat-Translokase und den verschiedenen TorA-30aa-MalE-Reportervarianten. Die vorliegenden Mutationen im TorA-Signalpeptid der entsprechenden Reportervarianten sind über den jeweiligen Spuren angegeben. Wt: TorA-30aa-MalE; KQ: TorA[KQ]-30aa-MalE; RR X: TorA[RR,X]-30aa-MalE mit (A) X= G25V, G25M, G25C bzw. G25A, (B) X= G25V, G25T, G25S bzw. G25N. Als Positivkontrolle diente der *E. coli* -Stamm GSJ101 (pTorA-30aa-MalE, pHSG-TatABCE), welcher die Tat-Translokase und den unveränderten TorA-30aa-MalE-Reporter (Wt) coexprimierte (Spur 1), und als Negativkontrolle der Stamm GSJ101 (pTorA[KQ]-30aa-MalE, pHSG-TatABCE), der das exportdefekte Reporterprotein TorA[KQ]-30aa-MalE enthält (Spur 2). Die Zellen wurden mittels osmotischen Schocks in eine Periplasma-Fraktion (PP) und eine kombinierte Cytoplasma/Membran-Fraktion (C/M) getrennt. Anschließend wurden Proben der Zellfraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Für die C/M-Fraktion wurden 10 µg Gesamtein aufgetragen und für die PP-Fraktion 4 µg. Die Proteine wurden anschließend mittels Western-Blot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Der Nachweis der malE-Genprodukte erfolgte durch MalE-spezifische Antikörper. In (B) wurden zur Lysekontrolle die Mengen des membranassoziierten SecA-Proteins in der PP-Fraktion wie auch in der C/M-Fraktion bestimmt. Der Nachweis der secA-Genprodukte erfolgte durch SecA-spezifische Antikörper. Im Periplasma liegt die reife MalE-Form (R) vor, während in der C/M-Fraktion die oberste Bande das jeweilige MalE-Vorläuferprotein (V) und die darunter liegenden Banden cytoplasmatische Abbauprodukte (*) von MalE repräsentieren. (B) Die oberste SecA-Bande bei 102 kDa in der C/M-Fraktion repräsentiert das vollständig synthetisierte Protein und die darunter liegenden Banden die cytoplasmatischen Abbauprodukte (*) des SecA-Proteins. Die Positionen der 35 kDa- und 55 kDa-Markerbande sind am linken Rand der Abbildung markiert. In (B) sind zudem die Positionen der 70 kDa- und 100 kDa-Markerbande markiert. Der Nachweis des Anti-Rabbit IgG Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers erfolgte mit Hilfe des „Amersham ECL™ Western Blotting System“ (GE Healthcare, München). Die Chemilumineszenzsignale wurden mit der „LAS-3000 Mini“ CCD-Kamera (Fujifilm) detektiert. (C) Die prozentualen Translokationseffizienzen [%] wurden in drei unabhängigen Experimenten über die Quantifizierung der Chemilumineszenzsignale mit Hilfe der Software AIDA Image Analyzer Version 4.50 (Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt) bestimmt. Die schwarzen Punktsymbole repräsentieren die Werte aus den jeweils durchgeführten Experimenten, wobei der Mittelwert als Zahl über den Werten ausgeschrieben sowie durch eine horizontale Linie markiert ist. Dargestellt sind zudem die jeweiligen Standardabweichungen als Fehlerbalken.

Überraschenderweise führte die Einführung eines hydrophoberen Aminosäurerestes in das TorA-Signalpeptid nicht zu einer signifikanten Erhöhung der Translokationseffizienz des TorA-30aa-MalE-Reporterproteins. Die durchschnittlichen Exporteffizienzen der TorA-30aa-MalE-Reportervarianten, in denen der Glycinrest an der Position 25 in der h-Region durch die hydrophobere Aminosäure Alanin, Cystein, Valin oder Methionin ausgetauscht wurde, lagen in einem Bereich zwischen 91% und 96% und damit vielmehr etwas unterhalb der Translokationseffizienz des unveränderten TorA-30aa-MalE-Reporterproteins (Abbildung 27 A und C, vgl. Spuren 3-6 mit Spur 1). Der Trend zu einer Verringerung der Exporteffizienz von TorA-30aa-MalE durch Veränderung der Aminosäuresequenz der h-Region wurde auch bei den Reportervarianten TorA[G25T]-30aa-MalE und TorA[G25S]-30aa-MalE beobachtet (Abbildung 27 B und C, vgl. Spuren 7 und 8 mit Spur 1).

Offensichtlich haben ab einer bestimmten Gesamtbindeaffinität des Tat-Signalpeptids an den TatBC-Rezeptorkomplex zusätzliche Bindungskontakte zwischen der h-Region und der hydrophoben TatB-TMH keinen signifikanten Einfluss mehr auf die Translokationseffizienz des Reporterproteins. Die Einführung anderer Aminosäuren in die h-Region des nativen TorA-Signalpeptids erwies sich in den beschriebenen Fällen vielmehr kontraproduktiv und bewirkte eine Verringerung der Exporteffizienz von TorA-30aa-MalE. Im Falle einer Substitution von Glycin durch die stark hydrophile Aminosäure Asparagin wirkte sich der Export dieser TorA-30aa-MalE-Variante durch die Tat-Translokase sogar toxisch auf die Zellen aus.

1.7 Crosslinking-Studien zur direkten Untersuchung der Bindung der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit h-Region-lokaliserten Suppressormutationen an den TatBC-Rezeptorkomplex

Bisher wurden die Suppressoraktivitäten der isolierten Mutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids in *in vivo* Transportassays untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass die Mutationen durch eine Erhöhung der Gesamthydrophobizität der h-Region den Transport eines normalerweise exportdefekten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterproteins wiederherstellen können. Die *E. coli*-Stämme, welche die mutierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten exprimierten, erhielten dadurch die Fähigkeit zurück mit Maltose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich die Mutationen in der h-Region direkt auf die Bindung des TorA[KQ]-Signalpeptids an den TatBC-Rezeptorkomplex auswirken. Da eine Erhöhung der Hydrophobizität des TorA[KQ]-Signalpeptids den Verlust wichtiger Bindungskontakte zwischen dem Signalpeptid und dem TatBC-Rezeptorkomplex an der Position des Zwillingsarginin-Motivs kompensieren konnte, wurde angenommen, dass die eingeführten Aminosäuresubstitutionen dabei die hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb der TatBC-Bindetasche verstärken und dadurch die Gesamtbindeaffinität des Signalpeptids an den TatBC-Rezeptorkomplex erhöhen. Dabei wird der Schwellenwert für die minimale Bindeaffinität, welcher für eine produktive Bindung und folglich auch eine erfolgreiche Translokation des Tat-Vorläuferproteins erreicht werden muss,

überschritten, wodurch der Export von TorA[KQ]-30aa-MalE wiederhergestellt wird. Um nun direkt zu untersuchen, ob die Suppressormutationen in der h-Region tatsächlich eine „advanced-stage“-Bindung des TorA[KQ]-Signalpeptids tief innerhalb der TatBC-Bindetasche vermitteln, wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Matthias Müller (Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Freiburg) ortsspezifische *in vitro* Crosslinking-Experimente wie in Ulfig *et al.* (2017) beschrieben durchgeführt.

Um die Interaktionen zwischen Proteinen zu untersuchen, werden oft sogenannte Quervernetzer (Crosslinker) verwendet, welche die kovalente Kopplung eng benachbarter Polypeptide ermöglichen. Werden diese ortsspezifisch eingebaut, so können konkrete Aussagen über die Interaktionspartner getroffen werden. Auf diese Weise wurden in zahlreichen Arbeiten Kontaktstellen zwischen Tat-Signalpeptiden und den Komponenten der Tat-Translokase identifiziert (Alami *et al.*, 2003; Blümmel *et al.*, 2015; Maurer *et al.*, 2010; Panahandeh *et al.*, 2008). Für die nachfolgend beschriebenen Experimente wurde der photoaktivierbare Crosslinker *p*-Benzoyl-L-Phenylalanin (Bpa) verwendet (Kauer *et al.*, 1986). Dabei handelt es sich um ein Phenylalaninderivat. Durch Bestrahlung mit UV-Licht wird aus der Carbonyl-Gruppe der Seitenkette ein reaktives Diradikal gebildet, welches mit aliphatischen CH-Gruppen benachbarter Moleküle reagiert. Für den Einbau von Bpa in ein Protein wird das Codon einer Aminosäure an einer spezifischen Position innerhalb des Proteins in ein *amber* Stopcodon (TAG) mittels mutagenisierender PCR umgewandelt. Nach der Zugabe von Bpa zu einer Zellkultur wird Bpa kovalent durch eine Bpa-spezifische Aminoacyl-tRNA-Synthetase an eine mutierte *amber*-Suppressor-tRNA gebunden (Chin *et al.*, 2002; Liu & Schultz, 2010). Dadurch, dass das Anticodon der tRNA komplementär zum eingeführten UAG-Stopcodon in der mRNA ist, wird die *amber*-Suppressor-tRNA während der Proteintranslation an der entsprechenden Position auf der mRNA gebunden. Anschließend erfolgt der Einbau von Bpa in die Polypeptidkette.

Um nun eine tiefe Insertion der verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten, welche Suppressormutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids aufweisen, in die TatBC-Bindetasche zu überprüfen, wurde Bpa an die Position I4 im extremen N-Terminus von TatB sowie an die Position V202 in der TMH-5 von TatC platziert (siehe Abbildung 28).

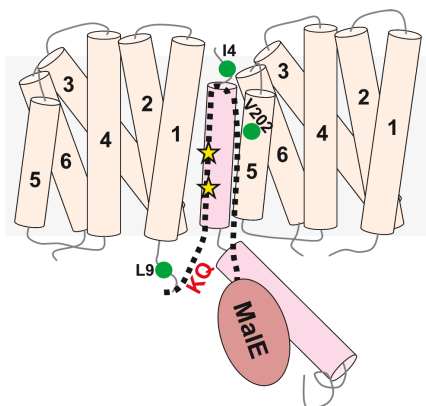


Abbildung 28: Lage der Aminosäurepositionen I4 in TatB und L9 bzw. V202 in TatC, an denen der photoaktivierbare Crosslinker Bpa platziert wurde. Angedeutet ist die tiefe Insertion des TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterproteins, welches Suppressormutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids aufweist, in die TatBC-Bindetasche. Die gelben Sterne symbolisieren h-Region-lokalisierte Suppressormutationen. Die grünen Punkte deuten die Position des eingeführten Bpa an.

Diese spezifischen Positionen im TatBC-Rezeptorkomplex wurden aufgrund der Ergebnisse vorhergehender Crosslinking-Studien ausgewählt. In diesen wurde gezeigt, dass diese beiden Aminosäurereste tief inserierte Tat-Vorläuferproteine während der „advanced-stage“-Bindung kontaktieren (Blümmel *et al.*, 2015). Sollten im Gegensatz zur Negativkontrolle TorA[KQ]-30aa-MaIE, welche eine unveränderte h-Region aufweist, Kontakte zwischen den mutierten TorA[KQ]-30aa-MaIE-Varianten mit h-Region-lokalisierten Suppressormutationen und diesen Bereichen des TatBC-Rezeptorkomplexes identifiziert werden, so wäre dies ein direkter Beweis dafür, dass diese Reporterproteine trotz der KQ-Mutation im Zwillingsarginin-Motiv tief in die TatBC-Bindetasche inserieren und sich die Mutationen in der h-Region daher direkt auf den Bindungsschritt an den TatBC-Rezeptorkomplex auswirken.

Zusätzlich wurde Bpa auch an die Position L9 im cytoplasmatisch lokalisierten N-Terminus von TatC eingebaut, welcher einen Teil der Erkennungs- und Bindestelle für das Tat-Konsensusmotiv bildet (Buchanan *et al.*, 2001; Kreutzenbeck *et al.*, 2007; Zoufaly *et al.*, 2012).

Zur *in vitro* Untersuchung der Bindung der TorA-30aa-MaIE-Varianten an den TatBC-Rezeptorkomplex wurden sowohl die Plasmid-kodierten *tatABC*-Gene als auch die verschiedenen TorA-30aa-MaIE-Reportervarianten in *E. coli* überexprimiert. Hierzu erfolgte, wie in Kapitel III, Abschnitt 4.13 beschrieben, eine Umklonierung der Reportergene aus dem *medium copy*-Vektor pBBR1MCS-2 in den *high copy*-Vektor pET22b(+). Anschließend wurden *inside out*-Innere-Membranvesikel (INV) wie in Ulfig *et al.* (2017) beschrieben aus den *E. coli*-Stämmen, welche die jeweilige Bpa-enhaltende Variante von TatB bzw. TatC exprimierten, präpariert. Die verschiedenen TorA-30aa-MaIE-Reportervarianten wurden in einem zellfreien Transkription/Translation-Ansatz synthetisiert und radioaktiv markiert. 15 min nach Synthesebeginn wurden die präparierten INV hinzugegeben und 10 min bei 37 °C inkubiert. Die INV wurden schließlich mit UV-Licht bestrahlt, wodurch die Bildung von radioaktiv-markierten Crosslinking-Produkten induziert wurde. Diese wurden daraufhin mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie visualisiert.

1.7.1 Identifizierung von Kontakten zwischen dem N-Terminus von TatB und TorA[KQ]-30aa-MaIE-Reportervarianten mit h-Region-lokalisierten Suppressormutationen

Für das nachfolgende Crosslinking-Experiment wurden neun verschiedene TorA[KQ]-30aa-MaIE-Reportervarianten ausgewählt, welche Einzel- oder Doppelmutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids aufweisen und mit unterschiedlichen Effizienzen durch die Wildtyp-Tat-Translokase *in vivo* transportiert werden: iKQ-A16V, iKQ-T22A, iKQ-T22I, iKQ-G25V, iKQ-G25M, iKQ-G28W, iKQ-A16V+G28W, iKQ-T22A+G28W und iKQ-G25V+G28W. Zunächst erfolgte ein erstes *Screening* nach Kontakten zwischen der Position I4 im N-Terminus von TatB und den verschiedenen Reporterproteinen. Abbildung 29 stellt das Ergebnis dieses ersten *Screenings* dar. Als Positivkontrolle diente das unveränderte TorA-30aa-MaIE-Reporterprotein und die exportdefekte TorA[KQ]-30aa-MaIE-Reportervariante als Negativkontrolle, welche ebenfalls mit den TatAB^{I4Bpa}-INV inkubiert wurden. Die verschiedenen *in vitro* synthetisierten TorA-30aa-

MalE-Vorläuferproteine laufen oberhalb der 40 kDa-Markierung bei ca. 42 kDa. Die Banden unterhalb der 40 kDa-Markerbande stellen die Abbauprodukte von TorA-30aa-MalE dar. Die UV-Bestrahlung der TatAB^{I4BpaC}-INV, welche mit dem Transport-kompetenten TorA-30aa-MalE-Protein inkubiert wurden, führte zur Ausbildung von zwei prominenten, höhermolekularen Crosslinking-Produkten auf einer Höhe von ca. 70 kDa und 130 kDa (Spur 2), welche in den Kontrollproben, die nicht mit UV-Licht bestrahlt wurden, nicht sichtbar sind (Spur 1). Diese entsprechen dem Molekulargewicht eines 1:1 bzw. 2:1 Komplexes zwischen TatB und TorA-30aa-MalE. Diese UV-abhängigen TatB-Addukte konnten bei dem exportdefekten TorA[KQ]-30aa-MalE-Vorläuferprotein nicht nachgewiesen werden (Spur 4). Aufgrund der Ergebnisse, welche aus der vorhergehenden Untersuchung des *in vivo* Transports der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit h-Region-lokaliserten Suppressormutationen gewonnen wurden, wurde erwartet, dass die stärksten Kontakte zwischen TatB und denjenigen Reporterproteinen ausgebildet werden, welche *in vivo* die höchsten Exporteffizienzen zeigten. Jedoch muss hierbei berücksichtigt werden, dass die Einführung anderer Aminosäurereste in die h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids eine mehr oder weniger starke Konformationsänderung des Signalpeptids bewirken kann. Daher kann der Abstand zwischen dem TorA-Signalpeptid und der I4-Position im N-Terminus von TatB bei den verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten variieren, wodurch die Effizienz der UV-induzierten Quervernetzung beeinflusst wird.

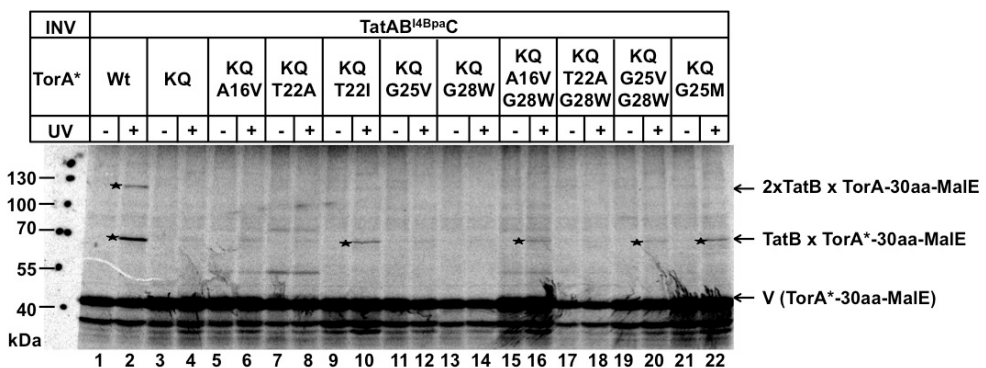


Abbildung 29: Identifizierung von Kontakten zwischen der Position I4 im N-Terminus von TatB und TorA-30aa-MalE-Reportervarianten. Die zu analysierenden TorA-30aa-MalE-Reportervarianten mit unverändertem (Wt) oder mutiertem TorA*-Signalpeptid, welches Mutationen innerhalb des Zwillingsarginin-Motivs (KQ) sowie der h-Region des TorA-Signalpeptids enthält (KQ X mit X = Suppressormutation/en in der h-Region) wurden in Gegenwart von *inside out* –Innere-Membranvesikeln (INV) *in vitro* in einer gekoppelten Transkription/Translation synthetisiert und radioaktiv markiert. Die jeweiligen Suppressormutationen in der h-Region sind über den entsprechenden Spuren aufgeführt. Die INV enthielten neben einer wildtypischen TatA- und TatC-Komponente die Bpa-Variante von TatB (TatAB^{I4BpaC}). Bei den mit „+“-markierten Proben wurde das Crosslinking durch Bestrahlung mit UV-Licht initiiert. Die Crosslinking-Produkte wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem Phosphorimager visualisiert. Schwarze Sterne markieren Crosslinks zwischen den Reportervarianten und der Position I4 von TatB. Die Positionen der Proteinmarkerbanden in kDa sind am linken Rand der Abbildung angegeben. Die Position der Banden, welche die verschiedenen TorA*-30aa-MalE-Vorläuferproteine (V) repräsentieren, ist am rechten Rand der Abbildung durch einen Pfeil markiert. Experiment wurde durchgeführt von Julia Fröbel, Institut für Biochemie und Molekularbiologie / Universität Freiburg, und verändert in Ulfig *et al.* (2017) publiziert.

Wurden die TatAB^{I4BpaC}-INV mit den TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten inkubiert, welche Suppressormutationen in der h-Region aufwiesen, so konnten 1:1 TatB- TorA[KQ]-30aa-MalE-Komplexe dennoch primär bei den Reporterproteinen detektiert werden, welche *in vivo* auch am

effizientesten durch die Wildtyp-Tat-Translokase exportiert wurden. Die stärksten Kontakte wurden dabei jedoch mit der Reportervariante iKQ-T22I nachgewiesen, welche *in vivo* nur mit einer Effizienz von 10,9% exportiert wird (Spur 10) (Abschnitt 1.3, Abbildung 17 B). Signifikant schwächere Kontakte zu TatB wurden bei den mutierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten iKQ-G25M (Spur 22), iKQ-A16V+G28W (Spur 16) und iKQ-G25V+G28W (Spur 20) beobachtet, deren Exporteffizienzen von 19,8%, 25,2% bzw. 28,2% deutlich oberhalb der Transporteffizienz von iKQ-T22I liegen (Abschnitt 1.4, Abbildung 22 D; Abschnitt 1.5, Abbildung 25 C). In allen Fällen erschienen diese Crosslinking-Produkte nicht ohne UV-Licht, sodass hierbei von spezifischen Kontakten zwischen TatB und den Vorläuferproteinen ausgegangen werden kann (vgl. Spur 10, 16, 20 bzw. 22 mit Spur 9, 15, 19 bzw. 21). Da sich der N-Terminus von TatB bereits auf der periplasmatischen Seite der Membran befindet, zeigt dies klar, dass diese mutierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten trotz der KQ-Mutation des Zwillingsarginins tief in die TatBC-Bindetasche inserieren.

Bei den Reportervarianten iKQ-A16V (Spur 6), iKQ-T22A (Spur 8), iKQ-G25V (Spur 12), iKQ-G28W (Spur 14) und iKQ-T22A+G28W (Spur 18), welche *in vivo* mit einer vergleichsweise geringeren Exporteffizienz durch die wildtypische Tat-Translokase exportiert werden, konnten keine Banden detektiert werden, die von der Größe her einem TatB-TorA[KQ]-30aa-MalE-Addukt entsprechen würden. In diesen Fällen ist nur eine Hintergrundschwärzung zu erkennen, welche sich nicht signifikant von der Kontrollprobe ohne UV-Licht-Bestrahlung unterscheidet. Da das stärkste TatB-TorA-30aa-MalE-Addukt mit der Reportervariante iKQ-T22I erhalten wurde, wurde dieses mutierte Reporterprotein für die folgenden weiterführenden Experimente ausgewählt.

1.7.2 Identifizierung von Kontakten zwischen TatC und der TorA[KQ,T22I]-30aa-MalE-Reportervariante (iKQ-T22I)

Um zu verifizieren, dass die Reportervariante iKQ-T22I tief in eine Bindetasche eingebettet wird, welche gemeinsam von beiden Komponenten des TatBC-Rezeptorkomplexes gebildet wird, wurde ein Crosslinking-Experiment mit den TatABC^{V202Bpa}-INV durchgeführt, in welchen der Crosslinker Bpa an die Position V202 in der TMH-5 von TatC eingebaut wurde. Wie in Abbildung 30 A zu erkennen ist, zeichnet sich nach Bestrahlung mit UV-Licht deutlich die Bpa-abhängige Kontaktbande von TatC und dem unveränderten TorA-30aa-MalE-Reporterprotein unterhalb der 70 kDa-Markierung ab (Spur 2). Dieser 1:1 Komplex erscheint nicht ohne UV-Licht (Spur 1). Ein schwächeres Crosslinking-Produkt, welches ebenfalls dem Molekulargewicht eines 1:1 Komplexes zwischen TatC und TorA-30aa-MalE entspricht, wurde auch mit der mutierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervariante iKQ-T22I detektiert, wodurch eine tiefe Insertion dieses Reporterproteins in die TatBC-Bindetasche bestätigt wurde (Spur 6). Im Gegensatz hierzu konnte kein Kontakt zwischen der TatC-Position V202 und dem exportdefekten Reporter TorA[KQ]-30aa-MalE, welcher eine unveränderte h-Region enthält, beobachtet werden (Spur 4). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der vorhergehenden Untersuchung von Kontakten zwischen dem N-Terminus von TatB und den verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit h-

Region-lokalisieren Suppressormutationen und bestätigt, dass die Bindung des TorA[KQ]-Signalpeptids an die TatBC-Bindetasche durch die zusätzlichen Mutationen in der h-Region vermittelt wird.

Um zu überprüfen, ob die Reportervariante iKQ-T22I die Tat-Komponente TatC auch an dem cytoplasmatisch lokalisierten N-Terminus kontaktiert, welcher in die Primärererkennung des Tat-Konsensusmotivs involviert ist, wurden für das nachfolgende Experiment Membranvesikel mit der TatABC^{L9Bpa}-Translokase verwendet. Wie in Abbildung 30 B gezeigt, konnte erwartungsgemäß unterhalb der 70 kDa-Markerbande ein Crosslinking-Produkt von TatC mit dem unveränderten TorA-30aa-MalE-Reporter detektiert werden (Spur 2). Dieser Kontakt entspricht sehr wahrscheinlich der Interaktion des intakten Tat-Konsensusmotivs von TorA-30aa-MalE mit dem cytoplasmatischen N-Terminus von TatC während des Primärererkennungsschritts, welcher vor der Insertion des Tat-Signalpeptids in die TatBC-Bindetasche erfolgt. Im Gegensatz hierzu konnte kein TatC-iKQ-T22I-Addukt nachgewiesen werden (Spur 6). Im Falle der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervariante iKQ-T22I erfolgt aufgrund der vorliegenden KQ-Mutation des Zwillingsarginin-Motivs offensichtlich keine Primärererkennung des Tat-Konsensusmotivs durch TatC.

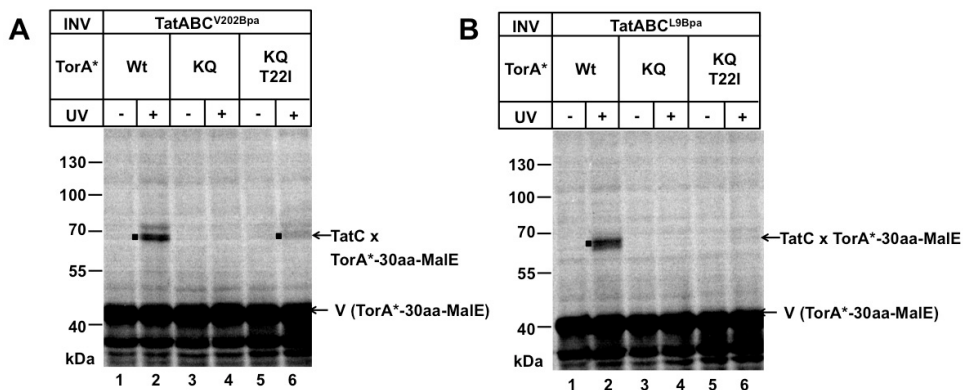


Abbildung 30: Identifizierung von Kontakten zwischen der Position (A) V202 in der TMH5 von TatC bzw. (B) L9 im cytoplasmatischen N-Terminus von TatC und der TorA[KQ,T22I]-30aa-MalE-Reporterproteinvariante. Die zu analysierenden TorA-30aa-MalE-Reporterproteinvarianten mit unverändertem (Wt) oder mutiertem TorA*-Signalpeptid, welches Mutationen nur innerhalb des Zwillingsarginin-Motivs (KQ) oder zusätzlich auch die Mutation T22I in der h-Region des TorA-Signalpeptids enthält (KQ T22I) wurden in Gegenwart von *inside out*-Innere-Membranvesikeln (INV) *in vitro* in einer gekoppelten Transkription/Translation synthetisiert und radioaktiv markiert. Die INV enthielten neben einer wildtypischen Tata- und TatB-Komponente die Bpa-Variante von TatC, in welcher Bpa an die Position (A) V202 in der TMH5 (TatABC^{V202Bpa}) bzw. (B) L9 im cytoplasmatischen N-Terminus (TatABC^{L9Bpa}) eingeführt wurde. Bei den mit „+“-markierten Proben wurde das Crosslinking durch Bestrahlung mit UV-Licht initiiert. Die Crosslinking-Produkte wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem Phosphorimager visualisiert. Schwarze Quadrate markieren Crosslinks zwischen den Reportervarianten und der Position (A) V202 (B) L9 von TatC. Die Positionen der Proteinmarkerbanden in kDa sind am linken Rand der Abbildung angegeben. Die Position der Banden, welche die verschiedenen TorA*-30aa-MalE-Vorläuferproteine (V) repräsentieren, ist am rechten Rand der Abbildung durch einen Pfeil markiert. Experimente wurden durchgeführt von Julia Fröbel, Institut für Biochemie und Molekularbiologie / Universität Freiburg, und verändert in Ulfig *et al.* (2017) publiziert.

Die Ergebnisse aus den durchgeführten Crosslinking-Experimenten demonstrieren, dass die TatABC-Translokase der INV eine „advanced-stage“-Bindung der mutierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten erlaubt, obwohl diese ein inaktives KQ-Motiv enthalten, welches eine produktive Primärererkennung des Signalpeptids durch TatC verhindert. Da die Mutationen in der h-

Region das Tat-Konsensusmotiv nicht betreffen und sich daher sehr wahrscheinlich nicht direkt auf den Primärererkennungsschritt auswirken, wird angenommen, dass diese die Bindung des TorA-Signalpeptids an den TatBC-Rezeptorkomplex erst nach dessen Insertion in die TatBC-Bindetasche beeinflussen. Um die Wirkungsweise der h-Region-lokalisierten Suppressormutationen zeitlich genauer in den Bindeprozess einzuordnen, wurden für das abschließende Crosslinking-Experiment die beiden Inhibitoren der PMK N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) und Carbonylcyanid-*m*-chlorphenylhydrazon (CCCP) eingesetzt.

1.7.3 Auswirkung von Inhibitoren der PMK auf die Insertion der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervariante mit der h-Region-lokalisierten Suppressormutation T22I in die TatBC-Bindetasche

Kürzlich wurde gezeigt, dass das Reagenz DCCD nicht nur die ATPase in *inside out* – Membranvesikeln hemmt und damit die Generierung eines Protonengradienten blockiert, sondern auch die Insertion von Tat-Signalpeptiden in die TatBC-Bindetasche verhindert (Blümmel *et al.* 2017; unpublizierte Daten). Im Gegensatz hierzu zerstört der Entkoppler CCCP lediglich die PMK, welche für den Tat-abhängigen Translokationsschritt über die Membran benötigt wird. In Abbildung 31 wird gezeigt welche Auswirkung die Zugabe des Hemmstoffs DCCD bzw. des Entkopplers CCCP auf die Ausbildung von Crosslinks zwischen der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervariante iKQ-T22I und der Position I4 im N-Terminus von TatB hat.

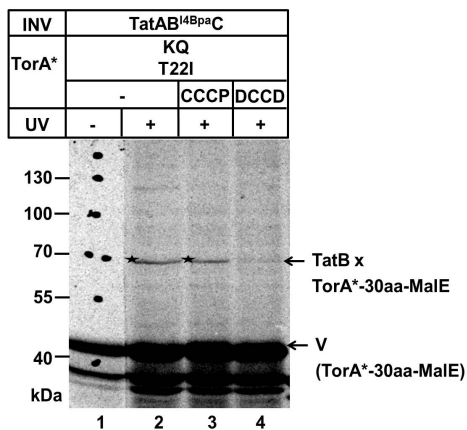


Abbildung 31: Auswirkung der Reagenzien CCCP und DCCD auf die Insertion der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervariante iKQ-T22I in die TatBC-Bindetasche. Die TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterproteinvariante iKQ-T22I wurde in Gegenwart von *inside out* –Innere-Membranvesikeln (INV) *in vitro* in einer gekoppelten Transkription/Translation synthetisiert und radioaktiv markiert. Die INV enthielten neben einer wildtypischen TatA- und TatC-Komponente die Bpa-Variante von TatB, in welcher Bpa an die Position I4 im N-Terminus eingeführt wurde. Es wurde entweder der Entkoppler der PMK CCCP (Spur 3), der Inhibitor der PMK DCCD (Spur 4) oder kein zusätzliches Reagenz hinzugegeben (-; Spuren 1 und 2). Bei den mit „+“-markierten Proben wurde das Crosslinking durch Bestrahlung mit UV-Licht initiiert. Die Crosslinking-Produkte wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem Phosphorimager visualisiert. Schwarze Sterne markieren Crosslinks zwischen iKQ-T22I und der Position I4 von TatB. Die Positionen der Proteinmarkerbanden in kDa sind am linken Rand der Abbildung angegeben. Die Position der Bande, welche das TorA [KQ,T22I]-30aa-MalE-Vorläuferprotein (V) repräsentiert, ist am rechten Rand der Abbildung durch einen Pfeil markiert. Experiment wurde durchgeführt von Julia Fröbel, Institut für Biochemie und Molekularbiologie / Universität Freiburg, und verändert in Ulfig *et al.* (2017) publiziert.

In Abwesenheit der Inhibitoren ist ein UV-abhängiges Crosslinking-Produkt unterhalb der 70 kDa-Markerbande zu erkennen, welches von der Größe her einem 1:1 TatB-iKQ-T22I-Komplex entspricht (Spur 2). Erwartungsgemäß wurde dieser Kontakt zwischen TatB und KQ-T22I nicht von dem Entkoppler CCCP beeinflusst, da dieser lediglich die PMK-abhängige Translokation über die Membran verhindert – nicht aber die Insertion in die TatBC-Bindetasche (Spur 3). Im

Gegensatz dazu konnten nach der Zugabe von DCCD keine Kontakte mehr zwischen TatB und iKQ-T22I nachgewiesen werden, wodurch die strikte Abhängigkeit der beobachteten Crosslinking-Produkte von der tiefen Insertion dieser Reportervariante in den TatBC-Rezeptorkomplex demonstriert wird (Spur 4). Diese Ergebnisse bestätigen daher eindeutig, dass sich die Mutationen in der h-Region direkt auf den Bindungsschritt des TorA-Signalpeptids an den TatBC-Rezeptorkomplex nach dessen Insertion in die TatBC-Bindetasche und vor der PMF-abhängigen Translokation des Tat-Substrats über die Membran auswirken.

1.8 Untersuchung der Auswirkung von Kombinationen der Suppressormutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids mit Suppressormutationen im TatBC-Rezeptorkomplex auf den Export von TorA[KQ]-30aa-MalE

Bisher wurde gezeigt, dass die isolierten Mutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids den Exportdefekt von TorA[KQ]-30aa-MalE durch Erhöhung der Gesamthydrophobizität signifikant und im Falle von Kombinationen sogar synergistisch supprimieren können. Die Untersuchungsergebnisse zeigen klar, dass sich die Mutationen direkt auf die „advanced-stage“ – Bindung des TorA[KQ]-Signalpeptids an den TatBC-Rezeptorkomplex auswirken. Die in die h-Region neu eingeführten hydrophoberen Aminosäuren fügen dabei sehr wahrscheinlich zusätzliche Bindungskontakte zwischen dem TorA[KQ]-Signalpeptid und der hydrophoben TatBC-Bindetasche ein oder verstärken bereits bestehende hydrophobe Wechselwirkungen, wodurch der Verlust der wichtigen Bindungskontakte an der Zwillingsarginin-Position kompensiert wird. Es konnte zwar gezeigt werden, dass der Export von TorA[KQ]-30aa-MalE durch Kombinationen zweier Suppressormutationen in der h-Region deutlich erhöht werden kann – jedoch konnte der Verlust des Zwillingsarginins bisher maximal zu einem Drittel durch die Doppelmutation G25V+G28W (28,2%) kompensiert werden. Da die Crosslinking-Experimente ergeben haben, dass die TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit h-Region-lokalisierten Suppressor-mutationen tief in die TatBC-Bindetasche inserieren, stellte sich die Frage, ob der Export von TorA[KQ]-30aa-MalE demnach durch zusätzliche Suppressormutationen im TatBC-Rezeptorkomplex weiter verbessert werden könnte. Daher sollte nun untersucht werden, ob Kombinationen der intragenen Suppressormutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids mit extragenen Suppressormutationen im TatBC-Rezeptorkomplex, welche in vorherigen Studien isoliert wurden (Kreutzenbeck *et al.*, 2007; Lausberg *et al.*, 2012), sich additiv oder gar synergistisch auf die Exporteffizienz von TorA[KQ]-30aa-MalE auswirken würden.

Für diese Untersuchungen wurden die TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit der Einzelmutation A16V, T22I bzw. G25V sowie mit der Doppelmutation G25V+G28W ausgewählt, welche sich sowohl in der Suppressorstärke wie auch in der Lage innerhalb der h-Region voneinander unterscheiden, und folgende mutierte Tat-Translokasen aus früheren Studien: TatAB[E8K]CE mit der Mutation E8K im N-Terminus von TatB, die den Exportdefekt von TorA[KQ]-MalE nur geringfügig supprimiert, und TatABC[L9F]E mit der Suppressormutation L9F im N-Terminus von TatC, die einen effizienteren Export erlaubt (Kreutzenbeck *et al.*, 2007).

Zusätzlich wurde mittels ortsgerichteter Mutagenese eine neue Variante der Tat-Translokase konstruiert, in welcher die beiden Suppressormutationen in TatB und TatC kombiniert vorliegen. Anschließend wurde der *E. coli* –Stamm GSJ101, welcher die Plasmid-kodierten mutierten Tat-Translokasen exprimiert, mit den verschiedenen pTorA[KQ]-30aa-MalE-Plasmidvarianten transformiert. Der Export der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten durch die mutierten Translokasen TatAB[E8K]CE, TatABC[L9F]E sowie die neu konstruierte Tat-Translokase TatAB[E8K]C[L9F]E wurde schließlich im Plattenassay wie auch auf Proteinebene in Zellfraktionierungsstudien untersucht. Die Auswertung der Plattenassays erfolgte jeweils nach einer Inkubationszeit von 15 h und 24 h, um auch geringfügige Unterschiede in der Färbung der Kolonien auf MCM sowie im Wachstum auf MMM der entsprechenden *E. coli* –Stämme registrieren zu können. Auf der Basis von mindestens drei unabhängigen Zellfraktionierungen wurde für jede Reportervariante zudem der prozentuale Export durch die drei mutierten Tat-Translokasen bestimmt, sodass auch Aussagen darüber getroffen werden können, ob sich die extragenen Suppressormutationen in TatBC additiv oder synergistisch auf den Export der verschiedenen mutierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten auswirken. Der Export des wildtypischen TorA[RR]-30aa-MalE-Reporterproteins durch die wildtypische Tat-Translokase wurde hierbei als 100% festgesetzt.

1.8.1 Untersuchung des Exports der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit h-Region-lokalisierten Suppressormutationen durch die mutierte Tat-Translokase TatAB[E8K]CE

In Tabelle 7 und Abbildung 32 ist das Ergebnis der Untersuchung des Exports der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten iKQ-A16V, iKQ-T22I, iKQ-G25V und iKQ-G25V+G28W durch die mutierte TatAB[E8K]CE-Translokase dargestellt. Das Wachstum der entsprechenden *E. coli* –Stämme auf MMM und MCM wurde nach 15 h sowie 24 h Inkubation bei 37°C protokolliert und die Beobachtungen in tabellarischer Form zusammengefasst (Tabelle 7).

Im Falle aller TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten, welche Suppressormutationen in der h-Region aufweisen, konnte ein höherer Export durch die TatAB[E8K]CE-Translokase im Vergleich zur wildtypischen Translokase beobachtet werden, was sich in der stärkeren Rotfärbung auf MCM wie auch in der höheren Wachstumsrate auf MMM widerspiegelt. Die zusätzliche Mutation E8K im N-Terminus von TatB scheint hingegen keinen Einfluss auf den Export des unveränderten TorA-30aa-MalE-Reporterproteins zu haben, da keine signifikanten Unterschiede in der Rotfärbung der Kolonien auf MCM sowie im Wachstum auf MMM zwischen den beiden *E. coli* –Stämmen, welche die Positivkontrolle TorA-30aa-MalE und die Wildtyp-Tat-Translokase bzw. die mutierte TatAB[E8K]CE-Translokase coexprimieren, festgestellt werden können (Spalten 1 und 2).

Tabelle 7: Phänotypen von *E. coli* GSJ101 mit verschiedenen TorA-30aa-MaIE-Reportervarianten und der Wildtyp-Tat-Translokase bzw. mutierten TatAB[E8K]CE-Translokase auf MMM und MCM.

TorA	Wt		KQ		KQ A16V		KQ T22I		KQ G25V		KQ G25V G28W		
	Wt	E8K	Wt	E8K	Wt	E8K	Wt	E8K	Wt	E8K	Wt	E8K	
MMM	+++	+++	-	(+)	(+)	++	++	+++	++	++(+)	++(+)	+++	15 h
MCM	rot	rot	weiss	weiss	weiss	pink	pink	rot	pink	rot	rot	rot	
MMM	+++	+++	-	+(+)	+	++(+)	++(+)	+++	++(+)	+++	+++	+++	24 h
MCM	rot	rot	weiss	rosa	weiss	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Beschrieben ist das Wachstum des Stamms *E. coli* GSJ101, welcher die Wildtyp-Tat-Translokase (Wt) bzw. die mutierte TatAB[E8K]CE-Translokase (E8K) und die verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MaIE-Reportervarianten mit Mutationen in der h-Region coexprimiert, auf MCM- und MMM-Agarplatten nach 15 h und 24 h Inkubation. Als Positivkontrolle diente *E. coli* GSJ101 (pTorA-30aa-MaIE, pHSG-TatABCE), welcher die Wildtyp-Tat-Translokase (Wt) und den unveränderten TorA-30aa-MaIE-Reporter (Wt) coexprimiert (Spalte 1), und als Negativkontrolle der Stamm GSJ101 (pTorA[KQ]-30aa-MaIE, pHSG-TatABCE), der die Wildtyp-Tat-Translokase (Wt) und das exportdefekte Reporterprotein TorA[KQ]-30aa-MaIE enthält (Spalte 3). Phänotypen auf MMM: +++: effizientes Wachstum; ++: moderates Wachstum; +: langsames Wachstum; -: kein signifikantes Wachstum. Phänotypen auf MCM: weisse, rosafarbige, pinke oder rote Kolonienfarbe.

Erwartungsgemäß konnte im Gegensatz zur Wildtyp-Tat-Translokase ein geringfügiger Export der normalerweise Transport-inkompetenten Reportervariante TorA[KQ]-30aa-MaIE durch die TatAB[E8K]CE-Translokase beobachtet werden, welcher ein langsames Wachstum des entsprechenden Stamms auf MMM und die Bildung rosafarbiger Kolonien auf MCM nach 24 h erlaubt (Spalten 3 und 4). Die Unterschiede in der Exporteffizienz der TorA[KQ]-30aa-MaIE-Reportervarianten mit h-Region-lokalisierten Suppressormutationen durch die wildtypische und mutierte Tat-Translokase sind im Plattenassay besonders deutlich nach einer kürzeren Inkubationszeit von 15 h zu erkennen. Nach 24 h wurde bereits die maximale Farbtiefe auf MCM erreicht, sodass die Kolonien der *E. coli* Stämme, welche die wildtypische Tat-Translokase bzw. die mutierte TatAB[E8K]CE-Translokase und die TorA[KQ]-30aa-MaIE-Reportervariante iKQ-T22I, iKQ-G25V bzw. iKQ-G25V+G28W coexprimierten, eine ähnlich intensive Rotfärbung aufwiesen. Um festzustellen, ob die Mutationen in der h-Region und die Mutation E8K in TatB additiv oder synergistisch bei der Suppression des Exportdefekts von TorA[KQ]-30aa-MaIE zusammenwirken, wurden die exportierten MaIE-Mengen in den PP-Fractionen der jeweiligen Stämme quantifiziert. Wie in Abbildung 32 gezeigt, konnte bei allen TorA[KQ]-30aa-MaIE-Reportervarianten, welche Suppressormutationen in der h-Region aufwiesen und durch die mutierte TatAB[E8K]CE-Translokase exportiert wurden, eine deutliche Zunahme der reifen Proteinmenge in den jeweiligen PP-Fractionen im Vergleich zu einem Export dieser Reporterproteine durch die wildtypische Tat-Translokase nachgewiesen werden (Abbildung 32 A und B, vgl. Spuren 6 und 8 mit 5 und 7; C, vgl. Spuren 6, 8, 10 und 12 mit 5, 7, 9 und 11). Zudem konnte ein klarer Unterschied zwischen den mutierten TorA[KQ]-30aa-MaIE-Reportervarianten und der Negativkontrolle TorA[KQ]-30aa-MaIE mit unveränderter h-Region im Export durch die TatAB[E8K]CE-Translokase festgestellt werden.

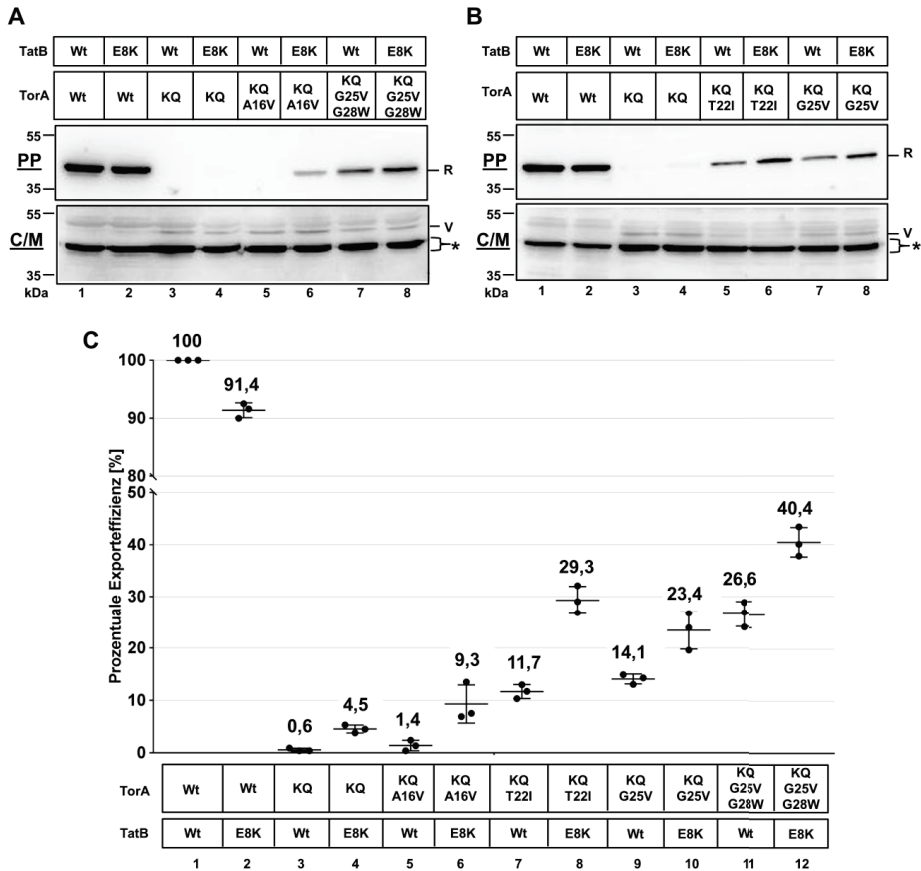


Abbildung 32: Untersuchung des Exports der verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit Einzel- und Doppelmutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids durch die Wildtyp-Tat-Translokase bzw. die mutierte TatAB[E8K]CE-Translokase in *E. coli* GSJ101. (A, B) Subzelluläre Lokalisation der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit h-Region-lokaliserten Mutationen nach erfolgter Zellfraktionierung von *E. coli* GSJ101 zur Untersuchung des Exports aus dem Cytosol ins Periplasma auf Proteinebene. Dargestellt sind Proben des Stamms GSJ101 mit Plasmid-kodierter Wildtyp-Tat-Translokase (Wt) bzw. mutierter TatAB[E8K]CE-Translokase (E8K) und den verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten. Die vorliegenden Mutationen im TorA-Signalpeptid der entsprechenden Reportervarianten sind über den jeweiligen Spuren angegeben. Wt: TorA-30aa-MalE; KQ: TorA[KQ]-30aa-MalE; KQ X: TorA[KQ,X]-30aa-MalE mit (A) X= A16V bzw. G25V+G28W, (B) X= T22I bzw. G25V. Als Positivkontrolle diente *E. coli* GSJ101 (pTorA-30aa-MalE, pHSG-TatABCE), welcher die Wildtyp-Tat-Translokase (Wt) und den unveränderten TorA-30aa-MalE-Reporter (Wt) coexprimiert (Spur 1), und als Negativkontrolle der Stamm GSJ101 (pTorA[KQ]-30aa-MalE, pHSG-TatABCE), der die Wildtyp-Tat-Translokase (Wt) und das exportdefekte Reporterprotein TorA[KQ]-30aa-MalE enthält (Spur 3). Die Zellen wurden mittels osmotischen Schocks in eine Periplasma-Fraktion (PP) und eine kombinierte Cytoplasma/Membran-Fraktion (C/M) getrennt. Anschließend wurden Proben der Zellfraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Für die C/M-Fraktion wurden 10 µg Gesamtprotein aufgetragen und für die PP-Fraktion 4 µg. Die Proteine wurden anschließend mittels Western-Blot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Der Nachweis der malE-Genprodukte erfolgte durch MalE-spezifische Antikörper. Im Periplasma liegt die reife MalE-Form (R) vor, während in der C/M-Fraktion die oberste Bande das jeweilige MalE-Vorläuferprotein (V) und die darunter liegenden Banden cytoplasmatische Abbauprodukte (*) von MalE repräsentieren. Die Positionen der 35 kDa- und 55 kDa-Markerbande sind am linken Rand der Abbildung markiert. Der Nachweis des Anti-Rabbit IgG Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers erfolgte mit Hilfe des „Amersham ECL™ Western Blotting System“ (GE Healthcare, München). Die Chemilumineszenzsignale wurden mit der „LAS-3000 Mini“ CCD-Kamera (Fujifilm) detektiert. (C) Die prozentualen Translokationseffizienzen [%] wurden in drei unabhängigen Experimenten über die Quantifizierung der Chemilumineszenzsignale mit Hilfe der Software AIDA Image Analyzer Version 4.50 (Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt) bestimmt. Die schwarzen Punktsymbole repräsentieren die Werte aus den jeweils durchgeführten Experimenten, wobei der Mittelwert als Zahl über den Werten ausgeschrieben sowie durch eine horizontale Linie markiert ist. Dargestellt sind zudem die jeweiligen Standardabweichungen als Fehlerbalken.

Während der Transport der Negativkontrolle durch die Suppressormutation E8K in TatB lediglich zu 4,5% wiederhergestellt werden kann (Abbildung 32 C, Spur 4), nimmt die Translokationseffizienz der Reportervarianten iKQ-A16V, iKQ-T22I, iKQ-G25V bzw. iKQ-G25V+G28W durch die zusätzliche TatB-lokalisierte Suppressormutation um 7,9%, 17,6%, 9,3% bzw. 13,8% (und damit um mehr als 4,5%) auf 9,3%, 29,3%, 23,4% bzw. 40,4% zu, sodass von einem synergistischen Effekt der TatB-Mutation auf die Exporteffizienz der getesteten mutierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten ausgegangen werden kann (Abbildung 32 C, vgl. Spuren 6, 8, 10 und 12 mit 5, 7, 9 und 11).

Der synergistische Effekt der TatB-Mutation E8K auf die Exporteffizienz der verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten ist überraschenderweise bei dem Reporterprotein mit der h-Region-lokaliserten Mutation T22I am stärksten, welche im Vergleich zur Doppelmutation G25V+G28W (26,6%) einen deutlich geringeren Export von TorA[KQ]-30aa-MalE durch die wildtypische Tat-Translokase (11,7%) erlaubt (Abbildung 32 C, vgl. Spuren 7 und 8 mit 11 und 12). Offensichtlich spielt hierbei die Konformation des TorA[KQ]-Signalpeptids innerhalb der TatBC-Bindetasche, welche von den einzelnen Suppressormutationen in der h-Region unterschiedlich beeinflusst wird, eine Rolle.

1.8.2 Untersuchung des Exports der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit h-Region-lokaliserten Suppressormutationen durch die mutierte Tat-Translokase TatABC[L9F]E

Als nächstes wurde der Export der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten iKQ-A16V, iKQ-T22I und iKQ-G25V+G28W durch die mutierte TatABC[L9F]E-Translokase untersucht. In Tabelle 8 sind die Phänotypen der *E. coli* –Stämme GSJ101, welche die Wildtyp- bzw. mutierte Tat-Translokase und die verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten coexprimieren, auf MMM/MCM-Agarplatten nach 15 bzw. 24 h Inkubation beschrieben.

Bereits anhand der Ergebnisse des Plattenassays ist zu erkennen, dass sich die zusätzliche Mutation L9F im cytoplasmatisch lokalisierten N-Terminus von TatC im Vergleich zur Mutation E8K in TatB wesentlich stärker auf die Exporteffizienz der mutierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten auswirkt. Die jeweiligen *E. coli* –Stämme wuchsen effizient mit Maltose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle und bildeten bereits nach 15 h Inkubation rote Kolonien auf MCM. Die Zunahme der Exporteffizienz durch die TatC-Mutation L9F wird insbesondere bei der Reportervariante iKQ-A16V deutlich, welche von der wildtypischen Tat-Translokase nur geringfügig exportiert wird (1,4%). Der entsprechende Stamm, welcher die wildtypische Tat-Translokase enthält, weist nach 15 h nur ein sehr langsames Wachstum auf MMM sowie eine weiße Kolonienfarbe auf MCM auf (Spalte 5). Wird jedoch die Mutation L9F in die TatC-Komponente der Tat-Translokase eingeführt, so zeigt dieser Stamm ein effizientes Wachstum auf MMM und bildet rote Kolonien auf MCM (Spalte 6). Dieser unterscheidet sich phänotypisch nicht signifikant von der Positivkontrolle GSJ101 (pTorA-30aa-MalE, pHSG-TatABCE), welche die Wildtyp-Tat-Translokase und das unveränderte TorA-30aa-MalE-Reporterprotein coexprimiert (Spalte 1). Im Plattenassay konnten keine signifikanten Unterschiede im Export des

unveränderten Reporters TorA-30aa-MalE durch die beiden Tat-Translokasen festgestellt werden (vgl. Spalten 1 und 2). Im Einklang mit der von Kreutzenbeck *et al.* (2007) beobachteten höheren Suppressoraktivität der Mutation L9F, wurde die Negativkontrolle TorA[KQ]-30aa-MalE mit unveränderter h-Region effizienter durch die TatABC[L9F]E-Translokase exportiert als durch die TatAB[E8K]CE-Translokase. Der entsprechende Stamm bildete bereits nach 15 h einen rosafarbenen Phänotyp auf MCM aus (Spalte 4). Aufgrund der hohen Sensitivität des Plattenassays konnten anhand der beobachteten Phänotypen keine Aussagen über die genaue Zunahme der jeweiligen Exporteffizienzen der verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten durch die zusätzliche TatC-lokalisierte Suppressormutation getroffen werden, da in den meisten Fällen bereits nach einer Inkubationszeit von 15 h die maximale Farbtiefe der Kolonien auf MCM erreicht wurde.

Tabelle 8: Phänotypen von *E. coli* GSJ101 mit verschiedenen TorA-30aa-MalE-Reportervarianten und der Wildtyp-Tat-Translokase bzw. mutierten TatABC[L9F]E-Translokase auf MMM und MCM.

TorA	Wt		KQ		KQ A16V		KQ T22I		KQ G25V G28W		
	Wt	L9F	Wt	L9F	Wt	L9F	Wt	L9F	Wt	L9F	
MMM	+++	+++	-	+(+)	(+)	++(+)	++	+++	++(+)	+++	15 h
MCM	rot	rot	weiss	rosa	weiss	rot	pink	rot	rot	rot	
MMM	+++	+++	-	++	+	+++	++(+)	+++	+++	+++	24 h
MCM	rot	rot	weiss	pink	weiss	rot	rot	rot	rot	rot	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

Beschrieben ist das Wachstum des Stamms *E. coli* GSJ101, welcher die Wildtyp-Tat-Translokase (Wt) bzw. die mutierte TatABC[L9F]E-Translokase (L9F) und die verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit Mutationen in der h-Region coexprimiert, auf MCM- und MMM-Agarplatten nach 15 h und 24 h Inkubation. Als Positivkontrolle diente *E. coli* GSJ101 (pTorA-30aa-MalE, pHSG-TatABCE), welcher die Wildtyp-Tat-Translokase (Wt) und den unveränderten TorA-30aa-MalE-Reporter (Wt) coexprimiert (Spalte 1), und als Negativkontrolle der Stamm GSJ101 (pTorA[KQ]-30aa-MalE, pHSG-TatABCE), der die Wildtyp-Tat-Translokase (Wt) und das exportdefekte Reporterprotein TorA[KQ]-30aa-MalE enthält (Spalte 3). Phänotypen auf MMM: +++: effizientes Wachstum; ++: moderates Wachstum; +: langsames Wachstum; -: kein signifikantes Wachstum. Phänotypen auf MCM: weisse, rosafarbige, pinke oder rote Kolonienfarbe.

Daher wurde der Export der verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit h-Region-lokaliserten Suppressormutationen durch die mutierte TatABC[L9F]E-Translokase anschließend auch auf Proteinebene in Zellfraktionierungsstudien untersucht (Abbildung 33). Anhand der exportierten MalE-Mengen in den PP-Fractionen der entsprechenden *E. coli* -Stämme sowie der prozentualen Exporteffizienzen ist zu erkennen, dass sich eine Kombination der Suppressormutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids mit der Mutation L9F in TatC, im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Kombinationen mit der TatB-Mutation E8K, wesentlich stärker synergistisch auf den Export von TorA[KQ]-30aa-MalE auswirkt. Während die Negativkontrolle TorA[KQ]-30aa-MalE mit einer Effizienz von 9,6% durch die TatABC[L9F]E-Translokase exportiert wird (Abbildung 33 C, Spur 4), nimmt die Translokationseffizienz der Reportervarianten KQ-A16V, KQ-T22I bzw. KQ-G25V+G28W im Vergleich zum Export durch die wildtypische Tat-Translokase sogar um 34,2%, 54,0% bzw. 55,4% auf 35,6%, 65,7% bzw. 82,0% zu (Abbildung 33 C, vgl. Spur 6, 8 bzw. 10 mit 5, 7 bzw. 9).

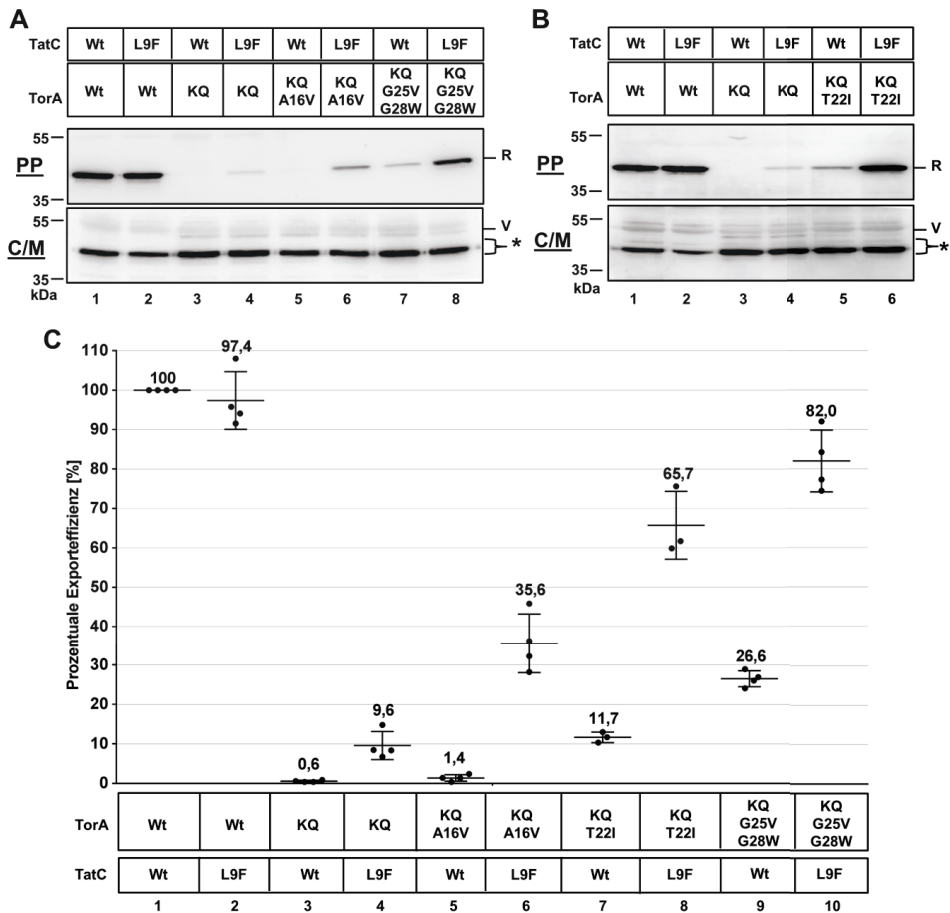


Abbildung 33: Untersuchung des Exports der verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit Einzel- und Doppelmutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids durch die Wildtyp-Tat-Translokase bzw. die mutierte TatABC[L9F]-E-Translokase in *E. coli* GSJ101. (A, B) Subzelluläre Lokalisation der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit h-Region-lokalisierten Mutationen nach erfolgter Zellfraktionierung von *E. coli* GSJ101 zur Untersuchung des Exports aus dem Cytosol ins Periplasma auf Proteinebene. Dargestellt sind Proben des Stamms GSJ101 mit Plasmid-kodierter Wildtyp-Tat-Translokase (Wt) bzw. mutierter TatABC[L9F]-E-Translokase (L9F) und den verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten. Die vorliegenden Mutationen im TorA-Signalpeptid der entsprechenden Reportervarianten sind über den jeweiligen Spalten angegeben. Wt: TorA-30aa-MalE; KQ: TorA[KQ]-30aa-MalE; KQ X: TorA[KQ,X]-30aa-MalE mit (A) X= A16V bzw. G25V+G28W, (B) X= T22I. Als Positivkontrolle diente *E. coli* GSJ101 (pTorA-30aa-MalE, pHSG-TatABCE), welcher die Wildtyp-Tat-Translokase (Wt) und den unveränderten TorA-30aa-MalE-Reporter (Wt) coexprimiert (Spur 1), und als Negativkontrolle der Stamm GSJ101 (pTorA[KQ]-30aa-MalE, pHSG-TatABCE), der die Wildtyp-Tat-Translokase (Wt) und das exportdefekte Reporterprotein TorA[KQ]-30aa-MalE enthält (Spur 3). Die Zellen wurden mittels osmotischen Schocks in eine Periplasma-Fraktion (PP) und eine kombinierte Cytoplasma/Membran-Fraktion (C/M) getrennt. Anschließend wurden Proben der Zellfraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Für die C/M-Fraktion wurden 10 µg Gesamtprotein aufgetragen und für die PP-Fraktion 4 µg. Die Proteine wurden anschließend mittels Western-Blot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Der Nachweis der malE-Genprodukte erfolgte durch MalE-spezifische Antikörper. Im Periplasma liegt die reife MalE-Form (R) vor, während in der C/M-Fraktion die oberste Bande das jeweilige MalE-Vorläuferprotein (V) und die darunter liegenden Banden cytoplasmatische Abbauprodukte (*) von MalE repräsentieren. Die Positionen der 35 kDa- und 55 kDa-Markerbande sind am linken Rand der Abbildung markiert. Der Nachweis des Anti-Rabbit IgG Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers erfolgte mit Hilfe des „Amersham ECL™ Western Blotting System“ (GE Healthcare, München). Die Chemilumineszenzsignale wurden mit der „LAS-3000 Mini“ CCD-Kamera (Fujifilm) detektiert. (C) Die prozentualen Translokationseffizienzen [%] wurden in mind. drei unabhängigen Experimenten über die Quantifizierung der Chemilumineszenzsignale mit Hilfe der Software AIDA Image Analyzer Version 4.50 (Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt) bestimmt. Die schwarzen Punktsymbole repräsentieren die Werte aus den jeweils durchgeführten Experimenten, wobei der Mittelwert als Zahl über den Werten ausgeschrieben sowie durch eine horizontale Linie markiert ist. Dargestellt sind zudem die jeweiligen Standardabweichungen als Fehlerbalken.

Der Export der normalerweise Transport-inkompetenten Reportervariante TorA[KQ]-30aa-MalE konnte durch bestimmte Kombinationen der h-Region-lokaliserten Mutationen mit der Suppressormutation L9F in TatC somit bereits zu über 80% wiederhergestellt werden (Abbildung 33 C, Spur 10).

1.8.3 Untersuchung des Exports der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit h-Region-lokaliserten Suppressormutationen durch die mutierte Tat-Translokase TatAB[E8K]C[L9F]E

Zuletzt wurde der Export der mutierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten iKQ-A16V, iKQ-T22I und iKQ-G25V+G28W durch die neu konstruierte TatAB[E8K]C[L9F]E-Translokase untersucht, in welcher die beiden zuvor beschriebenen Mutationen E8K in TatB und L9F in TatC kombiniert vorliegen. Aufgrund der vorherigen Ergebnisse wurde spekuliert, dass der Export von TorA[KQ]-30aa-MalE durch eine Kombination der h-Region-lokaliserten Mutationen mit den beiden extragenen Mutationen im TatBC-Rezeptorkomplex sogar vollständig wiederhergestellt werden könnte. Wie der Tabelle 9 zu entnehmen ist, wirkte sich die Kombination der beiden TatBC-gekoppelten Suppressormutationen auch synergistisch auf den Export der Negativkontrolle TorA[KQ]-30aa-MalE mit unveränderter h-Region aus.

Tabelle 9: Phänotypen von *E. coli* GSJ101 mit verschiedenen TorA-30aa-MalE-Reportervarianten und der Wildtyp-Tat-Translokase bzw. mutierten TatAB[E8K]C[L9F]E-Translokase auf MMM und MCM.

TorA	Wt		KQ		KQ A16V		KQ T22I		KQ G25V G28W		
	Wt	E8K	Wt	E8K	Wt	E8K	Wt	E8K	Wt	E8K	
TatB	Wt	E8K	Wt	E8K	Wt	E8K	Wt	E8K	Wt	E8K	
TatC	Wt	L9F	Wt	L9F	Wt	L9F	Wt	L9F	Wt	L9F	
MMM	+++	+++	-	+++	(+)	+++	++	+++	++(+)	+++	15 h
MCM	rot	rot	weiss	rot	weiss	rot	pink	rot	rot	rot	
MMM	+++	+++	-	+++	+	+++	++(+)	+++	+++	+++	24 h
MCM	rot	rot	weiss	rot	weiss	rot	rot	rot	rot	rot	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

Beschrieben ist das Wachstum des Stamms *E. coli* GSJ101, welcher die Wildtyp-Tat-Translokase (Wt) bzw. die mutierte TatAB[E8K]C[L9F]E-Translokase und die verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit Mutationen in der h-Region coexprimiert, auf MCM- und MMM-Agarplatten nach 15 h und 24 h Inkubation. Als Positivkontrolle diente *E. coli* GSJ101 (pTorA-30aa-MalE, pHSG-TatABCE), welcher die Wildtyp-Tat-Translokase (Wt) und den unveränderten TorA-30aa-MalE-Reporter (Wt) coexprimiert (Spalte 1), und als Negativkontrolle der Stamm GSJ101 (pTorA[KQ]-30aa-MalE, pHSG-TatABCE), der die Wildtyp-Tat-Translokase (Wt) und das exportdefekte Reporterprotein TorA[KQ]-30aa-MalE enthält (Spalte 3). Phänotypen auf MMM: +++: effizientes Wachstum; ++: moderates Wachstum; +: langsames Wachstum; -: kein signifikantes Wachstum. Phänotypen auf MCM: weisse, pinke oder rote Kolonienfarbe.

Der entsprechende *E. coli* –Stamm wuchs bereits nach 15 h effizient auf MMM und wies eine tiefe Rotfärbung der Kolonien auf MCM auf (Spalte 4). Dieser synergistische Effekt der extragenen Doppelmutation auf den Export von TorA[KQ]-30aa-MalE konnte auch auf Proteinebene nachgewiesen werden (Abbildung 34). Während die Negativkontrolle mit einer Effizienz von 4,5% bzw. 9,6% durch die mutierte TatAB[E8K]CE- bzw. TatABC[L9F]E-Translokase exportiert wurde, konnte im Falle der Kombination beider Tat-lokalisierter Mutationen eine deutliche Zunahme der Translokationseffizienz auf 44,3% detektiert werden (Spur 4).

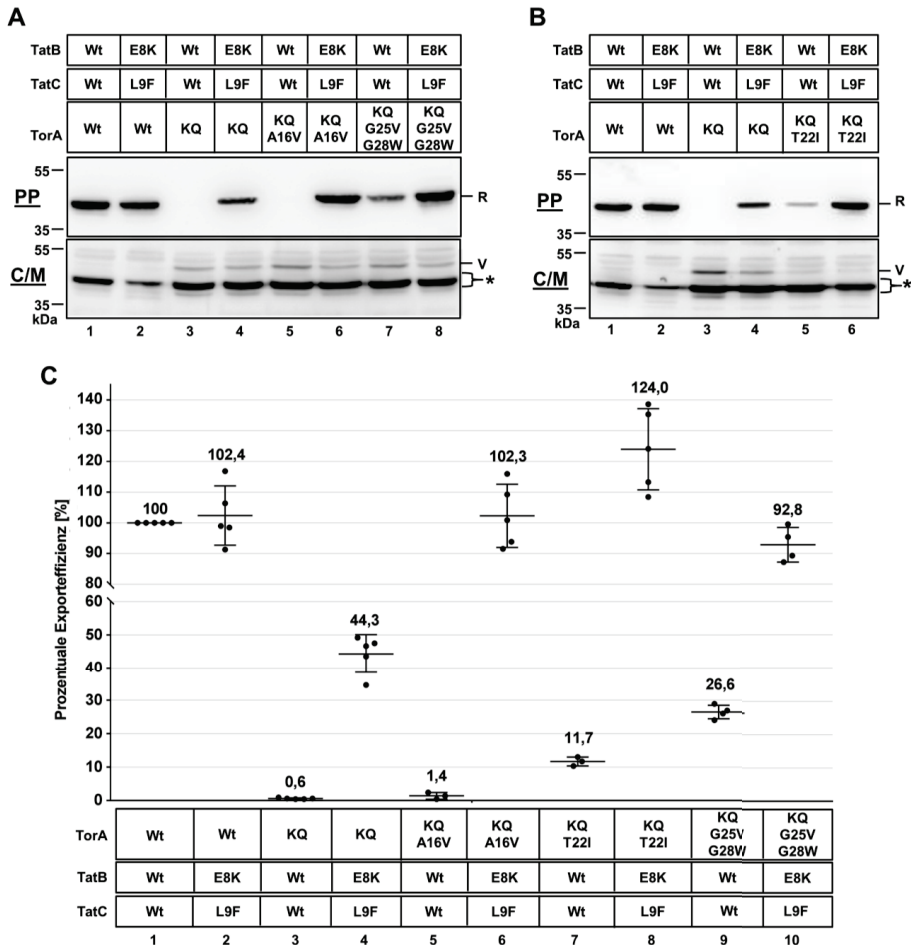


Abbildung 34: Untersuchung des Exports der verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit Einzel- und Doppelmutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids durch die Wildtyp-Tat-Translokase bzw. die mutierte TatAB[E8K]C[L9F]E-Translokase in *E. coli* GSJ101. (A, B) Subzelluläre Lokalisation der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit h-Region-lokaliserten Mutationen nach erfolgter Zelfraktionierung von *E. coli* GSJ101 zur Untersuchung des Exports aus dem Cytosol ins Periplasma auf Proteinebene. Dargestellt sind Proben des Stamms GSJ101 mit Plasmid-kodierter Wildtyp-Tat-Translokase (Wt) bzw. mutierter TatAB[E8K]C[L9F]E-Translokase und den verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten. Die vorliegenden Mutationen im TorA-Signalpeptid der entsprechenden Reportervarianten sind über den jeweiligen Spuren angegeben. Wt: TorA-30aa-MalE; KQ: TorA[KQ]-30aa-MalE; KQ X: TorA[KQ,X]-30aa-MalE mit (A) X= A16V bzw. G25V+G28W, (B) X= T22I. Als Positivkontrolle diente *E. coli* GSJ101 (pTorA-30aa-MalE, pHSG-TatABCE), welcher die Wildtyp-Tat-Translokase (Wt) und den unveränderten TorA-30aa-MalE-Reporter (Wt) coexprimiert (Spur 1), und als Negativkontrolle der Stamm GSJ101 (pTorA[KQ]-30aa-MalE, pHSG-TatABCE), der die Wildtyp-Tat-Translokase (Wt) und das exportdefekte Reporterprotein TorA[KQ]-30aa-MalE enthält (Spur 3). Die Zellen wurden mittels osmotischen Schocks in eine Periplasma-Fraktion (PP) und eine kombinierte Cytoplasma/Membran-Fraktion (C/M) getrennt. Anschließend wurden Proben der Zelfraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Für die C/M-Fraktion wurden 10 µg Gesamtprotein aufgetragen und für die PP-Fraktion 4 µg. Die Proteine wurden anschließend mittels Western-Blot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Der Nachweis der malE-Genprodukte erfolgte durch MalE-spezifische Antikörper. Im Periplasma liegt die reife MalE-Form (R) vor, während in der C/M-Fraktion die oberste Bande das jeweilige MalE-Vorläuferprotein (V) und die darunter liegenden Banden cytoplasmatische Abbauprodukte (*) von MalE repräsentieren. Die Positionen der 35 kDa- und 55 kDa-Markerbande sind am linken Rand der Abbildung markiert. Der Nachweis des Anti-Rabbit IgG Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers erfolgte mit Hilfe des „Amersham ECL™ Western Blotting System“ (GE Healthcare, München). Die Chemilumineszenzsignale wurden mit der „LAS-3000 Mini“ CCD-Kamera (Fujifilm) detektiert. (C) Die prozentualen Translokationseffizienzen [%] wurden in mind. drei unabhängigen Experimenten über die Quantifizierung der Chemilumineszenzsignale mit Hilfe der Software AIDA Image Analyzer Version 4.50 (Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt) bestimmt. Die schwarzen Punktsymbole repräsentieren die Werte aus den jeweils durchgeführten Experimenten, wobei der Mittelwert als Zahl über den Werten ausgeschrieben sowie durch eine horizontale Linie markiert ist. Dargestellt sind zudem die jeweiligen Standardabweichungen als Fehlerbalken.

Der unveränderte TorA-30aa-MalE-Reporter wurde hingegen mit etwa der gleichen Effizienz durch die wildtypische Tat-Translokase wie auch durch die mutierte TatAB[E8K]C[L9F]E-Translokase ins Periplasma des entsprechenden Stamms exportiert (Abbildung 34, vgl. Spur 1 mit Spur 2). Die *E. coli* –Stämme, welche die TatAB[E8K]C[L9F]E-Translokase und die TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit den verschiedenen h-Region-lokaliserten Suppressor-mutationen coexprimierten, wuchsen effizient auf MMM und wiesen einen tiefroten Phänotyp auf MCM auf (Tabelle 9, Spalten 6, 8 und 10). Während die Mutationen A16V, T22I bzw. G25V+G28W in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids einen vergleichsweise geringfügigen Export der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervariante mit einer Effizienz von 1,4%, 11,7% bzw. 26,6% durch die Wildtyp-Tat-Translokase erlauben, konnte im Falle der Kombination dieser Mutationen mit der Doppelmutation E8K(TatB)L9F(TatC) eine deutliche Zunahme der Translokationseffizienzen der entsprechenden mutierten Reporterproteine iKQ-A16V, iKQ-T22I bzw. iKQ-G25V+G28W auf 102,3%, 124,0% bzw. 92,8% nachgewiesen werden (Abbildung 34 C, vgl. Spur 5, 7 bzw. 9 mit 6, 8 bzw. 10). Dies zeigt deutlich, dass die Mutationen in der Tat-Translokase und die h-Region-lokaliserten Mutationen im TorA[KQ]-Signalpeptid synergistisch bei der Suppression des Exportdefekts von TorA[KQ]-30aa-MalE zusammenwirken. Im Vergleich zum Export der Reportervarianten iKQ-A16V und iKQ-T22I nahm die Effizienz der Translokation des Reporterproteins iKQ-G25V+G28W durch die Tat-lokaliserten Suppressormutationen am geringsten zu. Dies wurde bereits bei der Untersuchung des Exports dieser TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten durch die mutierte TatAB[E8K]CE-Translokase beobachtet (siehe Abschnitt 1.8.1).

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Export von TorA[KQ]-30aa-MalE durch bestimmte Kombinationen von intra- und extragenen Suppressormutationen trotz eines defekten Zwillingsarginin-Motivs vollständig wiederhergestellt werden kann. Im Falle des Exports von iKQ-T22I durch die TatAB[E8K]C[L9F]E-Translokase konnte sogar eine deutlich höhere Effizienz (124,0%) im Vergleich zum Export des unveränderten TorA-30aa-MalE-Reporters durch die wildtypische Tat-Translokase (100%) nachgewiesen werden.

1.9 Untersuchung des partiellen Sec-abhängigen Exports einiger TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten

Die bisher analysierten mutierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten wurden strikt Tat-spezifisch exportiert. Bei der Selektion der Mutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids, welche den Exportdefekt des TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterproteins supprimieren können, wurden jedoch u.a. auch die Aminosäuresubstitutionen G19V und Q17L isoliert, die einen Export der jeweiligen Reportervarianten sowohl über den Tat-Weg als auch über den Sec-Weg erlaubten (siehe Abschnitt 1.2). Die Bifunktionalität dieser Reportervarianten äußerte sich dadurch, dass die entsprechenden *E. coli* –Stämme auch in Abwesenheit einer funktionalen Tat-Translokase signifikant mit Maltose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen konnten. Da die Wachstumsrate in Anwesenheit beider Translokationssysteme jedoch deutlich höher war,

ist es möglich, dass der Export hierbei parallel über beide Transportwege erfolgte. Andererseits ist es auch denkbar, dass bei Vorliegen einer Sec- und Tat-Translokase der Export über den Tat-Weg favorisiert wird. Weiterhin wurden auch die Reportervarianten iKQ-A16V+G19V und iKQ-A16V+T22I mit Doppelmutationen in der h-Region konstruiert, welche zumindest partiell durch die Sec-Translokase exportiert werden konnten (siehe Abschnitt 1.4). Bisher wurde jedoch noch nicht geklärt, ob der Export dieser Reporterproteine strikt Sec-spezifisch erfolgt oder ob in diesen Fällen ebenfalls eine Bifunktionalität vorliegt. In diesem Zusammenhang erschien es auch interessant zu untersuchen, ob von den TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit dualer Spezifität eines der beiden Transportsysteme bevorzugt wird.

Um diese Fragen zu klären, wurde der Export dieser Reporterproteine in den beiden *E. coli* – Stämmen GSJ101 ($\Delta malE$, Δtat) und GSJ101 ($\Delta malE$, pHSG-TatABCE) genauer mittels Plattenassay untersucht. Die beobachteten Phänotypen der entsprechenden Stämme auf MMM/MCM-Agarplatten sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10: Phänotypen von *E. coli* GSJ101 (Δtat) bzw. GSJ101 (pHSG-TatABCE) mit verschiedenen TorA-30aa-MalE-Reportervarianten auf MMM und MCM.

Reportervariante	Mutationen in der h-Region des TorA-Signalpeptids	Phänotyp von <i>E. coli</i> GSJ101 (pTorA[KQ, X]-30aa-MalE, pHSG-TatABCE) nach 24 h auf		Phänotyp von <i>E. coli</i> GSJ101 (pTorA[KQ, X]-30aa-MalE, Δtat) nach 24 h auf	
		MMM	MCM	MMM	MCM
1 TorA-30aa-MalE	-	+++	rot	-	weiss
2 TorA[KQ]-30aa-MalE	-	-	weiss	-	weiss
3 iKQ-A16V	A16V	+	weiss	-	weiss
4 iKQ-Q17L	Q17L	+++	rot	++	pink
5 iKQ-G19V	G19V	++	pink	+(+)	rosa
6 iKQ-T22I	T22I	++(+)	rot	-	weiss
7 iKQ-A16V+G19V	A16V, G19V	+++	rot	++(+)	rot
8 iKQ-A16V+T22I	A16V, T22I	+++	rot	+(+)	rosa

Beschrieben sind die Phänotypen von *E. coli* GSJ101, welcher die verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit Suppressormutationen innerhalb der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids in Ab- bzw. Anwesenheit einer Tat-Translokase exprimiert, auf MMM- und MCM-Agarplatten nach einer 24-stündigen Inkubation. Als Positivkontrolle diente *E. coli* GSJ101 (pTorA-30aa-MalE, pHSG-TatABCE), welcher die Wildtyp-Tat-Translokase und den unveränderten TorA-30aa-MalE-Reporter coexprimiert, und als Negativkontrolle der Stamm GSJ101 (pTorA[KQ]-30aa-MalE, pHSG-TatABCE), der die Wildtyp-Tat-Translokase und das exportdefekte Reporterprotein TorA[KQ]-30aa-MalE enthält. iKQ-X: intragener KQ-Suppressor mit dem Aminosäureaustausch X. Phänotypen auf MMM: +++: effizientes Wachstum; ++: moderates Wachstum; +: langsames Wachstum; -: kein signifikantes Wachstum mit Maltose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle (MMM). Phänotypen auf MCM: weisse, rosafarbige, pinke oder rote Kolonienfarbe.

Wie der Tabelle 10 zu entnehmen ist, erlaubten die Einzelmutationen Q17L und G19V ein moderates bzw. langsames Wachstum der jeweiligen Stämme auf MMM sowie die Bildung pinker bzw. rosafarbiger Kolonien auf MCM in Abwesenheit einer Tat-Translokase (Zeilen 4 und 5). Die Exporteffizienz der Reportervarianten iKQ-Q17L und iKQ-G19V konnte durch Coexpression der Plasmid-kodierten *tat* –Gene im Stamm GSJ101 (pHSG-TatABCE) weiter gesteigert werden, wodurch ein schnelleres Wachstum der entsprechenden Stämme auf MMM sowie die Bildung roter (iKQ-Q17L) bzw. pinker Kolonien (iKQ-G19V) auf MCM detektiert werden konnte. Wurde die Mutation G19V mit dem Aminosäureaustausch A16V, welcher einen Tat-spezifischen Export vermittelt, kombiniert, so konnte eine auffallend starke Zunahme der Sec-abhängigen

Translokation der resultierenden Reportervariante iKQ-A16V+G19V beobachtet werden, welche sich im effizienten Wachstum des Stamms GSJ101 (Δtat) auf MMM und der Bildung roter Kolonien auf MCM widerspiegelt (Zeile 7). Wurde die Reportervariante iKQ-A16V+G19V in einem Stamm exportiert, in welchem beide Translokationssysteme vorlagen, so konnte nur noch eine geringfügige Zunahme der Exporteffizienz nachgewiesen werden. Offensichtlich erfolgt in Anwesenheit beider Transportsysteme der Export von iKQ-A16V+G19V parallel über den Tat- und den Sec-Weg, wobei der Beitrag der Sec-abhängigen Translokation zur exportierten Gesamtproteinmenge höher erscheint. Wurden die beiden Mutationen A16V und T22I, welche im einzelnen Kontext einen strikt Tat-abhängigen Export erlauben, im TorA[KQ]-Signalpeptid miteinander kombiniert, so konnte ein langsames Wachstum des entsprechenden Stamms auf MMM und die Ausbildung eines rosafarbenen Phänotyps auf MCM in Abwesenheit einer Tat-Translokase beobachtet werden (Zeile 8). Lagen hingegen beide Translokationssysteme vor, so konnte eine deutliche Zunahme des Exports nachgewiesen werden. Der entsprechende Stamm GSJ101, welcher die *tat* –Gene und die Reportervariante iKQ-A16V+T22I coexprimierte, wuchs effizient auf MMM und wies eine rote Kolonienfarbe auf MCM auf. Im Falle dieser Reportervariante könnte der Tat-abhängigen Translokation ein deutlich höherer Beitrag zur exportierten Gesamtproteinmenge zugesprochen werden als dem Sec-System.

Zusammenfassend haben diese Ergebnisse gezeigt, dass der Export dieser TorA[KQ]-30aa-Male-Reportervarianten im Allgemeinen parallel über den Tat- und den Sec-Weg erfolgt, wobei die jeweiligen Beiträge der Transportsysteme zur exportierten Gesamtproteinmenge variieren können. Dies impliziert, dass die entsprechenden TorA[KQ]-Signalpeptidvarianten Eigenschaften aufweisen müssen, welche eine produktive Wechselwirkung mit beiden Translokationssystemen erlauben. Aufgrund der Untersuchungen von Cristobal *et al.* ist bekannt, dass die geringere Hydrophobizität von Tat-Signalpeptiden entscheidend für die Tat-Spezifität ist und eine Erhöhung der Hydrophobizität trotz eines intakten „Sec avoidance“ – Motivs in der c-Region zu einer Umleitung des Tat-Substrats in den Sec-Weg führen kann (Cristobal *et al.*, 1999). Aufgrund dessen lag der Verdacht nahe, dass die Gesamthydrophobizität dieser bifunktionaler TorA[KQ]-Signalpeptide durch die Einführung hydrophoberer Aminosäuren in die h-Region einen bestimmten Schwellenwert überschritten haben könnte, ab welchem auch eine Zielsteuerung an die Sec-Translokase erfolgt. In diesem Zusammenhang war jedoch unklar, warum der Austausch von Glycin durch einen Valinrest an der Position 19 einen partiellen Sec-abhängigen Export erlaubt – dieselbe Mutation an der Position 25 hingegen einen strikt Tat-abhängigen Export der entsprechenden Reportervariante vermittelt (siehe Abschnitt 1.3). Um diese Fragen zu untersuchen, wurde zunächst der GRAVY (*grand average of hydropathy*)-Index, wie in Kapitel III Abschnitt 6.1 beschrieben, für eine Auswahl mutierter TorA-Signalpeptide nach Kyte & Doolittle (1982) bestimmt (Tabelle 11). Der GRAVY-Index gibt die mittlere Hydrophobizität bzw. Hydrophilie einer Polypeptidkette an. Hohe positive Werte sind hierbei gleichbedeutend mit einer hohen Hydrophobizität der Aminosäuresequenz, während negative Werte auf einen hydrophilen Charakter hinweisen. Es ist anzumerken, dass der aromatischen Aminosäure Tryptophan auf der

Hydrophobizitätsskala von Kyte & Doolittle (1982) ein negativer Wert zugeordnet wird. Auf den meisten anderen Hydrophobizitätsskalen wie z.B. der Skala von Eisenberg und Weiss, Engelman *et al.* oder Hopp und Woods wird Tryptophan hingegen als eine relativ stark hydrophobe Aminosäure eingeordnet (Eisenberg D., 1982; Engelman *et al.*, 1986; Hopp & Woods, 1981). Infolgedessen sind die berechneten GRAVY-Indizes für die Signalpeptide der Reportervarianten iKQ-G25W (-0,044), iKQ-G28W (-0,044) oder iKQ-G25W+G28W (-0,056) niedriger als der entsprechende Wert für die Negativkontrolle TorA[KQ]-30aa-MaIE (-0,031) und deuten daher fälschlicherweise auf eine Zunahme des hydrophilen anstelle des hydrophoben Charakters der TorA[KQ]-Signalpeptidvarianten hin.

Tabelle 11: Bestimmung des GRAVY-Index nach Kyte & Doolittle (1982) für die TorA[KQ]-Signalpeptide der isolierten bzw. neu konstruierten TorA[KQ]-30aa-MaIE-Reporterproteinvarianten.

Reportervariante	Aminosäuresequenz	GRAVY-Index
TorA[KQ]-30aa-MaIE	MNNNDLFQASKQRFLAQLGGLTVAGMLGPSLLTPRRATA	-0,031
iKQ-A16V	MNNNDLFQASKQRFL <u>V</u> QLGGLTVAGMLGPSLLTPRRATA	0,031
iKQ-Q17L	MNNNDLFQASKQRFLA <u>L</u> LGGLTVAGMLGPSLLTPRRATA	0,156
iKQ-G19V	MNNNDLFQASKQRFLAQL <u>V</u> GLTVAGMLGPSLLTPRRATA	0,087
iKQ-T22I	MNNNDLFQASKQRFLAQLGGL <u>I</u> VAGMLGPSLLTPRRATA	0,103
iKQ-G25V	MNNNDLFQASKQRFLAQLGGLTV <u>V</u> MLGPSLLTPRRATA	0,087
iKQ-G25W	MNNNDLFQASKQRFLAQLGGLTV <u>W</u> MLGPSLLTPRRATA	-0,044
iKQ-G28W	MNNNDLFQASKQRFLAQLGGLTVAGML <u>W</u> PSLLTPRRATA	-0,044
iKQ-A16V+G19V	MNNNDLFQASKQRFL <u>V</u> QL <u>V</u> GLTVAGMLGPSLLTPRRATA	0,149
iKQ-A16V+T22I	MNNNDLFQASKQRFL <u>V</u> QLGGL <u>I</u> VAGMLGPSLLTPRRATA	0,164
iKQ-A16V+G25W	MNNNDLFQASKQRFL <u>V</u> QLGGLTV <u>W</u> MLGPSLLTPRRATA	0,018
iKQ-A16V+G28W	MNNNDLFQASKQRFL <u>V</u> QLGGLTVAGML <u>W</u> PSLLTPRRATA	0,018
iKQ-G25V+G28W	MNNNDLFQASKQRFLAQLGGLTV <u>V</u> ML <u>W</u> PSLLTPRRATA	0,074
iKQ-G25W+G28W	MNNNDLFQASKQRFLAQLGGLTV <u>W</u> ML <u>W</u> PSLLTPRRATA	-0,056

Reporterproteinvarianten, welche auch über den Sec-Weg transloziert werden können, sind grau markiert. Die Aminosäureaustausche in der Sequenz des TorA[KQ]-Signalpeptids der jeweiligen TorA[KQ]-30aa-MaIE-Reportervarianten wurden hervorgehoben (fett und unterstrichen). Positive Hydropathie-Werte: hydrophob; negative Werte: nicht hydrophob.

Die TorA[KQ]-Signalpeptide der Reportervarianten iKQ-Q17L, iKQ-A16V+T22I und iKQ-A16V+G19V weisen die höchsten GRAVY-Indizes auf und sind damit hydrophober als diejenigen von ausschließlich Tat-spezifisch translozierten Reporterproteinen. Dies bekräftigt die zuvor aufgestellte Hypothese, dass für einen Export durch das Sec-System eine bestimmte Gesamthydrophobizität des Signalpeptids erforderlich ist. Im offensichtlichen Widerspruch dazu steht der relativ niedrige GRAVY-Index für das TorA-Signalpeptid der Reportervariante iKQ-G19V (0,087). Obwohl dieses Signalpeptid einen bifunktionalen Charakter besitzt und den Export über beide Translokationssysteme vermittelt, ist der berechnete Wert niedriger als derjenige des TorA[KQ, T22I] Signalpeptids (0,103) bzw. identisch mit dem Hydropathie-Wert für das TorA[KQ, G25V] –Signalpeptid. Da derselbe Aminosäureaustausch an der Position 25 einen strikt Tat-

abhängigen Transport von TorA[KQ]-30aa-MalE bewirkt, müssen neben der Höhe der Gesamthydrophobizität des Signalpeptids noch weitere Faktoren für die Spezifität des Translokationssystems eine Rolle spielen. Um dies zu untersuchen, wurde für die in Tabelle 11 aufgeführten TorA-Signalpeptidvarianten zusätzlich ein Hydropathie-Plot nach Kyte & Doolittle (1982) erstellt, wobei eine Fenstergröße von 9 gewählt wurde (siehe Kapitel III, Abschnitt 6.2). Hierzu wurden die Hydropathie-Werte der Aminosäurereste des TorA-Signalpeptids innerhalb des Fensters gemittelt (y-Wert) und anschließend gegen die Position der Aminosäure aufgetragen, welche sich im Zentrum dieses Fensters befindet (x-Wert). Durch Verschiebung des Fensters um jeweils einen Aminosäurerest kann jeder Position im TorA-Signalpeptid eine mittlere Hydrophobizität zugeordnet werden. Mit Hilfe des Hydropathie-Plots können daher die Regionen des Signalpeptids bestimmt werden, welche hydrophob sind ($y > 0$) und infolgedessen eine α -Helix ausbilden könnten. Im Falle der TorA-Signalpeptidvarianten entspricht der Abschnitt des Graphen, welcher sich oberhalb der x-Achse befindet, daher der h-Region.

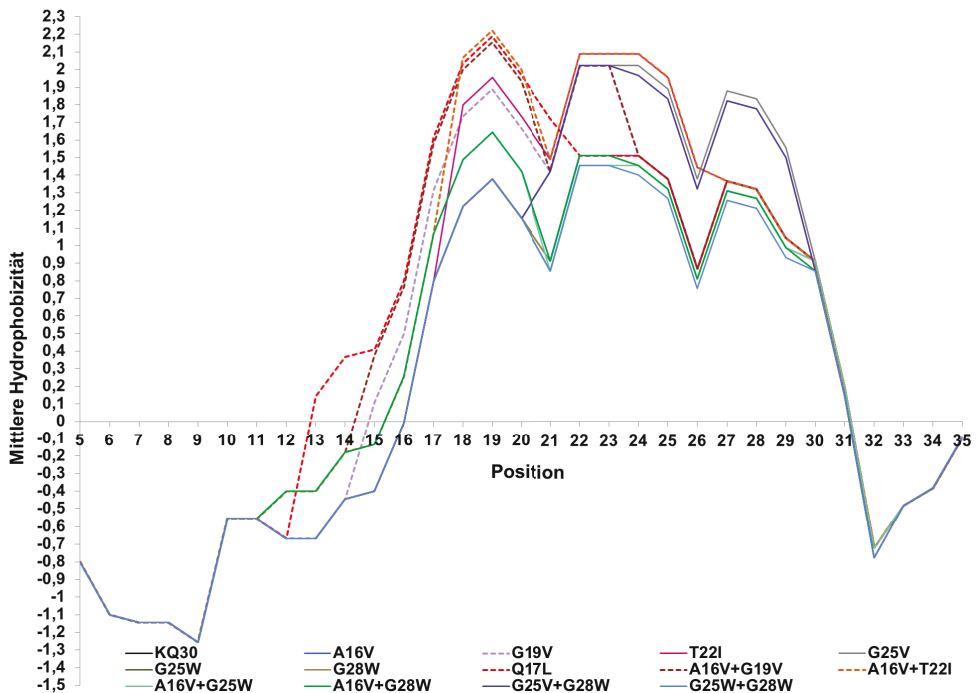


Abbildung 35: Hydropathieplot nach Kyte & Doolittle (1982) der Signalpeptide der isolierten oder neu konstruierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterproteinvarianten. Gewählt wurde eine Fenstergröße von 9. Aufgetragen wurde der gemittelte Hydropathie-Wert der Aminosäurereste innerhalb eines Fensters (y-Achse) gegen die Position der jeweiligen Aminosäure, welche sich im Zentrum dieses Fensters befindet (x-Achse).

Wie in Abbildung 35 zu erkennen ist, zeichnen sich die bifunktionalen Signalpeptide der Reportervarianten iKQ-Q17L, iKQ-A16V+G19V und iKQ-A16V+T22I nicht nur durch die höchsten Werte für die mittlere Hydrophobizität aus (Tabelle 11), sondern weisen - aufgrund der Lage der Mutationen A16V und G19V im extremen N-Terminus der h-Region - zusätzlich eine N-terminale Verlängerung der h-Region um bis zu 3 Aminosäuren auf (gestrichelte Linien). Während im Falle

der meisten Tat-spezifischen TorA-Signalpeptidvarianten die Aminosäurereste zwischen der Position A16 und L31 die h-Region repräsentieren, beginnt die hydrophobe Sequenz in den bifunktionalen Signalpeptiden bereits ab der Position R13 bzw. F14 im Tat-Konsensusmotiv. Zwar liegt in den TorA-Signalpeptiden der strikt Tat-abhängig translozierten Reportervarianten iKQ-A16V+G25W und iKQ-A16V+G28W ebenfalls eine um eine Position verlängerte h-Region vor, jedoch ist die Gesamthydrophobizität in diesen Fällen sehr wahrscheinlich zu gering um auch einen partiellen Export über den Sec-Weg zu erlauben. Zuvor wurde gezeigt, dass das TorA[KQ,G19V]-Signalpeptid einen niedrigeren Hydropathie-Index als das TorA[KQ,T22I]-Signalpeptid aufweist (Tabelle 11). Jedoch konnte auch in diesem Fall eine zusätzliche N-terminale Verlängerung der h-Region beobachtet werden, wodurch die geringere Gesamthydrophobizität möglicherweise kompensiert wird. Offensichtlich spielt neben der Gesamthydrophobizität auch die Länge der h-Region eine Rolle für die Erkennung und Bindung eines Signalpeptids durch die Sec-spezifischen Zielsteuerungsfaktoren und/oder die Sec-Translokase. Aufgrund dieser Ergebnisse kann demnach angenommen werden, dass eine Kombination aus einer Erhöhung der Gesamthydrophobizität und der Verlängerung der h-Region des TorA-Signalpeptids für die beobachtete duale Spezifität einiger TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit h-Region-lokalisierten Suppressormutationen verantwortlich ist.

1.10 Untersuchung der Auswirkung einer Erhöhung der Gesamthydrophobizität auf den Transport einer exportdefekten Variante des neu konstruierten Reporterproteins NapA-30aa-MalE

Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass eine Erhöhung der Gesamthydrophobizität der h-Region des TorA-Signalpeptids das Fehlen eines intakten Zwillingsarginins im Tat-Konsensusmotiv kompensieren kann. Nun stellte sich final die Frage, ob es sich hierbei um ein TorA-spezifisches Phänomen handelt oder ob die Untersuchungsergebnisse über das TorA-Signalpeptid hinaus auch auf andere Tat-Signalpeptide generalisiert werden können.

Um dies zu überprüfen, wurde eine neue Reportervariante konstruiert, in welcher das Signalpeptid sowie die frühe reife Proteinregion der Tat-abhängig translozierten periplasmatischen Nitrat-Reduktase NapA aus *E. coli* an den reifen Proteinanteil von MalE fusioniert wurde.

1.10.1 Konstruktion des neuen Tat-spezifischen Reporterproteins NapA-30aa-MalE

Die Konstruktion des Reporterproteins NapA-30aa-MalE erfolgte wie in Kapitel III, Abschnitt 4.11 beschrieben mittels „cross-over“-PCR. Mit Hilfe des Programms SignalP 4.1¹ wurden die Aminosäurereste A-R-A an den Positionen 29-31 als die Erkennungs- und Bindestelle für die Signalpeptidase vorausgesagt (Abbildung 36 A). Das NapA-Signalpeptid besteht demnach aus 31 Aminosäuren und enthält das Tat-Konsensusmotiv S-R-R-S-F-M-K, welches an der Grenze zwischen der n- und h-Region lokalisiert ist. Die h-Region von NapA ist überwiegend aus

¹ <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

hydrophoben Alaninresten aufgebaut und weist im Vergleich zum TorA-Signalpeptid eine geringere Glycin-Anzahl auf. Die Bestimmung des GRAVY-Index nach Kyte & Doolittle (1982) ergab, dass die h-Region des NapA-Signalpeptids mit einem Wert von 1,56 deutlich hydrophober ist als die h-Region des TorA-Signalpeptids (1,04). In der c-Region liegt nur ein positiv geladener Aminosäurerest vor, welcher als „Sec-avoidance“-Motiv fungieren könnte. Das NapA-Signalpeptid wurde über die ersten 30 Aminosäuren des reifen NapA-Proteins an den reifen Proteinanteil von MalE fusioniert.

Es ist jedoch anzumerken, dass sich in der Literatur konträre Angaben zur Position der Signalpeptidspaltstelle im NapA-Signalpeptid finden. In einigen Arbeiten werden die Aminosäuren G-Q-Q an den Positionen 34-36 als die Signalpeptidspaltstelle beschrieben (Grahll *et al.*, 2012; Stewart *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 1999). Unter der Annahme, dass die Aminosäuresequenz G-Q-Q die Erkennung- und Bindestelle für die Signalpeptidase darstellt, würde das NapA-Signalpeptid demnach aus 36 Aminosäuren bestehen, welche im Falle des konstruierten NapA-30aa-MalE-Reporterproteins über die nächsten 25 Aminosäurereste des reifen NapA-Proteins an den reifen Proteinanteil von MalE fusioniert worden wären (Abbildung 36 B).

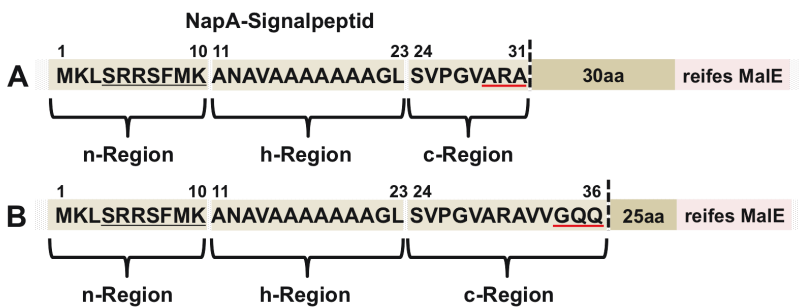


Abbildung 36: Schematischer Aufbau der neu konstruierten Reportervariante NapA-30aa-MalE. (A) Unter der Annahme, dass die Aminosäuresequenz A-R-A an den Positionen 29-31 die Signalpeptidspaltstelle darstellt, weist das native Signalpeptid der periplasmatischen Nitrat-Reduktase NapA aus *E. coli* eine Gesamtlänge von 31 Aminosäuren auf. Dieses wurde über die ersten 30 Aminosäuren des reifen NapA-Proteins (30aa) an den reifen Proteinanteil von MalE (rosa) fusioniert. (B) Schematischer Aufbau des konstruierten NapA-30aa-MalE-Reporterproteins unter der Annahme, dass die Aminosäuresequenz G-Q-Q an den Positionen 34-36 die Signalpeptidspaltstelle darstellt. In diesem Fall weist das Signalpeptid eine Gesamtlänge von 36 Aminosäuren auf. Das Tat-Konsensusmotiv in der n-Region ist schwarz, die Erkennungs- und Bindestelle für die Signalpeptidase rot unterstrichen.

Zur Konstruktion einer exportdefekten Reportervariante wurde im nächsten Schritt das Zwillingsarginin im Tat-Konsensusmotiv durch ein Lysin-Glutamin-Paar mittels ortsgerichteter Mutagenese substituiert. Um zu überprüfen, ob diese Mutation des Zwillingsarginin-Motivs tatsächlich zu einer Blockade des Tat-abhängigen Transports führt, wurde der Export der konstruierten Reporterproteine auf MMM/MCM-Agarplatten sowie auf Proteinebene untersucht. Hierzu wurde der *E. coli*-Stamm GSJ101 ($\Delta malE$, pHSG-TatABCE), welcher die *tat*-Gene exprimiert, mit den entsprechenden Reporterplasmidvarianten transformiert.

In Abbildung 37 A sind die Phänotypen der resultierenden *E. coli*-Stämme auf MMM- und MCM-Agarplatten nach einer Inkubationszeit von 24 h dargestellt. Der *E. coli*-Stamm, welcher die Tat-Translokase und das unveränderte NapA-30aa-MalE-Reporterprotein coexprimierte, wuchs

effizient auf MMM und bildete rote Kolonien auf MCM (Abbildung 37 A, Sektor 1). Dies zeigt, dass das NapA-Signalpeptid grundsätzlich einen Export von MalE ins Periplasma vermitteln kann. Der *E. coli* –Stamm, welcher anstelle des unveränderten NapA-30aa-MalE-Reporterproteins die mutierte NapA[KQ]-30aa-MalE-Reportervariante enthielt, wies im Plattenassay allerdings den gleichen Phänotyp auf (Sektor 2). Die Untersuchung des Exports auf Proteinebene bestätigte, dass beide Reportervarianten mit ähnlicher Effizienz ins Periplasma transportiert werden (Abbildung 37 C, Spuren 1 und 2). Der beobachtete Export der Reportervariante NapA[KQ]-30aa-MalE könnte entweder auf einen nicht vorhandenen Transportdefekt oder auf eine fehlende Tat-Spezifität zurückgeführt werden. Um zu überprüfen, ob die NapA-30aa-MalE-Konstrukte auch Sec-abhängig ins Periplasma transloziert werden können, erfolgte anschließend eine Transformation von *E. coli* GSJ101, welcher keine Plasmid-kodierte Tat-Translokase enthielt, mit den entsprechenden Reporterplasmidvarianten. Wie in Abbildung 37 B zu erkennen ist, wuchsen die resultierenden *E. coli* –Stämme auch in Abwesenheit einer Tat-Translokase signifikant auf MMM und zeichneten sich durch eine rote Kolonienfarbe auf MCM aus (Abbildung 37 B, Sektoren 1 und 2). Offensichtlich bewirkt das NapA-Signalpeptid zumindest teilweise auch eine Zielsteuerung des Reporterproteins in den Sec-Weg. Dies könnte auf die, im Vergleich zum TorA-Signalpeptid, deutlich höhere Hydrophobizität der h-Region sowie das schwächere „Sec-avoidance“ –Signal in der c-Region zurückgeführt werden. Um einen Sec-abhängigen Export der NapA-30aa-MalE-Reportervarianten zu unterbinden, wurde daraufhin das „Sec-avoidance“-Signal in der c-Region beider Reporterproteine verstärkt. Hierzu wurde entweder der Alaninrest an der Position 31 oder die beiden Aminosäuren Glycin und Valin an den Positionen 27 und 28 durch basische Argininreste mittels ortsgerichteter Mutagenese substituiert. Der Export der vier neu konstruierten Reporterproteine NapA[A31R]-30aa-MalE, NapA[G27R+V28R]-30aa-MalE, NapA[KQ,A31R]-30aa-MalE und NapA[KQ,G27R+V28R]-30aa-MalE in An- und Abwesenheit einer Tat-Translokase wurde schließlich mittels Plattenassay sowie auf Proteinebene untersucht. Wie in Abbildung 37 B zu erkennen ist, führte bereits ein zusätzlicher basischer Aminosäurerest an der Position 31 zu einer vollständigen Blockade des Sec-abhängigen Exports. Die *tat* -defizienten *E. coli* –Stämme, welche die NapA-30aa-MalE-Reportervarianten mit intaktem bzw. mutiertem Zwillingsarginin-Motiv und der Mutation A31R bzw. der Doppelmutation G27R+V28R enthielten, wuchsen nicht auf MMM und wiesen einen weissen Phänotyp auf MCM auf (Sektoren 3-6). Lag hingegen eine funktionale Tat-Translokase vor, so konnte ein signifikantes Wachstum der *E. coli* –Stämme, welche die Reportervarianten mit unverändertem Zwillingsarginin-Motiv enthielten, mit Maltose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle beobachtet werden (Abbildung 37 A, Sektoren 3 und 5). Daher kann davon ausgegangen werden, dass der Export von NapA-30aa-MalE ins Periplasma aufgrund der zusätzlichen Mutationen in der c-Region des Signalpeptids nun strikt Tat-spezifisch erfolgt.

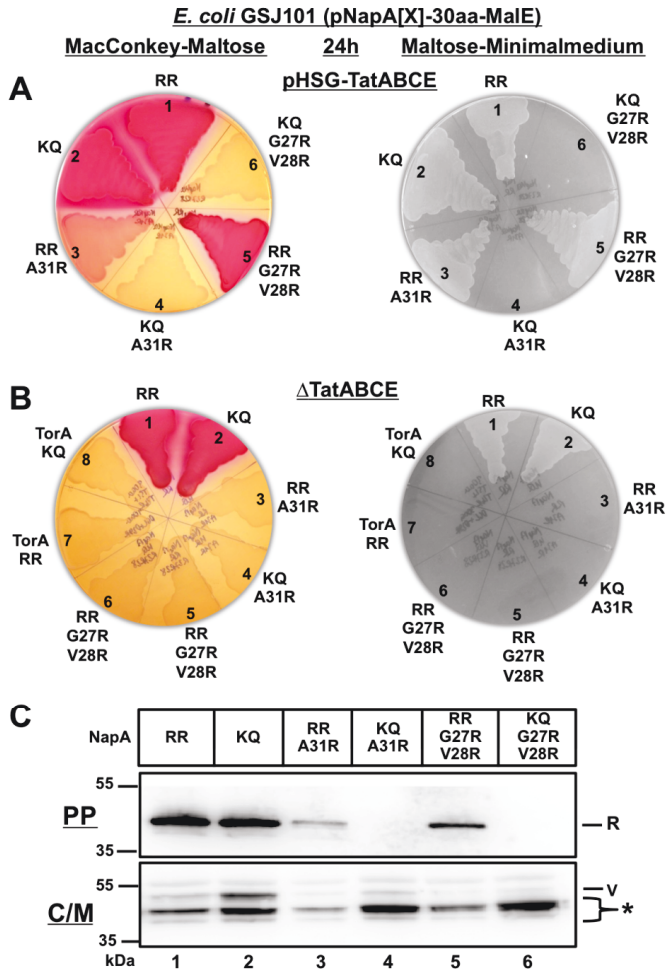


Abbildung 37: Untersuchung des Exports der verschiedenen NapA-30aa-MalE-Reportervarianten auf MMM/MCM-Agarplatten sowie auf Proteinebene in *E. coli* GSJ101. (A, B) Phänotypen von (A) *E. coli* GSJ101 ($\Delta malE$, pHSG-TatABCE) (B) *E. coli* GSJ101 ($\Delta malE$, Δtat) mit den verschiedenen NapA-30aa-MalE-Reportervarianten auf MCM (links) und MMM (rechts) nach einer Inkubationszeit von 24 h. Die jeweiligen Mutationen (X) im NapA-Signalpeptid sind neben den einzelnen Sektoren aufgeführt. RR: NapA-30aa-MalE; KQ: NapA[KQ]-30aa-MalE; RR/KQ X: NapA[RR/KQ,X]-30aa-MalE mit X= A31R bzw. G27R+V28R. (B) Sektoren 7 und 8: Als zusätzliche Kontrollen wurden die Stämme GSJ101 (Δtat), die den Tat-spezifischen unveränderten TorA-30aa-MalE-Reporter (TorA RR) bzw. die Tat-spezifische exportdefekte TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervariante (TorA KQ) erhielten, aufgetragen. (C) Subzelluläre Lokalisation der NapA-30aa-MalE-Reportervarianten nach erfolgter Zellfraktionierung von *E. coli* GSJ101 zur Untersuchung des Exports aus dem Cytosol ins Periplasma auf Proteinebene. Dargestellt sind Proben des Stamms GSJ101 mit Plasmid-kodierter Wildtyp-Tat-Translokase und den verschiedenen NapA-30aa-MalE-Reportervarianten. Die vorliegenden Mutationen im NapA-Signalpeptid der entsprechenden Reportervarianten sind über den jeweiligen Spuren angegeben. Die Zellen wurden mittels osmotischen Schocks in eine Periplasma-Fraktion (PP) und eine kombinierte Cytoplasma/Membran-Fraktion (C/M) getrennt. Anschließend wurden Proben der Zellfraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Für die C/M-Fraktion wurden 10 μ g Gesamtprotein aufgetragen und für die PP-Fraktion 4 μ g. Die Proteine wurden anschließend mittels Western-Blot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Der Nachweis der *malE*-Genprodukte erfolgte durch MalE-spezifische Antikörper. Im Periplasma liegt die reife MalE-Form (R) vor, während in der C/M-Fraktion die oberste Bande das jeweilige MalE-Vorläuferprotein (V) und die darunter liegenden Banden cytoplasmatische Abbauprodukte (*) von MalE repräsentieren. Die Positionen der 35 kDa- und 55 kDa-Markerbande sind am linken Rand der Abbildung markiert. Der Nachweis des Anti-Rabbit IgG Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundäntikörpers erfolgte mit Hilfe des „Amersham ECL™ Western Blotting System“ (GE Healthcare, München). Die Chemilumineszenzsignale wurden mit der „LAS-3000 Mini“ CCD-Kamera (Fujifilm) detektiert.

Wie in Abbildung 37 A zu erkennen ist, führte die Mutation A31R im Vergleich zur Doppelmutation G27R+V28R jedoch zu einer deutlich geringeren Translokationseffizienz des NapA-30aa-MalE-Reporterproteins mit intaktem Zwillingsarginin-Motiv (vgl. Sektor 3 mit 5). Der entsprechende Stamm zeigte zwar nach wie vor ein effizientes Wachstum auf MMM, bildete jedoch pinke anstelle von roten Kolonien auf MCM. Im Einklang mit den beobachteten Phänotypen auf den MMM/MCM-Agarplatten, konnte im Falle des *E. coli* –Stamms, welcher die Tat-Translokase und die NapA[A31R]-30aa-MalE-Reportervariante coexprimierte, eine signifikant geringere Menge an reifem MalE in der PP-Fraktion im Vergleich zu dem Stamm mit dem NapA[G27R+V28R]-30aa-MalE-Reporterprotein nachgewiesen werden (Abbildung 37 C, vgl. Spur 3 mit 5). Unter der Annahme, dass die Aminosäuresequenz A-R-A an den Positionen 29-31 im NapA-Signalpeptid die Erkennungs- und Bindestelle für die Signalpeptidase darstellt, könnte die negative Auswirkung des Aminosäureaustauschs A31R auf die Exporteffizienz von NapA-30aa-MalE auf eine gestörte Prozessierung des Vorläuferproteins zurückgeführt werden. Lag im Tat-Konsensusmotiv des NapA-Signalpeptids eine KQ-Mutation des Zwillingsarginins vor, so konnte weder im Plattenassay noch auf Proteinebene ein signifikanter Export der Reportervarianten NapA[KQ,A31R]-30aa-MalE und NapA[KQ,G27R+V28R]-30aa-MalE ins Periplasma nachgewiesen werden (Abbildung 37 A, Sektoren 4 und 6; C, Spuren 4 und 6). Offensichtlich führt ein KQ-Paar an der Zwillingsarginin-Position im NapA-Signalpeptid, wie auch im TorA-Signalpeptid, zu einer vollständigen Inhibierung des Tat-abhängigen Exports. Aufgrund der höheren Translokationseffizienz wurde für die nachfolgenden Experimente nur noch die Reportervariante NapA[G27R+V28R]-30aa-MalE eingesetzt.

Zusammenfassend ist es gelungen ein neues Reporterprotein zu konstruieren, welches effizient und spezifisch durch die Tat-Translokase ins Periplasma exportiert wird. Die entsprechende exportdefekte Variante eignete sich daher optimal als Ausgangspunkt für die folgende Mutagenesestudie, welche darauf abzielte, den Transport durch Mutationen in der h-Region des NapA-Signalpeptids wiederherzustellen.

1.10.2 Ortsgerichtete Mutagenese des NapA-Signalpeptids zur Wiederherstellung des Exports der NapA[KQ,G27R+V28R]-30aa-MalE-Reportervariante

Um zu überprüfen, ob der Exportdefekt des NapA[KQ,G27R+V28R]-30aa-MalE-Reporterproteins durch eine Erhöhung der Gesamthydrophobizität des NapA-Signalpeptids ebenfalls aufgehoben werden kann, wurden drei verschiedene Reportervarianten konstruiert, welche die Einzelmutation A17V bzw. A19I oder die Doppelmutation A18V+A19V in der h-Region aufweisen. Dabei wurde in allen Fällen ein schwach hydrophober Alaninrest durch die stark hydrophobe Aminosäure Valin oder Isoleucin substituiert, wodurch eine signifikante Zunahme der Hydrophobizität und somit auch der Qualität der h-Region erzielt wurde. Erwartungsgemäß wiesen die mutierten h-Regionen der neu konstruierten Reportervarianten im Vergleich zur unveränderten h-Region höhere Hydropathie-Werte auf (Tabelle 12). Für die h-Region mit der Doppelmutation A18V+A19V wurde ein Hydropathie-Wert von 1,93 bestimmt. Dieser lag deutlich oberhalb des entsprechenden Werts, welcher für die unveränderte (1,56) bzw. mutierte h-Region mit der Einzelsubstitution A17V (1,75)

bzw. A19I (1,77) berechnet wurde. Damit zeichnete sich die h-Region der NapA[KQ,A18V+A19V,G27R+V28R]-Reportervariante durch die höchste Gesamthydrophobizität auf.

Tabelle 12: Bestimmung des GRAVY-Index nach Kyte & Doolittle (1982) für die h-Region des NapA-Signalpeptids der mutierten NapA[KQ,G27R+V28R]-30aa-MalE-Reportervarianten.

Mutation in der h-Region von NapA[KQ,G27R+V28R]-30aa-MalE	Aminosäuresequenz der h-Region (AS 11-23)	GRAVY-Index
-	ANAVAAAAAAGL	1,56
A17V	ANAVAA <u>V</u> AAAAGL	1,75
A19I	ANAVAAAAI <u>A</u> AGL	1,77
A18V+A19V	ANAVAA <u>VV</u> AAGL	1,93

Die Aminosäureaustausche in der h-Region des NapA-Signalpeptids der jeweiligen NapA[KQ,G27R+V28R]-30aa-MalE-Reportervarianten wurden hervorgehoben (fett und unterstrichen). Positive Hydrophathie-Werte: hydrophob; negative Werte: nicht hydrophob.

Zur Überprüfung der Tat-Spezifität wurde der Export der verschiedenen Reportervarianten zunächst im *tat* –defizienten *E. coli* –Stamm GSJ101 mittels Plattenassay untersucht. In allen Fällen konnte nach einer Inkubationszeit von 48 h kein signifikantes Wachstum auf MMM in Abwesenheit einer Tat-Translokase nachgewiesen werden, sodass eine Sec-abhängige Translokation der neu konstruierten Reporterproteine ausgeschlossen werden konnte (nicht gezeigt). Anschließend erfolgte die Transformation des *E. coli* –Stamms GSJ101 ($\Delta malE$, pHSG-TatABCE), welcher die *tat*- Gene exprimiert, mit den verschiedenen Reporterplasmidvarianten. In Abbildung 38 sind die Phänotypen der resultierenden Stämme auf MMM/MCM-Agarplatten nach einer Inkubationszeit von 36 h dargestellt. Die *E. coli* –Stämme, welche die NapA[KQ,G27R+V28R]-30aa-MalE-Reportervariante mit der Einzelmuation A17V bzw. A19I in der h-Region des NapA-Signalpeptids enthielten, wuchsen nicht auf MMM und bildeten weisse Kolonien auf MCM (Sektoren 3 und 4). Diese unterschieden sich phänotypisch nicht von der Negativkontrolle *E. coli* GSJ101 (Sektor 2), welche die Tat-Translokase und die exportdefekte Reportervariante mit unveränderter h-Region coexprimierte. Offensichtlich reichte die Erhöhung der Hydrophobizität durch die Aminosäuresubstitutionen A17V und A19I nicht aus, um den Verlust des Zwillingsarginin-Motivs im NapA-Signalpeptid zu kompensieren. Im Gegensatz hierzu bewirkte die Doppelmutation A18V+A19V einen geringfügigen Export des NapA[KQ,G27R+V28R]-30aa-MalE-Reporterproteins, welcher ein langsames Wachstum des entsprechenden Stamms mit Maltose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle nach 36 h erlaubte (Sektor 5). Die exportierte MalE-Menge reichte jedoch in diesem Fall nicht aus, um einen Farbumschlag auf MCM zu induzieren. Im Vergleich zum TorA[KQ]-Signalpeptid erfordert die Aufhebung des Exportdefekts von NapA[KQ,G27R+V28R]-30aa-MalE offensichtlich eine deutlich stärkere Zunahme der Gesamthydrophobizität der h-Region.

Nichtsdestotrotz zeigen diese Ergebnisse, dass auch im Falle des NapA-Signalpeptids das Fehlen eines intakten Zwillingsarginin-Motivs prinzipiell durch eine Erhöhung der Gesamthydrophobizität der h-Region kompensiert werden kann. Demnach kann angenommen werden, dass die neuen

Erkenntnisse, welche aus der Untersuchung der Rolle der h-Region des TorA-Signalpeptids gewonnen wurden, auch für andere Tat-Signalpeptide zutreffend sind.

***E. coli* GSJ101 (pNapA[X,G27R+V28R]-30aa-MalE, pHSG-TatABCE)**

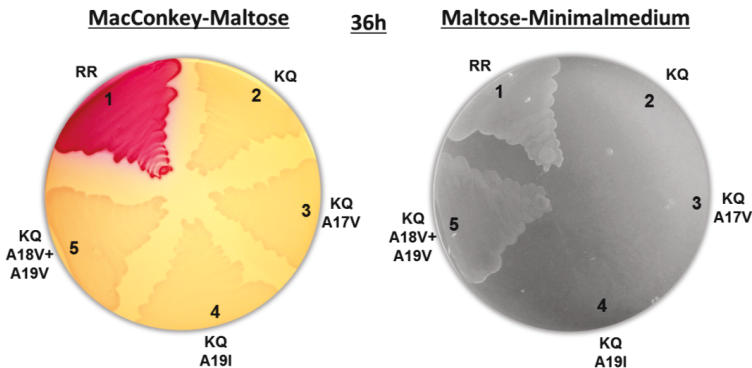


Abbildung 38: Untersuchung des Exports der verschiedenen NapA[KQ,G27R+V28R]-30aa-MalE-Reportervarianten mit h-Region-lokaliserten Mutationen in *E. coli* GSJ101 (ΔmalE, pHSG-TatABCE) auf MMM/MCM-Agarplatten. Dargestellt sind die Phänotypen von *E. coli* GSJ101 (ΔmalE, pHSG-TatABCE) mit den verschiedenen NapA[KQ,G27R+V28R]-30aa-MalE-Reportervarianten, welche Mutationen in der h-Region des NapA-Signalpeptids aufweisen, auf MCM (links) und MMM (rechts) nach einer Inkubationszeit von 36 h. Die jeweiligen Mutationen (X) in der h-Region des NapA-Signalpeptids sind neben den einzelnen Segmenten aufgeführt. RR: NapA[G27R+V28R]-30aa-MalE; KQ: NapA[KQ,G27R+V28R]-30aa-MalE; KQ X: NapA[KQ,X]-30aa-MalE mit X= A17V, A19I bzw. A18V+A19V.

2 Untersuchung der Rolle des frühen reifen Proteinanteils von Tat-Substraten in der Tat-abhängigen Proteintranslokation in *E. coli*

Die zuvor beschriebenen Untersuchungen haben ergeben, dass die h-Region von Tat-Signalpeptiden signifikant zur produktiven Bindung des Signalpeptids an die TatBC-Bindetasche beiträgt und daher, neben dem Tat-Konsensusmotiv, eine weitere wichtige Bindungs determinante von Tat-Vorläuferproteinen an den TatBC-Rezeptorkomplex darstellt. Dadurch, dass das Signalpeptid während der „advanced-stage“-Bindung eine Haarnadel-ähnliche Konformation tief innerhalb der TatBC-Bindetasche einnimmt, wird auch ein Teil des frühen reifen Proteinanteils in die Membran inseriert. Deshalb stellt diese Region des Tat-Vorläuferproteins einen weiteren potentiell funktionell relevanten Bereich dar, welcher ebenfalls direkt in den Bindungsprozess involviert sein könnte. So sollte mit Hilfe verschiedener experimenteller Strategien die Frage geklärt werden, ob und inwiefern der frühe reife Proteinanteil an der produktiven Bindung des Tat-Substrats an den TatBC-Rezeptorkomplex beteiligt ist. Dabei würden nicht zwingend nur direkte Wechselwirkungen zwischen der frühen reifen Proteinregion und der hydrophoben TatBC-Bindetasche innerhalb der Membran in Frage kommen, sondern auch Interaktionen zwischen dem reifen Proteinanteil und den cytoplasmatisch lokalisierten Domänen des TatBC-Rezeptorkomplexes. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde, wie auch schon in den zuvor beschriebenen Experimenten, die Reportervariante TorA-30aa-MalE eingesetzt, in welcher das TorA-Signalpeptid über die ersten 30 Aminosäuren des reifen TorA-Proteins (30aa-Region) an

das reife MalE-Protein fusioniert wurde. Diese 30aa-Region des Reporterproteins stand nun im Fokus des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit.

2.1 Isolierung von Mutationen im frühen reifen Proteinanteil, die den Exportdefekt von TorA[KQ]-30aa-MalE supprimieren

Zur Untersuchung der direkten Beteiligung des frühen reifen Proteinanteils von Tat-Substraten an der produktiven TatBC-Rezeptorbindung sollten Mutationen in der 30aa-Region des Reporterproteins TorA-30aa-MalE isoliert werden, welche den Exportdefekt der Variante TorA[KQ]-30aa-MalE supprimieren. Analog zur Isolierung der h-Region-lokalisierten Suppressormutationen wurden zunächst Mutantenbibliotheken des TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterproteins konstruiert. Hierzu wurden insgesamt vier Mutantenbibliothek erstellt, wobei die Aminosäuresequenz der 30aa-Region einerseits durch zufällige Mutagenese mittels ep-PCR und andererseits durch ortsgerichtete Sättigungsmutagenesen variiert wurde. Die Konstruktion dieser Bibliotheken wurde im Kapitel III, Abschnitt 4.14.2 und 4.14.3 ausführlich beschrieben. Hierbei ist anzumerken, dass in der mittels ep-PCR generierten Mutantenbibliothek neben der 30aa-Region auch die vollständige c-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids sowie die ersten 38 Aminosäuren des reifen MalE-Proteins den mutagenisierten Bereich der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervariante umfassen (siehe Kapitel III, Abschnitt 4.14.2, Abbildung 12). Dadurch wurde die Auftrittswahrscheinlichkeit von Mutationen im „Sec avoidance“-Motiv in der c-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids erhöht, welche den Exportdefekt von TorA[KQ]-30aa-MalE vielmehr durch eine Umleitung in den Sec-Weg supprimieren würden. Dieses Problem konnte durch die gezielte Variation nur bestimmter Aminosäurepositionen innerhalb der 30aa-Region umgangen werden (Bibliothek A, B und C) (siehe Kapitel III, Abschnitt 4.14.3, Abbildung 13).

Zur Selektion von intragenen Suppressormutationen, welche in der 30aa-Region lokalisiert sind und den Exportdefekt von TorA[KQ]-30aa-MalE aufheben, wurde der *malE*-defiziente *E. coli*-Stamm GSJ101 ($\Delta malE$, pHSG-TatABCE), welcher die Plasmid-kodierten *tat*-Gene exprimiert, jeweils mit einer der vier konstruierten Mutantenbibliotheken transformiert und auf MMM-Agarplatten ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 Tagen wurden pro Bibliothek 70 Klone zufällig ausgewählt und auf reproduzierbares Wachstum mit Maltose nach spätestens 48 h überprüft, bevor die enthaltenen Plasmide isoliert und getrennt wurden. Nach Ausschluss spontaner Mutationen im „Sec avoidance“-Motiv wurden die Reporterplasmide, welche für die übrigen Tat-abhängig translozierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterproteinvarianten kodieren, hinsichtlich der für die Suppression des Exportdefekts verantwortlichen Mutationen mittels Sequenzierung analysiert. Insgesamt konnten 54 unterschiedliche Aminosäureaustausche identifiziert werden, welche an vierzehn verschiedenen Positionen innerhalb der 30aa-Region lokalisiert sind (Abbildung 39). Während in der N-terminalen Hälfte der 30aa-Region Austausch gegen jeweils hydrophobere Aminosäuren dominierten, fanden sich in der anderen Hälfte vermehrt auch Substitutionen durch basische Aminosäuren wie Arginin oder Lysin. Überraschenderweise wurden unter der Verwendung der Mutantenbibliothek A, B bzw. C, in

welchen normalerweise nur TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit Einzelmutationen innerhalb der 30aa-Region vorliegen sollten, auch sechs Reporterproteine mit spontanen Doppelmutationen isoliert, welche überwiegend die Positionen T55, T65 und/oder D68 betrafen.

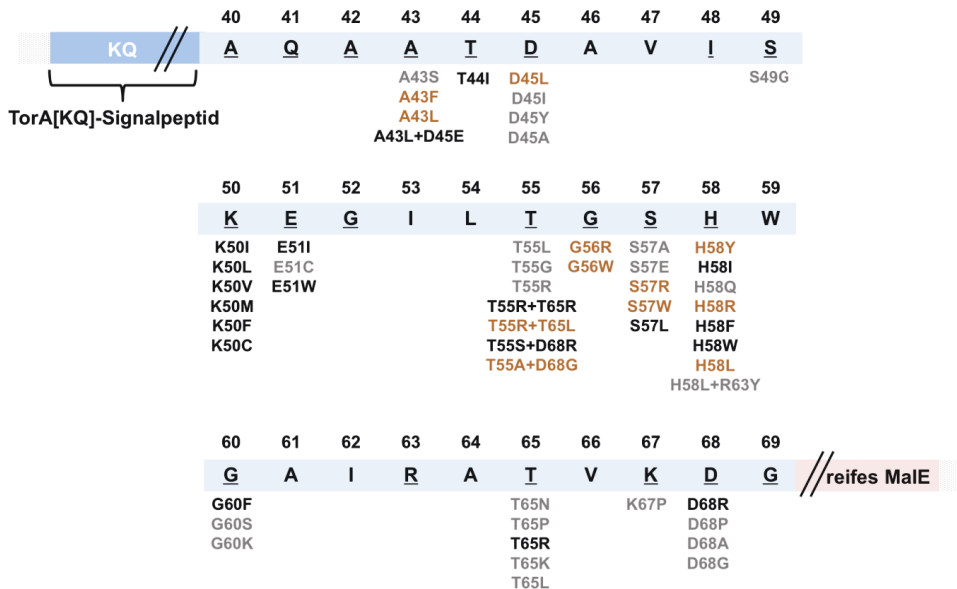


Abbildung 39: Lage der isolierten Einzel- und Doppelmutationen innerhalb der 30aa-Region, welche den Exportdefekt von TorA[KQ]-30aa-MalE supprimieren. Die mutagenisierten Positionen innerhalb der 30aa-Region sind unterstrichen. In Abhängigkeit von der Suppressorstärke wurden die Mutationen in drei Kategorien eingeteilt. **Schwarz:** erlauben signifikantes Wachstum des *E. coli*-Stamms GSJ101, welcher die *tat*-Gene und die entsprechenden mutierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten coexprimiert, auf MMM nach spätestens 24 h; **Braun:** nach spätestens 48 h; **Grau:** nach frühestens 48 h.

Die für die Suppression des Exportdefekts von TorA[KQ]-30aa-MalE verantwortlichen Mutationen wurden anschließend im Hinblick auf die Suppressorstärken mittels Plattenassay analysiert und in drei Gruppen eingeteilt. Achtzehn der insgesamt 54 isolierten Suppressor Mutationen erlaubten ein signifikantes Wachstum der entsprechenden Stämme auf MMM nach spätestens 24 h und wurden der ersten Suppressorgruppe zugeordnet (Schwarz). Die exportierte MalE-Menge reichte jedoch nicht aus, um eine Rotfärbung der Kolonien auf MCM zu induzieren. Dies deutet darauf hin, dass die 30aa-Region-lokaliserten Mutationen im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Aminosäuresubstitutionen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids deutlich geringere Suppressoreigenschaften aufweisen. Dreizehn weitere Mutationen bewirkten ein signifikantes Wachstum mit Maltose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle erst nach einer längeren Inkubationszeit von mindestens 24 bis maximal 48 h und wurden in die zweite Suppressorgruppe eingeordnet (Braun). Die übrigen 23 Suppressor Mutationen wurden der dritten Gruppe zugeordnet (Grau). Die entsprechenden TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten wurden nur geringfügig durch die wildtypische Tat-Translokase exportiert, sodass ein signifikantes Wachstum der jeweiligen *E. coli*-Stämme auf MMM erst nach über 48 h beobachtet werden konnte. Aufgrund

der geringen Suppressorstärke wurde diese Suppressorgruppe in den weiterführenden Analysen nicht berücksichtigt.

Die TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten, welche am effizientesten ins Periplasma exportiert wurden, wiesen Mutationen an der Position K50 auf. Hierbei wurde ein basischer Lysinrest gegen nahezu jede hydrophobere Aminosäure substituiert, wodurch die Gesamthydrophobizität der 30aa-Region in jedem Fall erhöht wurde. Die Einführung hydrophoberer Aminosäurereste an die Positionen T44, D45, E51, S57, H58 und G60 führte ebenfalls zur partiellen Wiederherstellung des Exports von TorA[KQ]-30aa-MalE. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Erhöhung der Gesamthydrophobizität nicht nur des Signalpeptids, sondern auch des frühen reifen Proteinanteils den Verlust des Zwillingsarginin-Motivs prinzipiell kompensieren kann und liefern die ersten Hinweise auf eine direkte Beteiligung des frühen reifen Proteinteils am Bindeprozess an den TatBC-Rezeptorkomplex. Unter der Annahme, dass zumindest die N-terminale Hälfte der 30aa-Region innerhalb der TatBC-Bindetasche lokalisiert ist, könnten die eingeführten hydrophoberen Aminosäuren analog zu den zuvor charakterisierten h-Region-lokalisierten Suppressormutationen durch die Verstärkung der hydrophoben Wechselwirkungen die Gesamtbindeaffinität des Tat-Substrats an den TatBC-Rezeptorkomplex erhöhen. Die Einzelmutationen T55R und D68R sowie die Doppelmutation T55R+T65R führten hingegen basische Argininreste in die C-terminale Hälfte der 30aa-Region ein. In diesen Fällen kann die beobachtete Suppression des Exportdefekts von TorA[KQ]-30aa-MalE daher wahrscheinlich nicht auf eine Erhöhung der Gesamthydrophobizität und die damit verbundene Verstärkung der hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb der TatBC-Bindetasche zurückgeführt werden. Folglich muss eine andere Wirkungsweise dieser Suppressormutationen in Betracht gezogen werden. Für die folgenden Untersuchungen wurden deshalb die Mutationen T44I, D45L, K50L, T55R+T65R, H58I, T65R und D68R aus den ersten beiden Suppressorgruppen ausgewählt, welche sich sowohl in der Suppressorstärke, der Lage innerhalb der 30aa-Region und ggf. auch in ihrer Wirkungsweise voneinander unterscheiden.

2.2 Auswirkung von Kombinationen von 30aa-Region-lokalisierten Suppressormutationen auf den Export von TorA[KQ]-30aa-MalE

Für die Suppressormutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids wurde gezeigt, dass sich Kombinationen dieser Mutationen synergistisch auf die Exporteffizienz von TorA[KQ]-30aa-MalE auswirken. Um zu überprüfen ob dies auch für die Mutationen in der 30aa-Region zutrifft, wurden sechs verschiedene TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit Doppel- bzw. Dreifachmutationen innerhalb der 30aa-Region konstruiert. Hierzu wurden die zuvor ausgewählten Aminosäureaustausche T44I, D45L, K50L, T55R+T65R, T65R und D68R in verschiedenen Kombinationen mittels ortsgerichteter Mutagenese in das pTorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterplasmid eingeführt. Nach Ausschluss einer Sec-abhängigen Translokation der neu konstruierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten wurde der *E. coli*-Stamm GSJ101, welcher die Wildtyp-Tat-Translokase enthielt, mit den verschiedenen pTorA[KQ]-30aa-MalE-Plasmidvarianten transformiert. Anschließend wurde der Export der verschiedenen

Reporterproteine einerseits mittels Plattenassay untersucht. Die beobachteten Phänotypen der jeweiligen *E. coli* –Stämme auf den MMM- und MCM-Agarplatten nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden in Tabelle 13 zusammengefasst. Um die Auswirkung von Kombinationen der 30aa-Region-lokaliserten Mutationen auf die Transporteffizienz von TorA[KQ]-30aa-MalE genauer zu bestimmen, wurde der Export der verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Varianten auch auf Proteinebene in Zellfraktionierungsstudien untersucht. Auf der Basis von mindestens zwei unabhängigen Experimenten wurde für jede Reportervariante die prozentuale Translokationseffizienz bestimmt und in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13: Suppressoreigenschaften von konstruierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit einzelnen oder multiplen Mutationen innerhalb der 30aa-Region, die den Exportdefekt suppressieren können.

	Reportervariante	Mutationen (Y) in der 30aa-Region des TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterproteins	Phänotyp von <i>E. coli</i> GSJ101 (pTorA[KQ]-30aa[Y]-MalE, pHSG-TatABCE) nach 24 h auf		Prozentuale Exporteffizienz [%]
			MMM	MCM	
1	TorA-30aa-MalE	-	+++	rot	100
2	TorA[KQ]-30aa-MalE	-	-	weiss	0,6 ± 0,2
3	iKQ-T44I	T44I	+	weiss	1,8 ± 0,6
4	iKQ-D45L	D45L	(+)	weiss	0,8 ± 0,2
5	iKQ-K50L	K50L	+(+)	hellrosa	3,2 ± 0,6
6	iKQ-T55R+T65R	T55R, T65R	+(+)	hellrosa	2,1 ± 0,3
7	iKQ-T65R	T65R	+	weiss	1,3 ± 0,3
8	iKQ-D68R	D68R	+	weiss	1,6 ± 0,2
9	iKQ-T44I+K50L	T44I, K50L	++	rosa	4,1 ± 0,5
10	iKQ-K50L+T65R	K50L, T65R	++(+)	rot	5,8 ± 0,9
11	iKQ-T44I+T65R	T44I, T65R	++	rosa	4,5 ± 0,2
12	iKQ-D45L+D68R	D45L, D68R	++	rosa	3,9 ± 0,3
13	iKQ-K50L+D68R	K50L, D68R	++(+)	rot	5,7 ± 0,4
14	iKQ-K50L+T55R+T65R	K50L, T55R, T65R	++(+)	rot	5,9 ± 0,3

Beschrieben sind die Phänotypen von *E. coli* GSJ101, welcher die *tat* –Gene und die verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit einzelnen oder multiplen Mutationen innerhalb der 30aa-Region coexprimiert, auf MMM- und MCM-Agarplatten nach einer 24-stündigen Inkubation. Als Positivkontrolle diente *E. coli* GSJ101 (pTorA-30aa-MalE, pHSG-TatABCE), welcher die Wildtyp-Tat-Translokase und den unveränderten TorA-30aa-MalE-Reporter coexprimiert, und als Negativkontrolle der Stamm GSJ101 (pTorA[KQ]-30aa-MalE, pHSG-TatABCE), der die Wildtyp-Tat-Translokase und das exportdefekte Reporterprotein TorA[KQ]-30aa-MalE enthält. iKQ-Y: intragener KQ-Suppressor mit dem Aminosäureaustausch Y innerhalb der 30aa-Region. Phänotypen auf MMM: +++: effizientes Wachstum; ++: moderates Wachstum; +: langsames Wachstum; -: kein signifikantes Wachstum mit Maltose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle (MMM). Phänotypen auf MCM: weisse, hellrosafarbige, rosafarbige oder rote Kolonienfarbe. Zusammengefasst sind zudem die Ergebnisse der Zellfraktionierungsstudien zur Untersuchung des Exports der verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten aus dem Cytosol ins Periplasma auf Proteinebene. Nach der Fraktionierung der Zellen mittels osmotischen Schocks wurden die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels Western-Blot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Die *malE*-Genprodukte in beiden Zellfraktionen wurden schließlich durch MalE-spezifische Antikörper nachgewiesen. Der Nachweis des Anti-Rabbit IgG Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundäntikörpers erfolgte mit Hilfe des „Amersham ECL™ Western Blotting System“ (GE Healthcare, München). Die Chemilumineszenzsignale wurden mit der „LAS-3000 Mini“ CCD-Kamera (Fujifilm) detektiert. Zuletzt wurden die prozentualen Translokationseffizienzen [%] auf der Basis von mind. zwei unabhängigen Experimenten über die Quantifizierung der Chemilumineszenzsignale mit Hilfe der Software AIDA Image Analyzer Version 4.50 (Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt) bestimmt. Aufgeführt sind die jeweiligen Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen.

Wie der Tabelle 13 zu entnehmen ist, konnte der Export von TorA[KQ]-30aa-MalE durch Kombinationen der 30aa-Region-lokaliserten Mutationen in allen Fällen signifikant erhöht werden. Während die *E. coli* –Stämme, welche die Tat-Translokase und die TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit Einzelmutationen innerhalb der 30aa-Region coexprimierten, ein

langsames Wachstum auf MMM und einen weissen Phänotyp auf MCM aufwiesen, wuchsen die Stämme mit den neu konstruierten Reporterproteinen, welche Doppel- und Dreifachmutationen in der 30aa-Region enthielten, vergleichsweise schneller auf MMM und bildeten rosafarbige oder rote Kolonien auf MCM (vgl. Zeilen 3-8 mit Zeilen 9-14). Aufgrund des Plattenassays kann daher von zumindest additiven Effekten der Einzelmutationen auf die Translokationseffizienz von TorA[KQ]-30aa-MalE ausgegangen werden. Die Bestimmung der prozentualen Exporteffizienzen ergab, dass einige der 30aa-Region-lokalisierten Suppressormutationen in Kombination sogar synergistisch bei der Suppression des Exportdefekts von TorA[KQ]-30aa-MalE agieren.

Die Einzelmutationen T44I, D45L und K50L in der N-terminalen Hälfte der 30aa-Region bewirkten einen geringfügigen MalE-Export von 1,8%, 0,8% bzw. 3,2%, welcher nur ein langsames Wachstum der entsprechenden *E. coli* – Stämme auf MMM und die Bildung von weissen bzw. im Falle von K50L hellrosafarbigten Kolonien auf MCM erlaubte (Zeilen 3-5). Wurden diese mit der Doppelmutation T55R+T65R bzw. den Einzelmutationen T65R und D68R in der C-terminalen Hälfte der 30aa-Region kombiniert, welche den Export von TorA[KQ]-30aa-MalE zu 2,1%, 1,3% bzw. 1,6% wiederherstellten (Zeilen 6-8), so konnte eine synergistische Zunahme der Translokationseffizienz von TorA[KQ]-30aa-MalE beobachtet werden. Die resultierenden Reportervarianten iKQ-T44I+T65R, iKQ-D45L+D68R, iKQ-K50L+T65R, iKQ-K50L+D68R und iKQ-K50L+T55R+T65R wurden mit einer Effizienz von 4,5%, 3,9%, 5,8%, 5,7% bzw. 5,9% durch die wildtypische Tat-Translokase exportiert, welche signifikant oberhalb jener Translokationseffizienz liegt, welche sich durch eine alleinige Addition der Beiträge der jeweiligen Einzelmutationen ergeben würde (Zeilen 10-14).

Im Vergleich hierzu konnte bei einer Kombination der Einzelmutationen T44I und K50L, welche jeweils in der N-terminalen Hälfte der 30aa-Region lokalisiert sind, nur ein additiver Effekt auf die Translokation von TorA[KQ]-30aa-MalE beobachtet werden. Während die entsprechenden Reportervarianten iKQ-T44I und iKQ-K50L mit einer Effizienz von 1,8% bzw. 3,2% durch die Wildtyp-Tat-Translokase exportiert wurden, konnte für das neu konstruierte Reporterprotein iKQ-T44I+K50L eine relativ geringfügige Zunahme der Translokationseffizienz auf ca. 4,1% nachgewiesen werden, welche für eine Rotfärbung der Kolonien des entsprechenden *E. coli* – Stamms auf MCM nicht ausreichend ist (vgl. Zeilen 3 und 5 mit Zeile 9). Offensichtlich ist der synergistische Effekt von Kombinationen der isolierten Suppressormutationen auf den Export von TorA[KQ]-30aa-MalE hierbei von ihrer genauen Lage innerhalb der 30aa-Region sowie von ihrer Wirkungsweise abhängig.

Unabhängig davon ob die Mutationen im frühen reifen Proteinanteil additiv oder synergistisch bei der Suppression des Exportdefekts von TorA[KQ]-30aa-MalE agieren, haben die Ergebnisse dieser Untersuchung deutlich gezeigt, dass die 30aa-Region-lokalisierten Mutationen im Falle jeder getesteten Kombination bei der Wiederherstellung des Exports des TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterproteins miteinander kooperierten, da die Translokationseffizienz jeder Reportervariante mit einer Einzelmutation innerhalb der 30aa-Region durch eine zusätzlich eingeführte Suppressormutation weiter gesteigert werden konnte. Diese Beobachtungen stehen im Einklang

mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen der Charakterisierung der Mutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids, welche ebenfalls bei der Suppression des Exportdefekts von TorA[KQ]-30aa-MalE zusammenwirkten.

2.3 Auswirkung von Kombinationen von h-Region-lokalisierten Suppressormutationen mit Suppressormutationen innerhalb der 30aa-Region auf den Export von TorA[KQ]-30aa-MalE

Im vorhergehenden Abschnitt wurde gezeigt, dass die Exporteffizienz des TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterproteins durch Kombinationen von zwei bzw. drei Suppressormutationen innerhalb der 30aa-Region signifikant erhöht werden kann. Als nächstes wurde untersucht, ob die 30aa-Region-lokalisierten Mutationen auch mit den zuvor charakterisierten Suppressormutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids bei der Suppression des Exportdefekts von TorA[KQ]-30aa-MalE kooperieren können. Für die nachfolgenden Analysen wurden die h-Region-lokalisierten Aminosäureaustausche A16V, T22A, G25V und G28W sowie die Doppelmutation G25W+G28W ausgewählt, welche sich sowohl in der Suppressorstärke als auch in ihrer Lage innerhalb der h-Region unterscheiden. Die Mutationen wurden anschließend mittels ortsgerichteter Mutagenese in die pTorA[KQ]-30aa-MalE-Plasmidvarianten eingeführt, in welchen bereits die Aminosäuresubstitution K50L, H58I, T65R bzw. D68R innerhalb der 30aa-Region vorlag. Die neu konstruierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten wurden zunächst im Hinblick auf die Spezifität des Translokationswegs untersucht. Um zu überprüfen ob aufgrund der Kombinationen der h-Region- und 30aa-Region-lokalisierten Mutationen eine Umleitung der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterproteine in den Sec-Weg erfolgt, wurde der *E. coli* –Stamm GSJ101, welcher über keine Plasmid-kodierten *tat* –Gene verfügt, mit den entsprechenden pTorA[KQ]-30aa-MalE-Plasmidvarianten transformiert. Wie in Abbildung 40 A gezeigt, konnte in allen Fällen kein Wachstum der resultierenden Stämme auf MMM und folglich auch keine Rotfärbung der Kolonien auf MCM in Abwesenheit der Tat-Translokase nachgewiesen werden, wodurch ein Export der neu konstruierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten über das Sec-System ausgeschlossen werden konnte. Anschließend wurde der Transport dieser Reporterproteine in dem *E. coli* Stamm GSJ101 (pHSG-TatABCE), welcher eine Plasmid-kodierte Tat-Translokase enthält, untersucht. In Abbildung 40 B-E sind die Phänotypen der verschiedenen *E. coli* –Stämme auf MMM- und MCM-Agarplatten nach einer Inkubationszeit von 24 h dargestellt. Um die Effekte der Kombinationen der Suppressormutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids und im frühen reifen Proteinanteil auf den Export von TorA[KQ]-30aa-MalE genauer zu bestimmen, wurde die Tat-abhängige Translokation der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten ins Periplasma auch auf Proteinebene analysiert. Hierzu wurden auf der Basis von mindestens zwei unabhängigen Zellfraktionierungsexperimenten die prozentualen Exporteffizienzen ermittelt und in Tabelle 14 zusammengefasst.

Wie in Abbildung 40 B gezeigt, konnte anhand des Plattenassays keine signifikante Zunahme des Exports der Reportervariante iKQ-G25W+G28W durch die zusätzliche Mutation K50L in der 30aa-Region festgestellt werden. Die beiden *E. coli* –Stämme GSJ101, welche die Tat-Translokase und

die Reportervariante iKQ-G25W+G28W bzw. iKQ-G25W+G28W+K50L coexprimierten, wuchsen effizient auf MMM und wiesen einen roten Phänotyp auf MCM auf (vgl. Spur 3 mit 5).

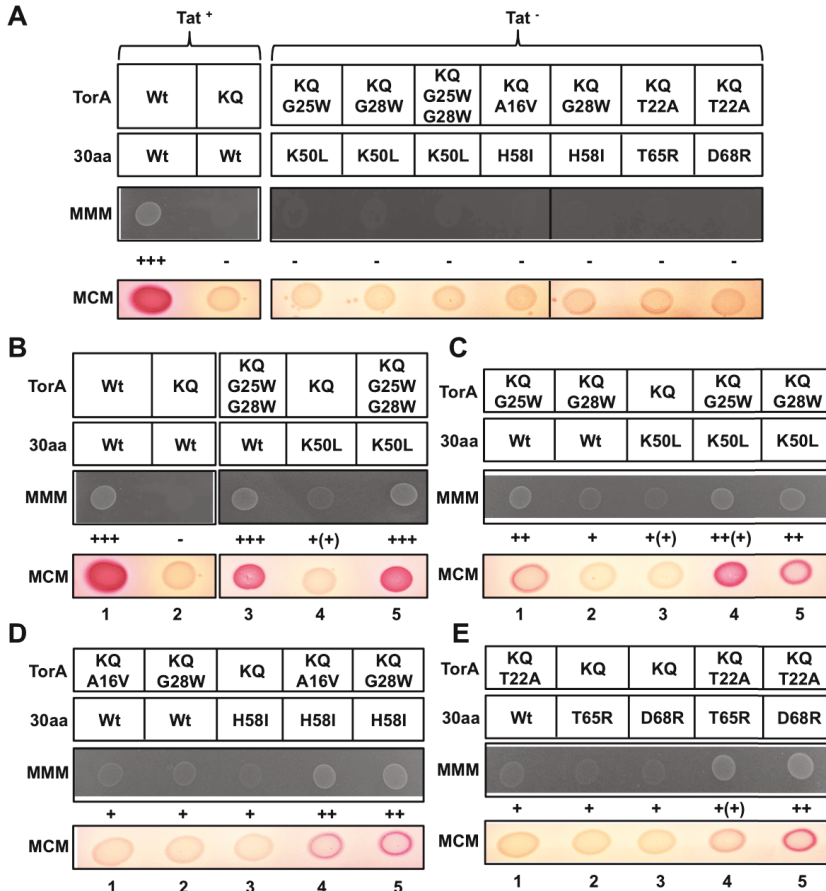


Abbildung 40: Phänotypen von *E. coli* GSJ101 (pHSG-TatABCE) bzw. *E. coli* GSJ101 (Δ tat) mit den verschiedenen TorA-30aa-MalE-Reportervarianten auf MMM und MCM nach einer Inkubationszeit von 24 h. (A) Überprüfung der Tat-Spezifität der neu konstruierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit kombinierten h-Region- und 30aa-Region-lokaliserten Suppressormutationen in *E. coli* GSJ101 (Δ tat). (B-E) Untersuchung des Exports verschiedener TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit Suppressormutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids, der 30aa-Region oder mit Kombinationen der h-Region- und 30aa-Region-lokaliserten Mutationen in *E. coli* GSJ101 (pHSG-TatABCE) mittels MMM/MCM-Plattenassay. Die jeweiligen Mutationen X im TorA-Signalpeptid bzw. Y in der 30aa-Region des TorA[X]-30aa[Y]-MalE-Reporterproteins sind über den jeweiligen Spuren aufgeführt. Als Positivkontrolle diente der Stamm GSJ101, welche die Tat-Translokase und den unveränderten TorA-30aa-MalE Reporter (X=Wt; Y=Wt) coexprimierte, und als Negativkontrolle der Stamm GSJ101 (pHSG-TatABCE), der die exportdefekte TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervariante (X=KQ; Y=Wt) enthielt. Phänotypen auf MMM: +++: effizientes Wachstum; ++: moderates Wachstum; +: langsames Wachstum; -: kein signifikantes Wachstum mit Maltose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle (MMM). Phänotypen auf MCM: weisse, hellrosafarbige, rosafarbige, pinke oder rote Kolonienfarbe.

Die Bestimmung der Exporteffizienz der Reportervariante iKQ-G25W+G28W+K50L zeigte jedoch, dass sich die h-Region-lokalisierte Doppelmutation und die Mutation K50L im frühen reifen Proteinanteil additiv auf den Export von TorA[KQ]-30aa-MalE auswirken, wodurch die Translokationseffizienz von 21,7% auf 24,9% durch den zusätzlichen Aminosäureaustausch K50L, welcher im einzelnen Kontext einen mittleren Export von 3,2% erlaubt, gesteigert werden

konnte (Tabelle 14, Zeilen 7, 8 und 18). Wurde die Mutation K50L jeweils mit einer der beiden h-Region-lokalisierten Aminosäuresubstitutionen G25W bzw. G28W kombiniert, so konnte bereits im Plattenassay eine signifikante Zunahme des Exports von TorA[KQ]-30aa-MalE beobachtet werden. Die *E. coli* –Stämme GSJ101 (pHSG-TatABCE), welche die Reportervariante iKQ-G25W+K50L bzw. iKQ-G28W+K50L enthielten, wuchsen schneller auf MMM und zeigten eine stärkere Rotfärbung der Kolonien auf MCM im Vergleich zu den Stämmen, welche die Reportervarianten mit der entsprechenden Einzelmutation G25W bzw. G28W exprimierten (Abbildung 40 C, vgl. Spuren 4 und 5 mit 1 und 2).

Tabelle 14: Prozentuale Exporteffizienzen verschiedener TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten, welche Suppressormutationen innerhalb der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids, der 30aa-Region oder eine Kombination von h-Region- und 30aa-Region-lokalisierten Mutationen enthalten.

	Reportervariante	Mutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids	Mutationen in der 30aa-Region des TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterproteins	Prozentuale Exporteffizienz [%]
1	TorA-30aa-MalE	-	-	100
2	TorA[KQ]-30aa-MalE	-	-	0,6 ± 0,2
3	iKQ-A16V	A16V	-	1,3 ± 0,4
4	iKQ-T22A	T22A	-	1,0 ± 0,1
5	iKQ-G25W	G25W	-	3,9 ± 0,9
6	iKQ-G28W	G28W	-	1,4 ± 0,5
7	iKQ-G25W+G28W	G25W+G28W	-	21,7 ± 1,5
8	iKQ-K50L	-	K50L	3,2 ± 0,6
9	iKQ-H58I	-	H58I	1,2 ± 0,3
10	iKQ-T65R	-	T65R	1,3 ± 0,3
11	iKQ-D68R	-	D68R	1,6 ± 0,2
12	iKQ-A16V+H58I	A16V	H58I	3,8 ± 0,8
13	iKQ-T22A+T65R	T22A	T65R	3,1 ± 0,2
14	iKQ-T22A+D68R	T22A	D68R	4,4 ± 0,5
15	iKQ-G28W+H58I	G28W	H58I	4,1 ± 0,4
16	iKQ-G25W+K50L	G25W	K50L	6,4 ± 0,5
17	iKQ-G28W+K50L	G28W	K50L	5,1 ± 0,2
18	iKQ-G25W+G28W+K50L	G25W+G28W	K50L	24,9 ± 1,1

Zusammengefasst sind die Ergebnisse der Zellfraktionierungsstudien zur Untersuchung des Exports der verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten aus dem Cytosol ins Periplasma auf Proteinebene. Nach der Fraktionierung der Zellen mittels osmotischen Schocks wurden die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels Western-Blot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Die *malE*-Genprodukte in beiden Zellfraktionen wurden schließlich durch MalE-spezifische Antikörper nachgewiesen. Der Nachweis des Anti-Rabbit IgG Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers erfolgte mit Hilfe des „Amersham ECL™ Western Blotting System“ (GE Healthcare, München). Die Chemilumineszenzsignale wurden mit der „LAS-3000 Mini“ CCD-Kamera (Fujifilm) detektiert. Zuletzt wurden die prozentualen Translokationseffizienzen [%] auf der Basis von mind. zwei unabhängigen Experimenten über die Quantifizierung der Chemilumineszenzsignale mit Hilfe der Software AIDA Image Analyzer Version 4.50 (Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt) bestimmt. Aufgeführt sind die jeweiligen Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen.

Eine Zunahme der Exporteffizienz der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit dem Aminosäureaustausch G25W bzw. G28W im TorA[KQ]-Signalpeptid durch die zusätzliche 30aa-Region-lokalisierte Mutation K50L konnte auch auf Proteinebene bestätigt werden.

Während die Reportervarianten iKQ-G25W und iKQ-G28W mit einer mittleren Effizienz von 3,9% bzw. 1,4% durch die Wildtyp-Tat-Translokase exportiert wurden, konnte für die Reporterproteine iKQ-G25W+K50L und iKQ-G28W+K50L eine Translokationseffizienz von 6,4% bzw. 5,1%

bestimmt werden. Da der Betrag der Exportzunahme in etwa der Exporteffizienz der Reportervariante iKQ-K50L (3,1%) entspricht, kann hierbei von einem additiven Effekt der zusätzlichen 30aa-Region-Mutation auf den Export der beiden Reporterproteine mit einer h-Region-lokalisierten Suppressormutation ausgegangen werden (Tabelle 14, vgl. Zeilen 16 und 17 mit 5, 6 und 8).

Um zu überprüfen ob der additive Effekt von Kombinationen verschiedener Suppressormutationen unabhängig von deren genauen Position innerhalb der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids bzw. der 30aa-Region ist, wurde als nächstes der Export der Reportervarianten iKQ-A16V+H58I und iKQ-G28W+H58I untersucht, in welchen der im extremen N-Terminus bzw. C-Terminus der h-Region liegende Aminosäureaustausch A16V bzw. G28W mit der relativ im Zentrum der 30aa-Region lokalisierten Mutation H58I kombiniert vorlagen. Wie anhand der Phänotypen der entsprechenden *E. coli* –Stämme auf MMM- und MCM-Agarplatten sowie der prozentualen Exporteffizienzen zu erkennen ist, konnte auch im Falle dieser Kombinationen eine zumindest additive Zunahme der Translokationseffizienz der Reportervarianten iKQ-A16V bzw. iKQ-G28W durch die Mutation H58I beobachtet werden (Abbildung 40 D, vgl. Spuren 4 und 5 mit 1 und 2; Tabelle 14, vgl. Zeilen 12 und 15 mit Zeilen 3, 6 und 9). Die mittleren Exporteffizienzen der neu konstruierten Reportervarianten iKQ-A16V+H58I und iKQ-G28W+H58I betrugen 3,8% bzw. 4,1% und waren folglich signifikant höher als die Effizienzen der entsprechenden Reportervarianten mit den h-Region-lokalisierten Einzelmutationen A16V (1,3%) und G28W (1,4%).

Aufgrund dieser Ergebnisse kann angenommen werden, dass Suppressormutationen, welche die Hydrophobizität der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids bzw. des frühen reifen Proteinanteils erhöhen, unabhängig von ihren genauen Lage innerhalb der jeweiligen Regionen bei der Suppression des Transportdefekts von TorA[KQ]-30aa-MalE zusammenwirken.

Um zu untersuchen ob sich Mutationen in der C-terminalen Hälfte der 30aa-Region, welche basische anstelle hydrophoberer Aminosäurereste einführen, in ähnlicher Weise auf den Export der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterproteine mit h-Region-lokalisierten Suppressormutationen auswirken, wurde zuletzt der Export der Reportervarianten iKQ-T22A+T65R und iKQ-T22A+D68R untersucht. Wie in Abbildung 40 E gezeigt, erlaubte der Export von iKQ-T22A, iKQ-T65R und iKQ-D68R nur ein langsames Wachstum der entsprechenden *E. coli* –Stämme auf MMM und die Bildung von weissen Kolonien auf MCM (Spuren 1-3). Wurde die h-Region-lokalisierte Mutation T22A jedoch mit dem Aminosäureaustausch T65R bzw. D68R in der C-terminalen Hälfte der 30aa-Region kombiniert, so konnte eine signifikante Zunahme der Exporteffizienz der Reportervariante iKQ-T22A beobachtet werden, welche sich in einem schnelleren Wachstum der jeweiligen Stämme auf MMM und der Bildung von rosafarbenen bzw. pinken Kolonien auf MCM widerspiegelte (Abbildung 40 E; vgl. Spuren 4 und 5 mit Spur 1). Die Bestimmung der Translokationseffizienzen der Reportervarianten iKQ-T22A+T65R und iKQ-T22A+D68R ergab, dass sich die Kombinationen der Suppressormutationen auch in diesen Fällen zumindest additiv auf den Export von TorA[KQ]-30aa-MalE auswirken. Da die Effizienzen, welche 3,1% (iKQ-T22A+T65R) bzw. 4,4% (iKQ-T22A+D68R) betrugen, hierbei signifikant höher waren als die

Summen der Beiträge der jeweiligen Einzelmutationen T22A (1,0%), T65R (1,3%) bzw. D68R (1,6%), könnte sogar von einer synergistischen Zusammenwirkung dieser Mutationen ausgegangen werden (Tabelle 14, vgl. Zeilen 13 und 14 mit Zeilen 4, 10 und 11). Die letzteren Ergebnisse bestätigen, dass die isolierten Suppressormutationen im frühen reifen Proteinanteil mit den Mutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids bei der Suppression des Exportdefekts von TorA[KQ]-30aa-MalE kooperieren und unterstützen die Hypothese, dass die Mutationen in der 30aa-Region – in ähnlicher Weise wie die h-Region-lokaliserten Suppressormutationen – die Gesamtbindeaffinität des Tat-Substrats an den TatBC-Rezeptorkomplex erhöhen, wodurch der Verlust der wichtigen Bindungskontakte an der Zwillingsarginin-Position zumindest partiell kompensiert wird.

2.4 Untersuchung des Exports der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit 30aa-Region-lokaliserten Suppressormutationen durch die mutierte Tat-Translokase TatABC[L9F]E

Die bisherigen Ergebnisse weisen stark darauf hin, dass – neben dem Signalpeptid - auch der frühe reife Proteinanteil zur Gesamtbindeaffinität des Tat-Substrats an den TatBC-Rezeptorkomplex beiträgt. In diesem Zusammenhang wurde für die 30aa-Region-lokaliserten Mutationen gezeigt, dass diese sowohl miteinander als auch mit den Mutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids bei der Suppression des Exportdefekts von TorA[KQ]-30aa-MalE zusammenwirken, wobei sich die Beiträge der einzelnen Mutationen zur Erhöhung der Gesamtbindeaffinität an die TatBC-Bindetasche zumindest addieren. Für die Suppressormutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids wurde im Abschnitt 1.8.2 zudem eine synergistische Zusammenwirkung mit der Suppressormutation L9F in TatC, welche in den früheren Studien dieser Arbeitsgruppe isoliert wurde (Kreutzenbeck *et al.*, 2007), bei der Wiederherstellung des Transports von TorA[KQ]-30aa-MalE beschrieben. Um zu überprüfen ob dies auch für die 30aa-Region-lokaliserten Suppressormutationen zutrifft, wurde der Export der Reportervarianten iKQ-T44I, iKQ-D45L, iKQ-K50L, iKQ-T65R und iKQ-D68R mit Einzelmutationen sowie der Reporterproteine iKQ-T44I+K50L, iKQ-T44I+T65R und iKQ-D45L+D68R mit Doppelmutationen innerhalb der 30aa-Region durch die mutierte TatABC[L9F]E-Translokase in dem *E. coli* –Stamm GSJ101 untersucht. In Tabelle 15 sind die Phänotypen der verschiedenen Stämme, welche die ausgewählten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten und die wildtypische bzw. mutierte Tat-Translokase coexprimieren, auf MMM- und MCM-Agarplatten nach einer Inkubationszeit von 24 h beschrieben.

Wie auch schon im Abschnitt 1.8.2 gezeigt, vermittelt der Aminosäureaustausch L9F im cytoplasmatischen N-Terminus von TatC bereits einen signifikanten Export des TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterproteins, welcher ein moderates Wachstum des entsprechenden *E. coli* –Stamms auf MMM und die Bildung rosafarbiger Kolonien auf MCM erlaubt (Tabelle 15, Zeile 2, Spalte 4). Anhand der Wachstumsraten auf MMM sowie der Färbung der Kolonien auf MCM der verschiedenen Stämme ist zu erkennen, dass die zusätzliche Suppressormutation im TatBC-Rezeptorkomplex zu einer deutlichen Zunahme des Exports der verschiedenen TorA[KQ]-30aa-

MalE-Reportervarianten führte. Die Einzelmutationen T44I, D45L, K50L, T65R und D68R in der 30aa-Region bewirken nur einen geringfügigen MalE-Export durch die wildtypische Tat-Translokase, welcher sich im langsamen Wachstum der jeweiligen Stämme auf MMM und der Ausbildung eines weissen, im Falle von K50L hellrosafarbigem Phänotyps auf MCM widerspiegelt (Zeilen 3-7, Spalte 3). Wurden die jeweiligen Reportervarianten hingegen durch die mutierte TatABC[L9F]E-Translokase ins Periplasma transloziert, so zeigten die entsprechenden Stämme ein effizientes Wachstum auf MMM und bildeten rote Kolonien auf MCM (Zeilen 3-7, Spalte 4).

Tabelle 15: Phänotypen von *E. coli*-Stämmen GSJ101, welche die verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit Mutationen innerhalb der 30aa-Region in Anwesenheit der wildtypischen bzw. mutierten TatABC[L9F]E-Translokase exprimiert, auf MMM- und MCM-Agarplatten nach einer Inkubationszeit von 24 h.

	Reportervariante	Mutationen (Y) in der 30aa-Region des TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterproteins	Phänotyp von <i>E. coli</i> GSJ101 (pTorA[KQ]-30aa[Y]-MalE, pHSG-TatABCE) nach 24 h auf		Phänotyp von <i>E. coli</i> GSJ101 (pTorA[KQ]-30aa[Y]-MalE, pHSG-TatABC[L9F]E) nach 24 h auf	
			MMM	MCM	MMM	MCM
1	TorA-30aa-MalE	-	+++	rot	+++	rot
2	TorA[KQ]-30aa-MalE	-	-	weiss	++	rosa
3	iKQ-T44I	T44I	+	weiss	+++	rot
4	iKQ-D45L	D45L	(+)	weiss	++(+)	rot
5	iKQ-K50L	K50L	+(+)	hellrosa	++(+)	rot
6	iKQ-T65R	T65R	+	weiss	++(+)	rot
7	iKQ-D68R	D68R	+	weiss	++(+)	rot
8	iKQ-T44I+T65R	T44I, T65R	++	rosa	+++	rot
9	iKQ-D45L+D68R	D45L, D68R	++	rosa	+++	rot
10	iKQ-T44I+K50L	T44I, K50L	++	rosa	+++	rot
	1	2	3	4		

Beschrieben sind die Phänotypen von *E. coli* GSJ101, welcher die verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit Mutationen innerhalb der 30aa-Region und die wildtypische TatABCE- bzw. mutierte TatABC[L9F]E-Translokase coexprimiert, auf MMM- und MCM-Agarplatten nach einer 24-stündigen Inkubation. Als Positivkontrolle diente *E. coli* GSJ101 (pTorA-30aa-MalE, pHSG-TatABCE), welcher die Wildtyp-Tat-Translokase und den unveränderten TorA-30aa-MalE-Reporter coexprimiert, und als Negativkontrolle der Stamm GSJ101 (pTorA[KQ]-30aa-MalE, pHSG-TatABCE), der die Wildtyp-Tat-Translokase und das exportdefekte Reporterprotein TorA[KQ]-30aa-MalE enthält. iKQ-Y: intragener KQ-Suppressor mit dem Aminosäureaustausch Y innerhalb der 30aa-Region. Phänotypen auf MMM: +++: effizientes Wachstum; ++: moderates Wachstum; +: langsames Wachstum; -: kein signifikantes Wachstum mit Maltose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle (MMM). Phänotypen auf MCM: weisse, hellrosafarbige, rosafarbige oder rote Kolonienfarbe.

Um festzustellen ob sich die Kombinationen der Mutationen im frühen reifen Proteinanteil und der TatC-lokalisierten Suppressormutation L9F additiv oder synergistisch auf die Translokationseffizienz des TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterproteins auswirken, wurde der Export der verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit 30aa-Region-lokalisierten Suppressormutationen durch die mutierte TatABC[L9F]E-Translokase auf Proteinebene in Zellfraktionierungsstudien untersucht. Auf der Basis von drei Zellfraktionierungsexperimenten wurde zudem für jede Reportervariante die prozentuale Translokationseffizienz durch die wildtypische bzw. mutierte Tat-Translokase bestimmt (Abbildung 41).

Wie in Abbildung 41 A, B und D gezeigt, konnten im Falle aller TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit Einzelmutationen innerhalb der 30aa-Region detektierbare Proteinmengen in den PP-Fractionen der entsprechenden *E. coli*-Stämme, welche anstelle der wildtypischen

Tat-Translokase die mutierte TatABC[L9F]E-Translokase enthielten, nachgewiesen werden (Abbildung 41 A und B, vgl. Spur 6 bzw. 8 mit Spur 5 bzw. 7; D, vgl. Spur 6 mit Spur 5). Hierbei ist anzumerken, dass im Falle des Reporterproteins iKQ-K50L (und iKQ-T44I+K50L) anstelle einer einzigen Proteinbande, welche dem reifen MalE entspricht, eine Doppelbande in der PP-Fraktion des jeweiligen Stamms zu erkennen ist (Abbildung 41 D, Spur 6 (und 8)). Während die obere Bande dem prozessierten MalE-Protein nach der Abspaltung des Signalpeptids durch die Signalpeptidase entspricht, repräsentiert die untere Bande ein anderes Prozessierungsprodukt von geringerer Größe. Offensichtlich führt die Mutation K50L in der 30aa-Region eine Erkennungsstelle für eine periplasmatische Protease ein, sodass ein Teil des reifen MalE-Proteins nach der Translokation N-terminal verkürzt wird. Zur Bestimmung der prozentualen Exporteffizienz wurden in diesem Fall beide Chemilumineszenzsignale quantifiziert und addiert. Anhand der Exporteffizienzen ist zu erkennen, dass sich die TatC-Mutation L9F hierbei zumeist synergistisch auf den Export der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit den 30aa-Region-lokalisierten Einzelmutationen auswirkte (Abbildung 41 E). Während die Mutation L9F in TatC im einzelnen Kontext einen MalE-Export mit einer mittleren Effizienz von 8,8% vermittelt, konnte die Translokationseffizienz von iKQ-T44I, iKQ-D45L, iKQ-K50L bzw. iKQ-T65R durch die zusätzliche extragene Suppressormutation sogar um 22,9%, 19,0%, 26,4% bzw. 13,6% auf 24,7%, 19,8%, 29,6% bzw. 14,9% gesteigert werden (Abbildung 41 E, vgl. Spuren 5, 7, 9 und 11 mit 6, 8, 10 und 12). Im Falle der Reportervariante iKQ-D68R entsprach die Zunahme der Exporteffizienz von 1,6% (Wildtyp-Tat-Translokase) auf 10,2% (TatABC[L9F]E-Translokase) in etwa dem Beitrag der TatC-lokalisierten Suppressormutation L9F (8,8%), sodass hierbei eher von einem additiven Effekt der extragenen Mutation auf die Translokationseffizienz ausgegangen werden kann (Abbildung 41 E, vgl. Spuren 13 und 14). Die stärkste Zunahme des Exports von TorA[KQ]-30aa-MalE wurde bei einer Kombination der Mutation L9F in TatC und jenen intragenen Suppressormutationen beobachtet, welche einen stark hydrophoben Isoleucin- bzw. Leucinrest an die Position T44 bzw. D45 in der N-terminalen Hälfte der 30aa-Region einführen und den Exportdefekt somit durch eine Erhöhung der Gesamthydrophobizität des frühen reifen Proteinanteils supprimieren. Im Falle von Reportervarianten, in welchen zusätzliche basische Aminosäurereste in die 30aa-Region eingeführt wurden (iKQ-T65R, iKQ-D68R), wirkte sich die zusätzliche Suppressormutation im TatBC-Rezeptorkomplex hingegen weniger stark auf die Translokationseffizienz aus. Wie anhand der Abbildung 41 C und D zu erkennen ist, konnte eine synergistische Zusammenwirkung der TatC-Mutation L9F und den 30aa-Region-lokalisierten Suppressormutationen auch im Falle der Reportervarianten iKQ-T44I+T65R, iKQ-D45L+D68R und iKQ-T44I+K50L mit Doppelmutationen nachgewiesen werden (Abbildung 41 C, vgl. Spur 6 bzw. 8 mit 5 bzw. 7; Abbildung 41 D, vgl. Spur 8 mit 7). Während der Export dieser Reporterproteine durch die wildtypische Tat-Translokase nicht ausreichend war, um auf Proteinebene detektiert werden zu können, konnten im Falle einer Translokation durch die TatABC[L9F]E-Translokase signifikante MalE-Mengen in den PP-Fractionen der entsprechenden *E. coli*-Stämme beobachtet werden.

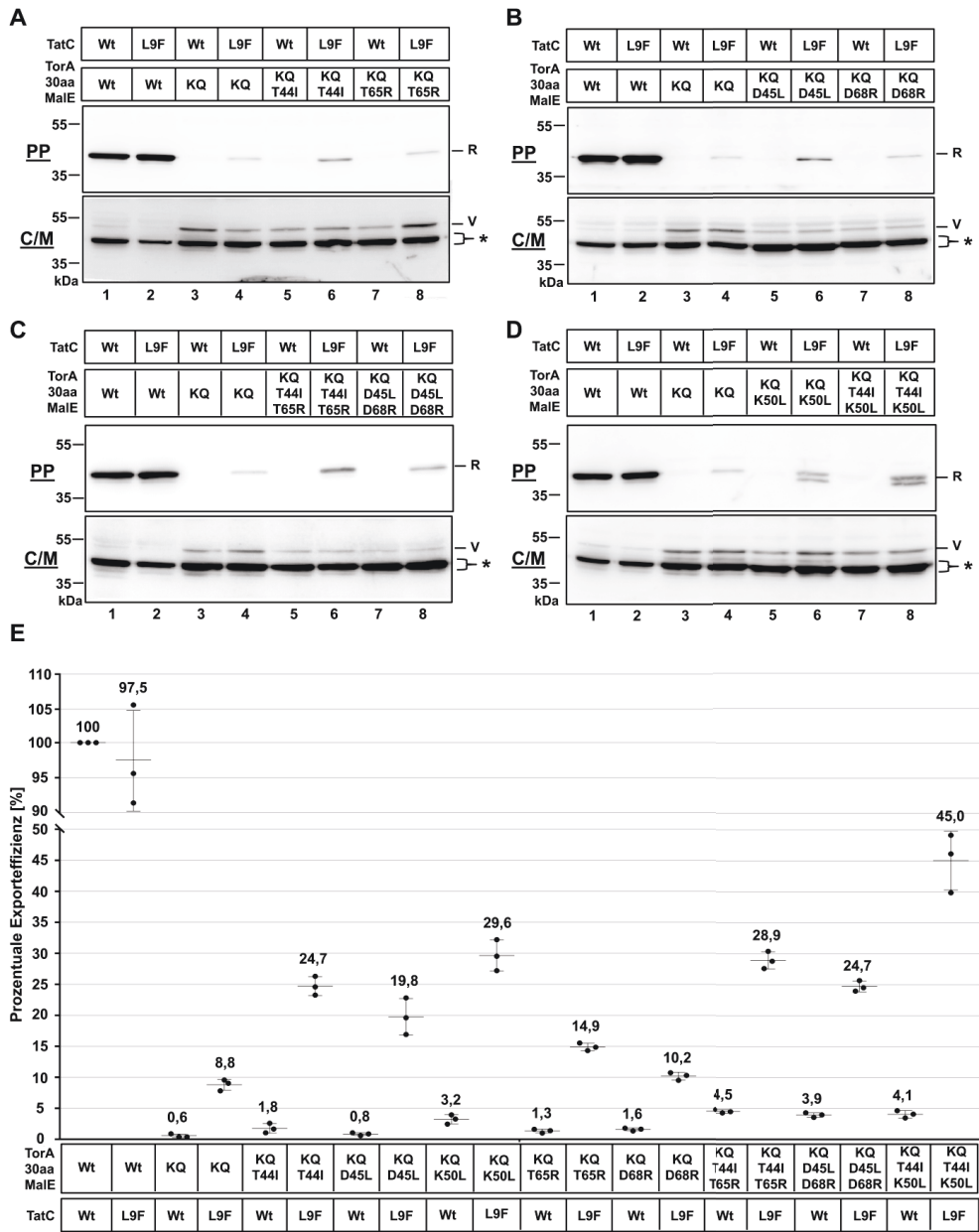


Abbildung 41: Untersuchung des Exports der verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit Einzel- und Doppelmutationen in der 30aa-Region durch die Wildtyp-Tat-Translokase bzw. die mutierte TatABC[L9F]-Translokase in *E. coli* GSJ101. (A-D) Subzelluläre Lokalisation der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit 30aa-Region-lokalisierten Mutationen nach erfolgter Zelfraktionierung von *E. coli* GSJ101 zur Untersuchung des Exports aus dem Cytosol ins Periplasma auf Proteinebene. Dargestellt sind Proben des Stamms GSJ101 mit Plasmid-kodierter Wildtyp-Tat-Translokase (Wt) bzw. mutierter TatABC[L9F]-Translokase (L9F) und den verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten. Die vorliegenden Mutationen im TorA-Signalpeptid und der 30aa-Region in den entsprechenden Reportervarianten sind über den jeweiligen Spuren angegeben. Wt: TorA-30aa-MalE; KQ: TorA[KQ]-30aa-MalE; KQ Y: TorA[KQ]-30aa[Y]-MalE mit (A) Y= T44I bzw. T65R, (B) Y= D45L bzw. D68R, (C) Y= T44I+T65R bzw. D45L+D68R, (D) Y= K50L bzw. T44I+K50L. Als Positivkontrolle diente *E. coli* GSJ101 (pTorA-30aa-MalE, pHSG-TatABCE), welcher die Wildtyp-Tat-Translokase (Wt) und den unveränderten TorA-30aa-MalE-Reporter (Wt) coexprimiert (Spur 1), und als Negativkontrolle der Stamm GSJ101 (pTorA[KQ]-30aa-MalE, pHSG-TatABCE), der die Wildtyp-Tat-Translokase (Wt) und das exportdefekte Reporterprotein TorA[KQ]-30aa-MalE enthält (Spur 3). Die Zellen wurden mittels osmotischen Schocks

in eine Periplasma-Fraktion (PP) und eine kombinierte Cytoplasma/Membran-Fraktion (C/M) getrennt. Anschließend wurden Proben der Zellfraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Für die C/M-Fraktion wurden 10 µg Gesamtprotein aufgetragen und für die PP-Fraktion 4 µg. Die Proteine wurden anschließend mittels Western-Blot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Der Nachweis der *malE*-Genprodukte erfolgte durch *MalE*-spezifische Antikörper. Im Periplasma liegt die reife *MalE*-Form (R) vor, während in der C/M-Fraktion die oberste Bande das jeweilige *MalE*-Vorläuferprotein (V) und die darunter liegenden Banden cytoplasmatische Abbauprodukte (*) von *MalE* repräsentieren. Die Positionen der 35 kDa- und 55 kDa-Markerbande sind am linken Rand der Abbildung markiert. Der Nachweis des Anti-Rabbit IgG Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers erfolgte mit Hilfe des „Amersham ECL™ Western Blotting System“ (GE Healthcare, München). Die Chemilumineszenzsignale wurden mit der „LAS-3000 Mini“ CCD-Kamera (Fujifilm) detektiert. (E) Die prozentualen Translokationseffizienzen [%] wurden in drei unabhängigen Experimenten über die Quantifizierung der Chemilumineszenzsignale mit Hilfe der Software AIDA Image Analyzer Version 4.50 (Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt) bestimmt. Die schwarzen Punktsymbole repräsentieren die Werte aus den jeweils durchgeführten Experimenten, wobei der Mittelwert als Zahl über den Werten ausgeschrieben sowie durch eine horizontale Linie markiert ist. Dargestellt sind zudem die jeweiligen Standardabweichungen als Fehlerbalken.

Die Exporteffizienzen dieser TorA[KQ]-30aa-*MalE*-Varianten durch die mutierte TatABC[L9F]*E*-Translokase betrugen 28,9% (iKQ-T44I+T65R), 24,7% (iKQ-D45L+D68R) bzw. 45,0% (iKQ-T44I+K50L) und waren damit um 24,4%, 20,8% bzw. 40,9% höher als die Translokationseffizienzen, welche bei der Untersuchung des Exports der entsprechenden Reporterproteine durch die wildtypische Tat-Translokase bestimmt wurden: 4,5% (iKQ-T44I+T65R), 3,9% (iKQ-D45L+D68R) bzw. 4,1% (iKQ-T44I+K50L) (Abbildung 41 E, vgl. Spuren 16, 18 und 20 mit 15, 17 und 19). Die stärkste Exportzunahme von TorA[KQ]-30aa-*MalE* wurde somit bei einer Kombination der TatC-Mutation L9F und der Doppelmutation T44I+K50L, welche die Hydrophobizität der 30aa-Region stark erhöht, beobachtet.

Die kombinierten Ergebnisse weisen daher darauf hin, dass Mutationen im TorA[KQ]-30aa-*MalE*-Reporterprotein oder im TatBC-Rezeptorkomplex, welche die hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb der TatBC-Binde tasche erhöhen und sich dadurch auf die Bindeaffinität des Tat-Substrats an den TatBC-Rezeptorkomplex innerhalb der Membran auswirken, stärker bei der Suppression des Exportdefekts von TorA[KQ]-30aa-*MalE* zusammenwirken als Mutationen, welche den Export von TorA[KQ]-30aa-*MalE* auf eine andere Weise durch die Einführung basischer Aminosäurereste supprimieren.

Zusammenfassend wurde im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass der frühe reife Proteinanteil von Tat-Substraten nicht nur eine Passagierdomäne darstellt, welche eine ausschließlich passive Rolle bei der Tat-abhängigen Proteintranslokation spielt, sondern direkt in den Bindeprozess des Tat-Substrats an den TatBC-Rezeptorkomplex involviert ist. Die Identifizierung von Mutationen, welche den Transport des normalerweise exportdefekten TorA[KQ]-30aa-*MalE*-Reporterproteins durch eine Erhöhung der Gesamthydrophobizität (T44I, D45L, K50L, H58I) bzw. der positiven Nettoladung (T65R, D68R) des frühen reifen Proteinanteils wiederherstellen können, liefert einen klaren Hinweis auf eine direkte Wechselwirkung dieser Proteinregion mit der Tat-Translokase. Durch die verstärkte Interaktion zwischen dem frühen reifen Proteinanteil und dem TatBC-Rezeptorkomplex wird sehr wahrscheinlich die Gesamtbindeaffinität des Tat-Substrats an den TatBC-Rezeptorkomplex ausreichend erhöht, um eine produktive Bindung und folglich auch den Tat-abhängigen Export wiederherzustellen. In diesem Zusammenhang zeigten die Kombinationen der 30aa-Region-lokaliserten Mutationen untereinander sowie mit den Mutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids und einer

extragenen Mutation im TatBC-Rezeptorkomplex, dass diese bei der Suppression des Exportdefekts von TorA[KQ]-30aa-MalE miteinander kooperieren und zu einer stärkeren Bindung des mutierten Reporterproteins an die TatBC-Bindetasche führen.

V. Diskussion

Die Tat-Translokase besitzt die besondere Fähigkeit Substrate in vollständig gefalteter Konformation über die Plasmamembran von Bakterien zu transportieren. Diese Eigenschaft unterscheidet dieses Translokationssystem grundlegend vom Sec-System, welches auf den Transport ungefalteter Proteine beschränkt ist. Während das Sec-System inzwischen gut untersucht ist, sind viele Aspekte des Tat-abhängigen Translokationsmechanismus noch unerforscht. Im Fokus dieser Arbeit stand der Bindeprozess von Tat-Vorläuferproteinen an den TatBC-Rezeptorkomplex, welcher einen zentralen Schritt im Translokationsprozess darstellt. Eine erfolgreiche Translokation über die Membran setzt eine produktive Interaktion des Substrats mit dem TatBC-Rezeptorkomplex voraus, welche primär tief in der Membran erfolgt. Die meisten Studien zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Tat-Substraten und dem TatBC-Rezeptorkomplex konzentrierten sich bislang weitgehend auf das Tat-Konsensusmotiv in der n-Region des Tat-Signalpeptids, welches ein hochkonserviertes Zwillingsarginin enthält. Das Zwillingsarginin-Motiv stellt das wichtigste Charakteristikum von Tat-Signalpeptiden dar und ist für die Primärerkenntnis des Signalpeptids durch TatC essentiell (Alami *et al.*, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass Aminosäuresubstitutionen innerhalb des Tat-Konsensusmotivs, insbesondere der beiden Argininreste, generell einen negativen Einfluss auf die Translokationseffizienz des Tat-Vorläuferproteins haben und im Falle drastischer Veränderungen sogar zu einer vollständigen Exportblockade führen können (Alami *et al.*, 2002; Buchanan *et al.*, 2001; Chaddock *et al.*, 1995; Ize *et al.*, 2002b; Stanley *et al.*, 2000; Yahr & Wickner, 2001). Daher stellt das Tat-Konsensusmotiv zweifelsfrei die wichtigste Bindungsdeterminante von Tat-Vorläuferproteinen an den TatBC-Rezeptorkomplex dar. Bislang wurde jedoch nicht untersucht, ob und inwiefern noch weitere Bereiche des Tat-Signalpeptids zur dessen Gesamtbindeaffinität an den TatBC-Rezeptorkomplex beitragen. Aufgrund der tiefen Insertion des Tat-Signalpeptids in die Membran kommen neben der n-Region noch die C-terminal liegenden Bereiche des Signalpeptids sowie der frühe reife Proteinanteil in Frage. In der vorliegenden Arbeit sollte daher konkret die Frage beantwortet werden, ob neben dem Tat-Konsensusmotiv noch andere Regionen des Tat-Vorläuferproteins in die produktive TatBC-Rezeptorbindung involviert sind. Im Speziellen sollte hierbei die Beteiligung der hydrophoben Region des Tat-Signalpeptids sowie der ersten 30 Aminosäuren des frühen reifen Proteinanteils untersucht werden.

1 Untersuchung der Rolle der h-Region von Tat-Signalpeptiden in der Tat-abhängigen Proteintranslokation in *E. coli*

Über die Rolle der h-Region von Tat-Signalpeptiden in der Tat-abhängigen Proteintranslokation ist bislang wenig bekannt. Die meisten Studien zur Untersuchung der genauen Funktion der h-Region beschränken sich weitgehend auf Sec-Signalpeptide. Für den Sec-abhängigen Export wurde u.a. gezeigt, dass eine bestimmte Hydrophobizität der h-Region für die Membraninsertion des Signalpeptids notwendig ist. Die Hydrophobizität des Signalpeptids ermöglicht die Ausbildung einer α -helikalen Konformation, welche sowohl für die Membraninsertion als auch für die

transmembrane Orientierung des Signalpeptids von Bedeutung ist (van Dalen *et al.*, 1999). Zudem wurde für Sec-Signalpeptide bereits eine Mindestlänge der h-Region bestimmt, welche für die Erkennung des Signalpeptids durch SecA und einen effizienten Transport über das Sec-System ausreichend ist (Rusch *et al.*, 1994). In mehreren Studien wurde auch eine positive Auswirkung einer Erhöhung der Gesamthydrophobizität der h-Region auf die Translokationseffizienz eines Sec-abhängigen Vorläuferproteins beobachtet (Doud *et al.*, 1993; Izard *et al.*, 1995; Rusch & Kendall, 1994). Inwiefern sich die Erkenntnisse aus diesen Untersuchungen auf die h-Region von Tat-Signalpeptiden übertragen lassen ist fraglich, da sich die beiden Transportsysteme im Translokationsmechanismus erheblich voneinander unterscheiden.

Es gibt mehrere experimentelle Hinweise, dass auch die h-Region von Tat-Signalpeptiden an der Membranbindung von Tat-Vorläuferproteinen beteiligt ist (Brüser *et al.*, 2003; Hou *et al.*, 2006; Musser & Theg, 2000; Shanmugham *et al.*, 2006). Dabei wird das Signalpeptid des Vorläuferproteins über die hydrophobe Region, welche innerhalb der Membran eine α -helikale Konformation ausbildet, vollständig in die Membran inseriert. Dies erfordert eine bestimmte Mindestlänge bzw. Gesamthydrophobizität der h-Region. Die Bindung von Tat-Substraten an die Membran erfolgt unspezifisch und unabhängig vom Tat-abhängigen Translokationsprozess. Es wird angenommen, dass das Tat-Vorläuferprotein anschließend lateral zur Tat-Translokase diffundiert (Brüser & Sanders, 2003; Brüser *et al.*, 2003; Hou *et al.*, 2006; Musser & Theg, 2000; Shanmugham *et al.*, 2006). Die Gründe für die Membraninsertion von Tat-Signalpeptiden, welche dem Tat-abhängigen Transportzyklus vorausgeht, sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Möglicherweise dient dieser vorgeschaltete Schritt der richtigen Ausrichtung des Tat-Signalpeptids für die nachfolgende Erkennung und Bindung durch den TatBC-Rezeptorkomplex. Zusammenfassend haben diese Studien gezeigt, dass die h-Region des Tat-Signalpeptids in einen Schritt involviert ist, welcher nach der Zielsteuerung des Tat-Vorläuferproteins an die Membran und vor dessen spezifischer Wechselwirkung mit dem TatBC-Rezeptorkomplex erfolgt. Jedoch lieferten diese Untersuchungen keine Hinweise darauf, ob die h-Region auch für den eigentlichen Tat-abhängigen Translokationsprozess eine Rolle spielt.

Allerdings konnte von Henry *et al.* (1997) sowie von Cline & Mori (2001) gezeigt werden, dass für den Transport von Proteinen über den Δ pH-abhängigen Weg in Chloroplasten, welcher mit dem Tat-Weg in Bakterien eng verwandt ist, neben dem Zwillingarginin-Motiv auch eine funktionale h-Region sowie ein bestimmter Grad an Hydrophobizität des Signalpeptids erforderlich sind. Die Einführung eines negativ geladenen Aspartatrests in das Zentrum der h-Region des rekombinanten Tat-Vorläuferproteins DT23, in welchem ein chimäres Signalpeptid an den reifen Teil des Tat-Proteins OE17 fusioniert wurde, führte zu einer vollständigen Blockade des plastidären Δ pH-abhängigen Exports über die Thylakoidmembran (Cline & Mori, 2001; Henry *et al.*, 1997). Im durchgeführten Bindungsassay konnte keine Assoziation dieser mutierten DT23-Variante mit dem cpTatC-Hcf106-Komplex (TatBC-Rezeptorkomplex) nachgewiesen werden (Cline & Mori, 2001). Die strikte Abhängigkeit der cpTatC-Hcf106-Rezeptorbindung vom

Zwillingsarginin sowie einer intakten h-Region zeigt, dass die h-Region von Tat-Signalpeptiden offensichtlich direkt in den Δ pH-abhängigen Transport in Chloroplasten involviert zu sein scheint. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in unserer Arbeitsgruppe bei den ersten Versuchen zur Bestimmung der Rolle der h-Region im bakteriellen Tat-System gemacht (siehe Kapitel IV, Abschnitt 1.1). Analog zu den oben beschriebenen Studien wurde die Aminosäure Valin an der Position 23 in der h-Region des TorA-Signalpeptids durch einen negativ geladenen Aspartatrest substituiert, wodurch die hydrophobe Aminosäuresequenz unterbrochen wurde (Ulfig *et al.*, 2017). Die anschließende *in vivo* Untersuchung des Exports der resultierenden TorA[V23D]-MalE-Reportervariante in *E. coli* bestätigte, dass eine negativ geladene Aminosäure im Zentrum der h-Region auch von der bakteriellen Tat-Translokase nicht toleriert wird und zu einem vollständigen Transportdefekt des Tat-Vorläuferproteins führt. Diese Ergebnisse zeigen, dass auch für den Tat-abhängigen Transport in *E. coli* neben einem intakten Zwillingsarginin-Motiv auch eine funktionale, ununterbrochene h-Region im TorA-Signalpeptid benötigt wird.

Es ist nicht ganz ausgeschlossen, dass durch den negativ geladenen Aminosäurerest innerhalb der h-Region die Membraninsertion des Tat-Signalpeptids vor der ersten spezifischen Wechselwirkung mit der Tat-Translokase blockiert wird. Unter der Annahme, dass die Erkennung und Bindung des Tat-Signalpeptids durch den TatBC-Rezeptorkomplex nur bei partiell membrangebundenen – und nicht frei im Cytosol vorliegenden – Tat-Vorläuferproteinen produktiv erfolgen kann, würde die Mutation V23D in der h-Region bereits den Eintritt des Tat-Substrats in den Tat-abhängigen Transportzyklus verhindern. Allerdings erscheint es unwahrscheinlich dass eine vorherige Membraninsertion für alle Tat-abhängigen Proteine obligatorisch ist. Mehrere Arbeiten haben gezeigt, dass viele Redoxproteine durch spezifische Chaperone (REMPs) auch direkt zum TatBC-Rezeptorkomplex gesteuert werden können (Kostecki *et al.*, 2010; Kuzniatsova *et al.*, 2016; Papish *et al.*, 2003).

Ein anderer Erklärungsversuch des beobachteten Exportdefekts von TorA[V23D]-MalE zieht eine direkte Auswirkung der h-Region-lokalisierten Mutation V23D auf die Gesamtbindeaffinität des TorA-Signalpeptids an den TatBC-Rezeptorkomplex in Betracht. Zuvor wurde von Kreutzenbeck *et al.* (2007) gezeigt, dass die Substitution des Zwillingsarginin-Motivs im TorA-Signalpeptid durch ein Lysin-Glutamin-Paar den Export von TorA-MalE durch die wildtypische *E. coli* Tat-Translokase vollständig inhibiert. Es wurde angenommen, dass der Austausch der beiden Argininreste dabei zu einem Verlust wichtiger Bindungskontakte zwischen dem Tat-Signalpeptid und dem TatBC-Rezeptorkomplex führt, wodurch eine produktive Bindung nicht mehr möglich ist. Ausgehend von dieser exportdefekten TorA-MalE-Variante wurden daraufhin Mutationen im TatBC-Rezeptorkomplex isoliert, welche den Verlust des Zwillingsarginins durch eine direkte oder indirekte Verstärkung der Signalpeptidbindung an die TatBC-Bindetasche kompensieren konnten (Kreutzenbeck *et al.*, 2007). Eine Verringerung der Bindeaffinität aufgrund von Veränderungen innerhalb der Aminosäuresequenz des Signalpeptids könnte auch für die TorA[V23D]-MalE-Reportervariante zutreffen. Deshalb erschien es nicht abwegig, dass Suppressormutationen im TatBC-Rezeptorkomplex in ähnlicher Weise auch den Transport dieser exportdefekten

Reportervariante wiederherstellen könnten. Wie in Ulfig *et al.* (2017) beschrieben, konnten zwar *E. coli* –Stämme isoliert werden, welche mit Maltose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen konnten, jedoch waren die Mutationen, welche für die Suppression des Exportdefekts von TorA[V23D]-MalE verantwortlich waren, überraschenderweise nicht in den *tat* –Genen, sondern im TorA-Signalpeptid lokalisiert. Diese Mutationen führten dazu, dass der negativ geladene Aminosäurerest entweder durch Substitution durch ein neutral geladenes Glycin bzw. hydrophobes Tyrosin oder durch eine Deletion von zwei bzw. sieben Aminosäuren innerhalb der h-Region wieder entfernt wurde. Die isolierten Reportervarianten waren strikt Tat-spezifisch und wurden von der wildtypischen Tat-Translokase signifikant ins Periplasma der entsprechenden *E. coli* –Stämme transportiert. Interessanterweise, konnte dabei eine Korrelation zwischen der Länge der h-Region des Tat-Signalpeptids und der Translokationseffizienz der jeweiligen Reporterproteinvariante beobachtet werden. Eine Reportervariante, in welcher die h-Region des TorA-Signalpeptids um sieben Aminosäuren verkürzt wurde, wurde mit deutlich geringerer Effizienz transloziert als eine Variante, in der lediglich zwei Aminosäuren im Zentrum der h-Region deletiert wurden. Das Ergebnis dieser Studie führte zu der Annahme, dass eine bestimmte Mindestlänge einer durchgehenden hydrophoben Aminosäuresequenz innerhalb des Tat-Signalpeptids für eine produktive Wechselwirkung mit dem TatBC-Rezeptorkomplex benötigt wird. Diese Hypothese, welche eine direkte Beteiligung der h-Region von Tat-Signalpeptiden an der TatBC-Rezeptorbindung impliziert, stellte den Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit dar.

1.1 Mutationen innerhalb der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids können den Exportdefekt von TorA[KQ]-30aa-MalE signifikant supprimieren

Um zu untersuchen, ob die h-Region von Tat-Signalpeptiden direkt zu der Gesamtbindeaffinität an den TatBC-Rezeptorkomplex beiträgt, wurde eine ähnliche Vorgehensweise wie in der Arbeit von Kreutzenbeck *et al.* (2007) beschrieben gewählt. Hierbei sollten Mutationen spezifisch innerhalb der h-Region des TorA-Signalpeptids mit inaktivem KQ-Motiv identifiziert werden, welche den Export einer TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervariante wiederherstellen können. Die Identifizierung solcher Suppressormutationen, die den Verlust des Zwillingsarginin-Motivs kompensieren können, würde einen direkten Beweis für eine Beteiligung der h-Region an der produktiven Bindung des Tat-Vorläuferproteins an den TatBC-Rezeptorkomplex liefern. Wie im Kapitel IV, Abschnitt 1.2 beschrieben, wurde hierfür zunächst eine Mutantenbibliothek des TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterproteins konstruiert. Aufgrund der Lokalisation der nächstgelegenen Restriktionsschnittstellen war der zufällig mutagenisierte Bereich des TorA[KQ]-Signalpeptids nicht nur auf die h-Region beschränkt, sondern umfasste das gesamte Signalpeptid, die ersten 30 Aminosäuren des reifen TorA-Proteins sowie die ersten 38 Aminosäuren des reifen MalE-Proteins. Aus diesem Grund wurde auch eine Reihe von Mutationen identifiziert, welche außerhalb der h-Region positioniert waren. Da diese für die Fragestellung des ersten Teils dieser Arbeit irrelevant waren, wurden diese nicht weiter analysiert. Tatsächlich ist es in dieser Arbeit gelungen in mehreren Selektionen auch acht verschiedene Einzelmutationen ausschließlich

innerhalb der h-Region zu isolieren, welche den Exportdefekt von TorA[KQ]-30aa-MalE signifikant supprimieren können. Während die sechs Mutationen A16V, T22A, T22I, G25V, G25W und G28W einen strikt Tat-spezifischen Export der entsprechenden TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten vermittelten, erlaubten die anderen beiden Aminosäureaustausche G19V und Q17L auch einen partiellen Transport über den Sec-Weg, da die *E. coli* GSJ101 –Stämme, welche diese Reportervarianten enthielten, auch in Abwesenheit einer Tat-Translokase mit Maltose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen konnten. Diese duale Spezifität dieser Reportervarianten für beide Translokationssysteme wird in dem Abschnitt 1.7 diskutiert. Überraschenderweise handelte es sich bei allen isolierten Aminosäureaustauschen ausschließlich um Substitutionen durch jeweils hydrophobere Aminosäurereste, sodass angenommen wurde, dass die Suppression des Exportdefekts von TorA[KQ]-30aa-MalE in diesen Fällen aufgrund einer Erhöhung der Gesamthydrophobizität der h-Region im TorA[KQ]-Signalpeptid erfolgt. In mehreren photochemischen Crosslinking-Studien wurde gezeigt, dass das Tat-Signalpeptid in einer Haarnadel-ähnlichen Konformation tief in die TatBC-Bindetasche inseriert, wobei die h-Region parallel zur Transmembranhelix von TatB ausgerichtet wird (Alami *et al.* 2003; Gerard & Cline, 2006; Maurer *et al.*, 2010; Blümmel *et al.* 2015). Darüber hinaus konnte in der Arbeit von Aldridge *et al.* (2014) durch Cystein-gerichtetes Crosslinking, welches auf der Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen eingeführten Cysteinresten im Tat-Substrat und den Komponenten der Tat-Translokase basiert, auch ein direkter Kontakt zwischen der h-Region eines Δ pH-abhängigen Substrats und dem Periplasma-proximalen Ende der TMH-5 der cpTatC-Komponente des thylakoidalen cpTatC-Hcf106-Rezeptorkomplexes nachgewiesen werden (Aldridge *et al.*, 2014). Aufgrund dieser Positionierung des Signalpeptids innerhalb des TatBC-Rezeptorkomplexes erscheint es nicht abwegig, dass die eingeführten hydrophoberen Aminosäuren in der h-Region die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen dem Signalpeptid und den transmembranen Domänen von TatB bzw. TatC verstärken und auf diese Weise den Verlust der Interaktionen an der Position des Zwillingsarginins im TorA[KQ]-Signalpeptid kompensieren. Die Untersuchung des Exports der Tat-spezifischen mutierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Varianten lieferte zudem erste Hinweise darauf, dass der Grad der Hydrophobizität der eingeführten Aminosäure in die h-Region mit der Translokationseffizienz der entsprechenden Reporterproteinvariante korreliert. Die Aminosäureaustausche T22I und G25V im Zentrum bzw. in der C-terminalen Hälfte der h-Region im TorA[KQ]-Signalpeptid, bei welchen die Aminosäure Threonin bzw. Glycin durch die stark hydrophobe Aminosäure Isoleucin bzw. Valin substituiert wurde, zeigten hierbei die stärksten Suppressoreigenschaften und erlaubten ein effizientes Wachstum der entsprechenden *E. coli* – Stämme GSJ101 (pHSG-TatABCE) auf MMM und die Ausbildung eines roten Phänotyps auf MCM in Anwesenheit einer Plasmid-kodierten Tat-Translokase. Da die maximale Farbtiefe der Kolonien auf MCM bereits ab einer exportierten MalE-Menge von ca. 8% bezogen auf den Export des unveränderten TorA-30-MalE-Reporterproteins (100%) erreicht wird, können bei höheren Exporteffizienzen keine Vergleiche mehr zwischen den einzelnen Reportervarianten ausschließlich anhand der Kolonienfarbe gezogen werden. Daher wurde der Export der

verschiedenen TorA-30aa-MalE-Varianten auch auf Proteinebene untersucht. Über eine Quantifizierung der Chemilumineszenzsignale in den PP- bzw. C/M-Fractionen konnten genauere Rückschlüsse auf die Effizienz des Tat-abhängigen Exports von MalE aus dem Cytosol ins Periplasma gezogen werden. Im Einklang mit den Beobachtungen aus der indirekten Untersuchung des MalE-Exports auf MMM/MCM-Agarplatten, wurden die höchsten Translokationseffizienzen für die TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit der Einzelmutation T22I (iKQ-T22I; 10,9%) bzw. G25V (iKQ-G25V; 13,5%) bestimmt. Wurden die Aminosäuren Threonin und Glycin an diesen Positionen hingegen durch die Aminosäure Alanin bzw. Tryptophan substituiert, welche weniger hydrophob sind als Isoleucin bzw. Valin, konnte eine deutliche Verringerung der Exporteffizienz der jeweiligen Reportervarianten iKQ-T22A bzw. iKQ-G25V sowohl im Plattenassay als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Die *E. coli* – Stämme, welche diese mutierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten in Anwesenheit einer wildtypischen Tat-Translokase exprimierten, wuchsen signifikant langsamer auf MMM und bildeten keine roten Kolonien auf MCM. Die Exporteffizienz von iKQ-T22A (0,9%) bzw. iKQ-G25W (3,7%) war dabei um ca. 10% geringer als die Translokationseffizienz der Reportervariante iKQ-T22I bzw. iKQ-G25V. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass durch die eingeführten Aminosäuren in die h-Region die hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb der TatBC-Bindetasche verstärkt werden, wodurch die Gesamtbindeaffinität des TorA[KQ]-Signalpeptids an den TatBC-Rezeptorkomplex erhöht wird. Dabei wird aufgrund jeder dieser Mutationen der Schwellenwert für die minimale Bindeaffinität, welche für eine produktive Bindung des TorA[KQ]-30aa-MalE benötigt wird, überschritten, sodass ein Export dieses normalerweise Transport-inkompetenten Reporterproteins beobachtet werden kann. Allerdings wird durch den hydrophoben Charakter der jeweils eingeführten Aminosäure die Stärke der hydrophoben Wechselwirkungen zwischen dem TorA[KQ]-Signalpeptid und den hydrophoben transmembranen Domänen des TatBC-Rezeptorkomplexes beeinflusst. Es kann angenommen werden, dass stark hydrophobe Aminosäuren wie Isoleucin oder Valin hierbei eine größere Zunahme der Gesamtbindeaffinität des TorA[KQ]-Signalpeptids an den TatBC-Rezeptorkomplex bewirken als die vergleichsweise schwächer hydrophoben Aminosäurereste Alanin oder Tryptophan. Die Gesamtbindeaffinität des Signalpeptids an die TatBC-Bindetasche steht offensichtlich in einem direkten Zusammenhang mit der Translokationseffizienz der jeweiligen Reportervariante, da mit zunehmender Gesamtbindeaffinität des TorA-Signalpeptids auch ein entsprechender Anstieg des MalE-Exports beobachtet werden konnte.

Neben der Hydrophobizität der eingeführten Aminosäure scheint auch die genaue Position des Aminosäureaustauschs innerhalb der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids eine Rolle für die Translokationseffizienz zu spielen. Eine Substitution von Glycin durch Tryptophan an der Position 25 bewirkte einen signifikant höheren Export von TorA[KQ]-30aa-MalE (iKQ-G25W; 3,7%) als derselbe Aminosäureaustausch an der Position 28 (iKQ-G28W; 1,4%). Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass sich beide Aminosäurepositionen in verschiedenen Abständen zu potentiellen Interaktionsstellen des TatBC-Rezeptorkomplexes befinden und mit diesen daher

mehr oder weniger stark interagieren könnten. Abbildung 42 stellt die Helical-Wheel-Projektion der α -Helix, welche von der h-Region gebildet wird, dar.

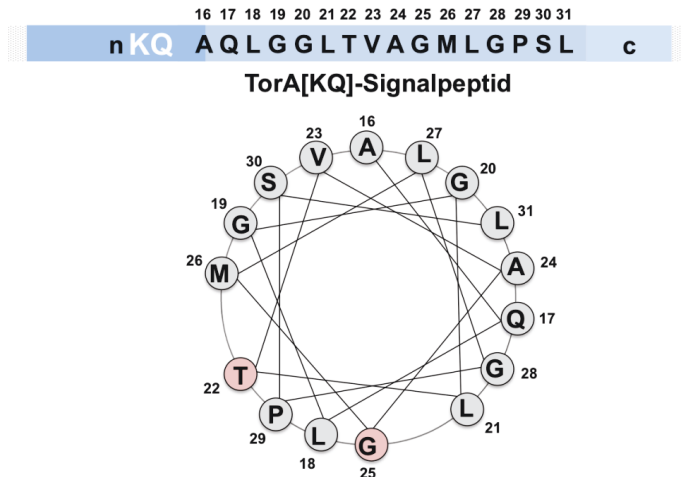


Abbildung 42: Helical-Wheel-Projektion der α -Helix der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids. Die Aminosäurepositionen, an denen die Einführung einer hydrophoben Aminosäure in der stärksten Suppression des Exportdefekts von TorA[KQ]-30aa-MalE resultierte, sind rot markiert.

Es ist wahrscheinlich, dass das Zentrum der h-Region des TorA-Signalpeptids primär mit der TMH von TatB wechselwirkt. Dies wurde in einer Studie von Alami *et al.* (2003) gezeigt, in welcher die Platzierung des photoaktivierbaren Crosslinkers Bpa in der Mitte der h-Region des Sufl-Signalpeptids ausschließlich zur Bildung von UV-abhängigen Sufl-TatB-Addukten führte (Alami *et al.*, 2003). Da die Aminosäureaustausche T22I und G25V, welche relativ zentral innerhalb der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids lokalisiert sind, die höchsten Suppressoraktivitäten aufweisen, könnte angenommen werden, dass die Seite der α -Helix, auf der sich beide Mutationen befinden, demnach am stärksten mit der TMH von TatB während der Substratbindung wechselwirkt. Die Position des Aminosäureaustauschs G28W würde dementsprechend in weiterer Entfernung zur THM von TatB liegen, wodurch die Auswirkung der Einführung einer hydrophoberen Aminosäure auf die Stärke der hydrophoben Wechselwirkungen verringert wird.

Andererseits könnten die geringeren Suppressoreigenschaften der Mutation G28W im Vergleich zu G25W auch auf die unterschiedlichen Konformationen der TorA[KQ]-Signalpeptide der Reportervarianten iKQ-G25W und iKQ-G28W zurückgeführt werden. Bei dieser Substitution wird ein Helix-brechendes Glycin durch einen aromatischen Tryptophanrest ausgetauscht, wodurch die Konformation des Signalpeptids erheblich beeinflusst wird. Sicherlich wirkt sich der Austausch des Glycinrests an der Position 25 in der h-Region daher anders auf die Konformation des TorA[KQ]-Signalpeptids aus als dieselbe Substitution an der Position 28. Infolgedessen ist es möglich, dass sich die Einführung eines hydrophoben Tryptophans in die h-Region aufgrund der veränderten Positionierung des TorA[KQ,G28W]-Signalpeptids innerhalb der TatBC-Bindetasche weniger stark auf die Gesamtbindeaffinität des Signalpeptids auswirkt.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Hydrophobizität des Tat-Signalpeptids den durch die Veränderung des hochkonservierten Zwillingarginins resultierenden Exportdefekt supprimieren und auf diese Weise den Verlust dieses zentralen Motivs im Tat-Signalpeptid kompensieren kann. Die Ergebnisse dieser Untersuchung bestätigen die Beobachtungen vorhergehender Studien, dass das Vorhandensein eines Zwillingarginins im Tat-Signalpeptid keine mechanistische Voraussetzung für den Tat-abhängigen Translokationsprozess darstellt. Insbesondere weisen diese Ergebnisse auf eine wichtige Funktion der h-Region für den Tat-abhängigen Translokationsprozess hin und unterstützen die Hypothese der direkten Beteiligung der h-Region an der produktiven Bindung des Tat-Substrats an den TatBC-Rezeptorkomplex. Der Beitrag der h-Region zur Gesamtbindeaffinität des Signalpeptids könnte auch anhand eines von Kreutzenbeck *et al.* (2007) postulierten Bindemodells erklärt werden. Dieses besagt, dass die Summe aller Bindungskontakte innerhalb des TatBC-Rezeptorkomplexes die Affinität bestimmt mit welcher ein Tat-Signalpeptid binden kann. Während durch Suppressormutationen im TatBC-Rezeptorkomplex die Interaktionen mit dem TorA[KQ]-Signalpeptid von der Seite der Bindetasche aus verstärkt werden konnten (Kreutzenbeck *et al.*, 2007), fügen die in der vorliegenden Arbeit eingeführten hydrophoberen Aminosäuren in der h-Region des Signalpeptids wahrscheinlich von der Substratseite aus zusätzliche Bindungskontakte zu den hydrophoben Domänen des TatBC-Rezeptorkomplexes ein, wodurch die Bindung des Signalpeptids in gleicher Weise stabilisiert wird.

1.2 Kombinationen von h-Region-lokaliserten Suppressormutationen wirken sich synergistisch auf die Exporteffizienz von TorA[KQ]-30aa-MalE aus

Zuvor wurde gezeigt, dass eine Mutation innerhalb der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids, welche die Gesamthydrophobizität erhöht, prinzipiell ausreichend ist um den Exportdefekt der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervariante signifikant zu supprimieren. Allerdings wurde der Export von TorA-30aa-MalE durch die stärkste Suppressoreinzelmutation G25V lediglich zu 13,5% wiederhergestellt. Daher stellte sich die Frage, ob bestimmte Kombinationen dieser Einzelmutationen die Exporteffizienz weiter erhöhen und den Verlust des Zwillingarginins sogar vollständig kompensieren könnten. Insbesondere die Aminosäureaustausche A16V, T22A, G25W oder G28W, welche eher schwache Suppressoreigenschaften aufweisen, bildeten eine geeignete Grundlage für die Untersuchung additiver bzw. synergistischer Effekte. Eine eventuelle Erhöhung der Exporteffizienz durch Kombinationen dieser Mutationen wäre hierbei bereits auf MMM/MCM-Agarplatten deutlich zu erkennen.

Zur Untersuchung der Auswirkung von Kombinationen der Einzelmutationen auf die Translokationseffizienz von TorA[KQ]-30aa-MalE wurden, wie im Kapitel IV, Abschnitt 1.4 beschrieben, durch zielgerichtete Mutagenese neue TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten konstruiert, welche Doppelmutationen in der h-Region aufweisen. Dabei wurden sowohl Mutationen in der C-terminalen Hälfte der h-Region miteinander kombiniert (G25V+G28W,

G25W+G28W) als auch Aminosäureaustausche, welche am weitesten voneinander entfernt an den beiden extremen Termini der h-Region lagen (A16V+G25W, A16V+G28W, T22A+G28W). Da eine Kombination zweier Mutationen, welche jeweils eine hydrophobere Aminosäure in die h-Region einführen, zu einer erheblichen Zunahme der Gesamthydrophobizität des Signalpeptids führt, und in der Arbeit von Cristobal *et al.* (1999) gezeigt wurde, dass eine Erhöhung der Hydrophobizität des Tat-Signalpeptids eine Umleitung des Tat-Substrats in den Sec-Weg bewirken kann, musste die Tat-Spezifität der neu konstruierten Reportervarianten zwingend überprüft werden (Cristobal *et al.*, 1999). Für die Reportervarianten iKQ-G25V+G28W, iKQ-G25W+G28W, iKQ-A16V+G25W, iKQ-A16V+G28W und iKQ-T22A+G28W konnte ein Sec-abhängiger Export mittels Plattenassay ausgeschlossen werden, da die *E. coli* –Stämme, welche diese Reportervarianten in Abwesenheit einer Tat-Translokase exprimierten, nicht mit Maltose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen konnten. Es wurden auch zwei Reportervarianten konstruiert, iKQ-A16V+G19V und iKQ-A16V+T22I, welche über beide Transportsysteme ins Periplasma transloziert werden konnten. Die möglichen Gründe für die duale Spezifität dieser Reporterproteine werden in Abschnitt 1.7 diskutiert.

Die Untersuchung des Exports der strikt Tat-abhängigen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten ergab, dass sich die Kombination zweier Suppressormutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids in jedem Fall synergistisch auf die Exporteffizienz von TorA[KQ]-30aa-MalE auswirkt. Die entsprechenden Stämme zeigten im Plattenassay eine deutliche Zunahme der Wachstumsrate auf MMM und wiesen einen tiefroten Phänotyp auf MCM auf. Diese unterschieden sich phänotypisch nicht von der Positivkontrolle, welche das unveränderte TorA-30aa-MalE-Reporterprotein enthielt. Die Synergie zwischen zwei Mutationen bei der Suppression des Exportdefekts von TorA[KQ]-30aa-MalE konnte auch auf Proteinebene gezeigt und durch die semiquantitative Bestimmung der exportierten MalE-Mengen bestätigt werden. Durch eine Kombination der stärksten Suppressoreinzelmutation G25V, welche einen Export der entsprechenden Reportervariante iKQ-G25V mit einer Effizienz von 13,5% vermittelt, mit der schwachen Suppressormutation G28W (1,4%), konnte der Export von TorA[KQ]-30aa-MalE zu knapp 30% wiederhergestellt werden. Eine alleinige Addition der Beiträge beider Mutationen zur Translokationseffizienz würde eine deutlich geringere Suppression des Exportdefekts bewirken und einen Export von lediglich 15% erlauben. Der synergistische Effekt von Doppelmutationen auf die Exporteffizienz fiel überraschenderweise bei einer Kombination von schwachen Suppressormutationen am stärksten aus. Die Kombination der beiden Mutationen A16V und G28W, welche im einzelnen Kontext nur einen geringfügigen MalE-Export von jeweils 1,4% erlauben, führt zu einem starken Suppressorphänotyp, welcher sich durch ein effizientes Wachstum auf MMM und die Ausbildung tiefroter Kolonien auf MCM auszeichnet. Von allen analysierten mutierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterproteinen verzeichnete die Reportervariante iKQ-A16V+G28W mit einer Translokationseffizienz von 25,2% die stärkste Zunahme des Exports durch die Einführung einer zweiten Suppressormutation in die h-Region.

Eine Kombination von A16V mit der im Vergleich zu G28W signifikant stärkeren Suppressormutation G25W führte entgegen den Erwartungen zu einer wesentlich geringeren Exporteffizienz von 14,7%. Dies kann sehr wahrscheinlich auf die verschiedenen Konformationen der TorA[KQ]-Signalpeptide der Reportervarianten iKQ-A16V+G25W und iKQ-A16V+G28W zurückgeführt werden, welche jeweils unterschiedlich innerhalb der TatBC-Bindetasche positioniert sind. Offensichtlich ist der beobachtete synergistische Effekt von Doppelmutationen auf die Translokationseffizienz von TorA[KQ]-30aa-MalE hierbei nicht nur von der Hydrophobizität der jeweils eingeführten Aminosäuren sondern auch von der Auswirkung der jeweiligen Aminosäureaustausche auf die Konformation des Signalpeptids abhängig.

Da im Falle aller Kombinationen von Einzelmutationen unabhängig von ihrer genauen Lage innerhalb der h-Region eine synergistische Auswirkung auf die Exporteffizienz von TorA[KQ]-30aa-MalE nachgewiesen werden konnte, kann angenommen werden, dass die h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids über ihre komplette Länge zur Gesamtbindeaffinität an den TatBC-Rezeptorkomplex beiträgt. Eine Zusammenwirkung von Mutationen bei der Suppression eines Exportdefekts wurde auch in den vorhergehenden Arbeiten in dieser Arbeitsgruppe beobachtet. Von Kreutzenbeck *et al.* (2007) und Lausberg *et al.* (2012) wurde gezeigt, dass die Mutationen im TatBC-Rezeptorkomplex, welche den Export des TorA[KQ]-MalE-Reporterproteins wiederherstellen können, bei der Suppression des Exportdefekts miteinander kooperieren und im Falle von Kombinationen eine optimierte Anpassung der TatBC-Bindetasche an den veränderten Reporter bewirken, die wiederum in einer drastischen Erhöhung der Translokationseffizienz des Tat-Substrats resultiert. Dies könnte in ähnlicher Weise auch für die Kombinationen der h-Region-lokalisierten Suppressormutationen zutreffen. Während die Einführung eines hydrophoberen Aminosäurerestes in die h-Region die Bindung des Signalpeptids an den TatBC-Rezeptorkomplex ausreichend stabilisiert, um prinzipiell den Transport über die Cytoplasmamembran zu erlauben, bewirkt die zusätzliche Erhöhung der Hydrophobizität aufgrund einer zweiten Substitution eine verbesserte Adaptation des nun wesentlich hydrophoberen Signalpeptids an die hydrophobe TatBC-Bindetasche.

1.3 Die Wiederherstellung des Exports von TorA[KQ]-30aa-MalE erfordert spezifisch die Einführung einer hydrophoberen Aminosäure in die h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids

Wie zuvor beschrieben, lieferte die Untersuchung des Exports der mutierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten erste Hinweise auf eine Korrelation zwischen der Hydrophobizität der eingeführten Aminosäure und der beobachteten Translokationseffizienz der entsprechenden Reportervariante (siehe Abschnitt 1.1). Durch eine ortsgerichtete Mutagenesestudie, in welcher die Aminosäure Glycin an der Position 25 in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids durch verschiedene Aminosäurereste substituiert wurde, wurde diese funktionale Beziehung genauer überprüft.

Darüber hinaus war auffällig, dass bei drei von den insgesamt sechs isolierten Einzelmutationen in der h-Region, welche einen Tat-spezifischen Export von TorA[KQ]-30aa-MalE ermöglichten, ein

Helix-brechender Glycinrest ausgetauscht wurde. Für Sec-Signalpeptide wurde gezeigt, dass der Austausch eines Helix-brechenden Glycins in der h-Region eine Erhöhung der Translokationseffizienz bewirken kann (van Dalen *et al.*, 1999). Die Substitution des Glycins führt zu einer Streckung der α -helikalen Struktur des Signalpeptids, wodurch eine Insertion in die Membran erleichtert wird. Aufgrund dessen könnte angenommen werden, dass die Suppression des Exportdefekts von TorA[KQ]-30aa-MalE durch die Mutationen an den Positionen 25 (G25V, G25W) und 28 (G28W) allein aufgrund der veränderten Konformation des TorA[KQ]-Signalpeptids und nicht aufgrund der erhöhten Gesamthydrophobizität erfolgt. Diese Möglichkeit sollte durch die ortsgerichtete Mutagenesestudie ebenfalls widerlegt werden.

Um direkt zu demonstrieren, dass die Wiederherstellung des Exports von TorA[KQ]-30aa-MalE spezifisch die Einführung eines hydrophoberen Aminosäurerests in die h-Region erfordert, wurde G25 durch weitere hydrophobe sowie hydrophile Aminosäuren substituiert. Zuvor wurde gezeigt, dass geladene Aminosäuren in der h-Region des TorA-Signalpeptids von der *E. coli* Tat-Translokase nicht toleriert werden und zu einem vollständigen Exportdefekt führen können (siehe Kapitel IV, Abschnitt 1.1) (Ulfig *et al.*, 2017). Um auszuschließen, dass ein genereller Exportdefekt aufgrund der Einführung einer geladenen Aminosäure in die h-Region und nicht die verringerte Hydrophobizität an der Position G25 die Ursache für einen fehlenden Export einer TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervariante darstellt, wurden für die Analyse nur neutrale Aminosäuren wie Asparagin, Threonin, Serin, Alanin, Cystein und Methionin ausgewählt. Die durch Selektion isolierte Mutation G25V, welche einen Export von TorA[KQ]-30aa-MalE mit einer Effizienz von ca. 13,5% vermittelt, diente hierbei als Referenz.

Für die Auswahl der Aminosäurereste wurden diverse Hydrophobizitätsskalen herangezogen, welche jeweils auf unterschiedlichen Messmethoden basieren. Trotz der teilweise gravierenden Unterschiede in den Hydropathiewerten, konnte in den meisten Skalen ein genereller Trend in der Verteilung der Aminosäuren beobachtet werden. Demnach wurden den Aminosäuren Alanin, Valin und Methionin im Allgemeinen höhere Hydrophobizitätswerte zugeordnet als Glycin. Für die Aminosäure Cystein konnte gezeigt werden, dass diese trotz der Polarität der Thiol-Gruppe hydrophobe Wechselwirkungen in Mizellen stabilisieren sowie mit hydrophoben Proteinregionen interagieren kann. Aus diesem Grund wird Cystein in den meisten Hydrophobizitätsskalen den hydrophoben Aminosäuren zugeordnet (Heitmann, 1968; Nagano *et al.*, 1999). Aufgrund der Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen wurde daher erwartet, dass nicht nur eine Substitution von Glycin durch Valin den Exportdefekt von TorA[KQ]-30aa-MalE supprimieren kann, sondern auch ein Austausch dieser Aminosäure durch das hydrophobere Alanin, Cystein und Methionin.

Die polaren Aminosäuren Serin und Asparagin konnten hingegen als hydrophile Aminosäurereste betrachtet werden. Demnach sollten die Substitutionen G25S und G25N in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids nicht zur Wiederherstellung des Exports von TorA[KQ]-30aa-MalE führen. Die Auswirkung eines Austauschs von Glycin gegen Threonin auf den Export von TorA[KQ]-30aa-MalE konnte zunächst aufgrund der signifikanten Unterschiede in den Hydrophobizitätswerten zwischen den einzelnen Skalen nicht eindeutig vorhergesagt werden.

Erwartungsgemäß ergab die Untersuchung des Exports der neu konstruierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit den verschiedenen Substitutionen an der Position G25, dass eine Suppression des Exportdefekts von TorA[KQ]-30aa-MalE nur im Falle der Einführung einer hydrophoberen Aminosäure in die h-Region erfolgt. Im Gegensatz zu der Negativkontrolle TorA[KQ]-30aa-MalE mit unveränderter h-Region im TorA[KQ]-Signalpeptid, konnte ein signifikanter Export der Reportervarianten mit den h-Region-lokalisierten Substitutionen G25A, G25C, G25V und G25M sowohl mittels Plattenassay als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Tatsächlich konnte anhand der Unterschiede in der Wachstumsrate auf MMM, der Färbung der Kolonien auf MCM sowie der bestimmten prozentualen Exporteffizienzen hierbei eine direkte funktionale Beziehung zwischen der Hydrophobizität der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids und der Exporteffizienz der entsprechenden Reportervariante demonstriert werden. So führte der Austausch von Glycin durch die stark hydrophoben Aminosäuren Valin und Methionin zu einer deutlich höheren Translokationseffizienz von TorA[KQ]-30aa-MalE als eine Substitution durch die weniger hydrophoben Aminosäurereste Alanin und Cystein. Überraschenderweise, führte der Austausch von Glycin gegen Methionin zu einer noch höheren Exporteffizienz (19,8%) als eine Substitution durch Valin (13,8%). In den meisten Hydrophobizitätsskalen wird Methionin generell als weniger hydrophob als Valin beschrieben, jedoch wird in den Skalen von Argos (Argos *et al.*, 1982) und Engelman *et al.* (Engelman *et al.*, 1986) Methionin oberhalb von Valin in Richtung des hydrophoben Endes des Spektrums platziert. Zudem könnte die längere Kohlenstoffkette von Methionin näher an den Transmembranhelices von TatB/TatC innerhalb der TatBC-Bindetasche lokalisiert sein und daher stärkere hydrophobe Wechselwirkungen erlauben, wodurch die höhere Zunahme der Translokationseffizienz von TorA[KQ]-30aa-MalE erklärt werden könnte.

Im Einklang mit den Hydropathiewerten für die Aminosäuren Serin und Asparagin resultierte die Einführung dieser Aminosäuren an die Position G25 in die h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids nicht in einer Wiederherstellung des Exports von TorA[KQ]-30aa-MalE. Eine fehlende Suppression des Exportdefekts wurde auch im Falle eines Austauschs von Glycin durch Threonin beobachtet. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass der Austausch von Glycin gegen eine beliebige Aminosäure nicht *per se* zu einer Wiederherstellung des TorA[KQ]-30aa-MalE-Exports führt. Hierfür musste spezifisch eine hydrophobere Aminosäure in die h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids eingeführt werden. Aufgrund dessen kann ausgeschlossen werden, die Suppression des Exportdefekts durch Mutationen an der Position G25 lediglich auf dem Austausch der Helix-brechenden Aminosäure Glycin und der damit verbundenen Konformationsänderung (Streckung der α -helikalen Struktur) beruht.

Die Auswirkung der Einführung verschiedener Aminosäuren an die Position G25 in die h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids auf die Exporteffizienz von TorA[KQ]-30aa-MalE könnte anhand eines Modells erklärt werden. Wie in Abbildung 43 gezeigt, wird die TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervariante mit unveränderter h-Region im TorA[KQ]-Signalpeptid nicht durch die wildtypische Tat-Translokase exportiert (0% Exporteffizienz).

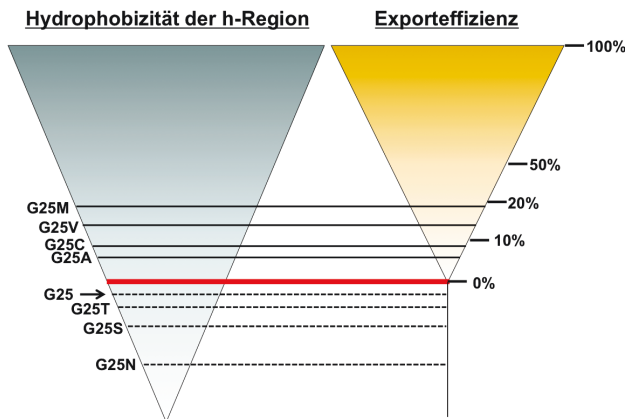


Abbildung 43: Schematische Darstellung der Auswirkung von Mutationen an der Position G25 in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids auf die Exporteffizienz des TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterproteins. Dargestellt ist ein funktionaler Zusammenhang zwischen der Hydrophobizität der eingeführten Aminosäure (N, S, T, A, C, V, M) an der Position G25 und der Exporteffizienz der entsprechenden mutierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporter-variante. Die rote Linie markiert den Schwellenwert für die minimale Bindeaffinität, welche für eine produktive Bindung des Signalpeptids an den TatBC-Rezeptorkomplex erforderlich ist. Die Position der Negativkontrolle TorA[KQ]-30aa-MalE mit unverändertem Glycinrest an der Position 25 in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids ist durch einen Pfeil markiert.

Es wird angenommen, dass bei diesem exportdefekten Reporterprotein die Gesamtbindeaffinität des TorA[KQ]-Signalpeptids an die TatBC-Bindetasche aufgrund der Substitution des Zwillingsarginins durch ein KQ-Paar so stark verringert wird, dass der Schwellenwert für die minimale Bindeaffinität (rote Linie), welche für eine produktive Bindung des Signalpeptids an den TatBC-Rezeptorkomplex erforderlich ist, unterschritten wird. Wird der native Glycinrest in der h-Region durch eine hydrophobere Aminosäure substituiert, so werden zusätzliche hydrophobe Wechselwirkungen innerhalb der TatBC-Bindetasche eingeführt, wodurch der Verlust der Bindungskontakte an der Position des Zwillingsarginins kompensiert und die Bindung des TorA[KQ]-Signalpeptids an den TatBC-Rezeptorkomplex verstärkt wird. Da hierbei der kritische Schwellenwert für die Gesamtbindeaffinität, welcher für eine produktive Bindung erreicht werden muss, überschritten wird, wird der Export von TorA[KQ]-30aa-MalE wiederhergestellt (Exporteffizienz > 0%). Es ist davon auszugehen, dass die Stärke einer hydrophoben Interaktion zwischen Aminosäureresten mit dem Grad der Hydrophobizität der jeweiligen Aminosäuren zunimmt. Demnach bewirkt die Einführung stark hydrophober Aminosäuren in die h-Region eine höhere Zunahme der Gesamtbindeaffinität des TorA[KQ]-Signalpeptids an die hydrophobe TatB-Bindetasche als entsprechende Substitutionen durch schwächer hydrophobe Aminosäurereste. Unter der Annahme, dass eine höhere Gesamtbindeaffinität des Signalpeptids zu einem effizienteren Export führt, kann die beobachtete Korrelation zwischen der Hydrophobizität der an die Position G25 eingeführten Aminosäuren und der Translokationseffizienz der entsprechenden TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten erklärt werden. Die Ergebnisse aus dieser Studie unterstreichen daher die Bedeutung der Hydrophobizität der h-Region für die produktive Bindung des Tat-Signalpeptids an den TatBC-Rezeptorkomplex und folglich für die erfolgreiche Translokation des Tat-Substrats über die Membran.

1.4 Eine Erhöhung der Hydrophobizität des nativen TorA-Signalpeptids führt zu keiner Verbesserung des Exports von TorA-30aa-MalE

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse erschien es nicht abwegig, dass eine Erhöhung der Hydrophobizität der h-Region des TorA-Signalpeptids auch eine positive Auswirkung auf die Exporteffizienz des TorA-30aa-MalE-Reporters mit unverändertem Zwillingssarginin-Motiv haben könnte. Um eine Auswirkung hydrophoberer Aminosäurereste in der h-Region des nativen TorA-Signalpeptids auf den Export von TorA-30aa-MalE zu untersuchen, wurden die im Abschnitt 1.3 beschriebenen Substitutionen an der Position G25 in den unveränderten TorA-30aa-MalE-Reporter eingeführt. Entgegen den Erwartungen ergab die Untersuchung des Exports der neu konstruierten TorA-30aa-MalE-Reportervarianten, dass eine Erhöhung der Hydrophobizität der h-Region durch die Einführung eines hydrophoberen Alanin-, Cystein-, Valin-, oder Methioninrests anstelle des nativen Glycins nicht zur Verbesserung des Exports von TorA-30aa-MalE führt. Stattdessen konnte vielmehr eine eher negative Auswirkung dieser Veränderungen innerhalb der h-Region auf die Exporteffizienz von TorA-30aa-MalE beobachtet werden. Die prozentualen Exporteffizienzen, welche anhand von drei unabhängigen Zellfraktionierungsexperimenten bestimmt wurden, schwankten hierbei um Mittelwerte zwischen 91 und 96%, und lagen damit tendenziell unterhalb der Translokationseffizienz des unveränderten TorA-30aa-MalE-Reporterproteins (100%). Substitutionen des nativen Glycins durch hydrophilere Aminosäuren bewirkten ebenfalls eine signifikante Verringerung der Exporteffizienz, wobei ein Austausch von Glycin durch den stark hydrophilen Asparaginrest den Export von TorA-30aa-MalE am stärksten reduzierte.

Es kommen mehrere Gründe in Frage, warum die Mutationen in der h-Region, welche die Hydrophobizität und damit auch die Gesamtbindeaffinität des nativen TorA-Signalpeptids an den TatBC-Rezeptorkomplex erhöhen, keine Zunahme der Exporteffizienz von TorA-30aa-MalE bewirken. In Abbildung 44 wird anhand eines Modells eine mögliche Auswirkung der verschiedenen Aminosäuresubstitutionen in der h-Region auf die Bindeaffinität des TorA-Signalpeptids und folglich auch auf die Exporteffizienz des unveränderten TorA-30aa-MalE-Reporterproteins erklärt.

Dieses Modell setzt voraus, dass ein kritischer Schwellenwert für die Gesamtbindeaffinität zwingend überschritten werden muss, damit die Bindung des Signalpeptids an den TatBC-Rezeptorkomplex produktiv ist und zum Export über die Cytoplasmamembran führt (rote Linie). Es wird weiterhin angenommen, dass ab einer bestimmten Gesamtbindeaffinität eine optimale Adaptation des Signalpeptids an die TatBC-Bindetasche vorliegt, welche einen Export mit der maximal möglichen Effizienz erlaubt. Im Falle des nativen TorA-Signalpeptids mit unveränderter h-Region liegt bereits eine ausreichend hohe Anzahl an Interaktionen innerhalb der TatBC-Bindetasche vor, sodass die Bindeaffinität den Schwellenwert für eine maximale Translokationseffizienz (100%) erreicht (violette Linie). Zwar wird durch die Einführung hydrophoberer Aminosäuren in die h-Region die Hydrophobizität des TorA-Signalpeptids und damit auch die Gesamtbindeaffinität an den TatBC-Rezeptorkomplex zusätzlich erhöht, jedoch

führt dies zu keiner weiteren Zunahme der Exporteffizienz. Wird die Hydrophobizität der h-Region hingegen durch stark hydrophile Aminosäuren wie Asparagin oder Aspartat (vgl. Auswirkung der V23D Mutation auf den Export von TorA-MalE; Kapitel IV, Abschnitt 1.1) signifikant herabgesetzt, so wirkt sich die verringerte Gesamtbindeaffinität des Signalpeptids auch auf die Translokationseffizienz des Reporterproteins aus, da der Schwellenwert für die Bindeaffinität, welche im maximalen Export resultiert, nicht mehr erreicht wird. Im Falle der Mutation V23D im Zentrum der h-Region des TorA-Signalpeptids führte die Substitution von Valin durch den negativ geladenen Aspartatrest sogar zu einer vollständigen Blockade des Tat-abhängigen Exports. In diesem Fall kann basierend auf dem dargestellten Modell angenommen werden, dass durch die Verringerung der Hydrophobizität der h-Region die Gesamtbindeaffinität des Signalpeptids so stark herabgesetzt wird, dass der kritische Schwellenwert für die minimale Bindeaffinität, welche für eine produktive Bindung an den TatBC-Rezeptorkomplex erforderlich ist, unterschritten wird.

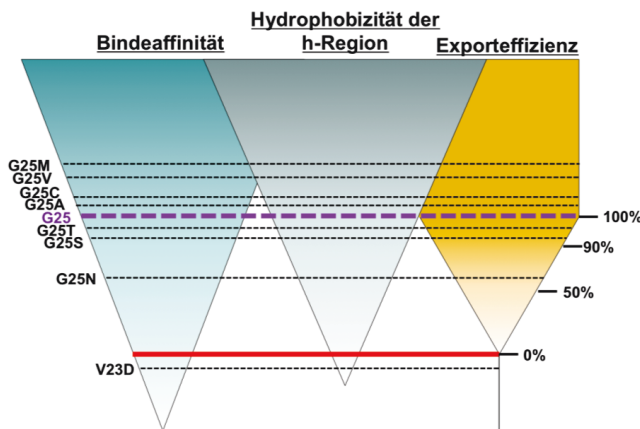


Abbildung 44: Schematische Darstellung der Auswirkung von verschiedenen Substitutionen an der Position G25 in der h-Region des nativen TorA-Signalpeptids auf die Exporteffizienz von TorA-30aa-MalE. Dargestellt ist der funktionale Zusammenhang zwischen der Hydrophobizität der h-Region, der Bindeaffinität des Signalpeptids und der Exporteffizienz des Reporterproteins. Die violette gestrichelte Linie markiert das unveränderte TorA-30aa-MalE-Reporterprotein. Die rote Linie stellt den Schwellenwert für die minimale Bindeaffinität dar, welche für eine produktive Bindung des Signalpeptids an den TatBC-Rezeptorkomplex und folglich eine erfolgreiche Translokation des Substrats über die Membran überschritten werden muss.

Ein anderer Erklärungsversuch für die fehlende Zunahme des Exports von TorA-30aa-MalE durch die Einführung hydrophoberer Aminosäuren in das TorA-Signalpeptid zieht die unterschiedlichen Konformationen der TorA-Signalpeptide mit unverändertem Zwillingarginin-Motiv bzw. inaktiven KQ-Motiv in Betracht. Es ist möglich, dass die erwartete zusätzliche Zunahme der Exporteffizienz des unveränderten TorA-30aa-MalE-Reporterproteins nicht eintritt, weil das native TorA-Signalpeptid aufgrund des intakten Zwillingarginin-Motivs anders innerhalb der TatBC-Bindetasche positioniert ist als die mutierte TorA[KQ]-Signalpeptidvariante. Während im TorA[KQ]-Signalpeptid die hydrophoberen Aminosäurereste an der Position 25 in der h-Region die Gesamtbindeaffinität des Signalpeptids an die TatBC-Bindetasche signifikant erhöhen und den Export der Reportervariante dadurch initiieren konnten, könnten diese aufgrund der veränderten Konformation des nativen TorA-Signalpeptids nun weniger stark mit den hydrophoben transmembranen Domänen des TatBC-Rezeptorkomplexes interagieren, wodurch sich eine Erhöhung der Gesamthydrophobizität der h-Region - im Falle des nativen TorA-Signalpeptids - wesentlich schwächer auf die Gesamtbindeaffinität auswirken würde. Die

Ergebnisse deuten sogar darauf hin, dass die Substitutionen an der Position G25 in der h-Region des nativen TorA-Signalpeptids die Exporteffizienz von TorA-30aa-MalE generell sogar verringern. Bei einem Austausch eines Helix-brechenden Glycinrestes kann von einer signifikanten Veränderung der Konformation des Signalpeptids ausgegangen werden. Unter der Annahme, dass das native TorA-Signalpeptid optimal an die TatBC-Bindetasche angepasst ist, hätte jede Konformationsänderung demnach einen negativen Einfluss auf die Bindung des Signalpeptids an den TatBC-Rezeptorkomplex. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass sich der Tat-abhängige Export der TorA-30aa-MalE-Reportervariante mit der Substitution G25N in der h-Region sogar toxisch auf die Zellen auswirkt. Der *E. coli* Stamm GSJ101, welcher die Wildtyp-Tat-Translokase und die mutierte TorA[G25N]-30aa-MalE-Reportervariante coexprimierte, wuchs zwar nur sehr langsam mit Maltose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle, bildete jedoch einen roten Phänotyp auf MCM aus. Diese Diskrepanz zwischen der langsamen Wachstumsrate auf MMM und der Rotfärbung der Kolonien auf MCM wies auf eine partielle Zellyse hin, welche in den darauffolgenden Zellfraktionierungsexperimenten durch den Nachweis des membranassoziierten SecA-Proteins in der PP-Fraktion bestätigt wurde. Ein ähnlicher Effekt wurde bereits in den vorhergehenden Arbeiten dieser Arbeitsgruppe beobachtet. Bei der Selektion mutierter Tat-Translokasen, welche eine normalerweise exportdefekte TorA[KQ]-MalE-Reportervariante signifikant transportieren können, wurde eine Suppressormutante isoliert, welche die Mutation L9P in TatB aufweist (Lausberg *et al.*, 2012). Die mutierte TatAB[L9P]CE-Translokase konnte sowohl den TorA[KQ]-MalE-Reporter als auch das unveränderte TorA-MalE-Protein exportieren. Allerdings wirkte sich der Export von TorA-MalE mit intaktem Zwillingarginin-Motiv durch diese Tat-Translokase toxisch auf die Zellen aus (Frank Lausberg, persönliche Mitteilung). Zwar konnten auf Proteinebene keine signifikanten Unterschiede in den exportierten TorA-MalE-Mengen durch die TatAB[L9P]CE-Translokase im Vergleich zur wildtypischen Tat-Translokase festgestellt werden, jedoch wies der entsprechende Stamm während der Kultivierung im LB-Medium ein stark verlangsamtes Wachstum auf und unterschied sich im MMM/MCM-Plattenassay phänotypisch deutlich von der Positivkontrolle, in welcher TorA-30aa-MalE durch die Wildtyp-Tat-Translokase exportiert wurde. Diese Eigenschaften treffen auch für den Stamm zu, welcher die Wildtyp-Tat-Translokase und die TorA[G25N]-30aa-MalE-Reportervariante coexprimiert. Im Gegensatz hierzu führte der Export des TorA[KQ,G25N]-30aa-MalE-Reporters, in welchem die Substitution G25N in das TorA[KQ]-Signalpeptid eingeführt wurde, durch die wildtypische Tat-Translokase nicht zur Wachstumsinhibition. Der Grund hierfür kann einerseits darin liegen, dass die Mutation G25N im TorA[KQ]-Signalpeptid den Exportdefekt von TorA[KQ]-30aa-MalE nicht supprimieren kann, sodass kein Tat-abhängiger Export dieser Reportervariante erfolgen kann welcher sich toxisch auf die Zellen auswirken könnte. Andererseits ist es möglich, dass erst die Kombination der Mutation G25N mit dem Zwillingarginin zu einer besonderen Konformation des Signalpeptids führt, welche die Struktur der TatBC-Bindetasche während des Bindeprozesses beeinflussen könnte. Die durch die Signalpeptidbindung verursachte Konformationsänderung innerhalb des TatBC-

Rezeptorkomplexes könnte eine Undichtigkeit der Tat-Translokase bewirken, welche während des Transportprozesses zu einem unkontrollierten Protoneneinstrom führen könnte. Dies hätte wiederum zur Folge, dass der Protonengradient, welcher für den Energiestoffwechsel essentiell ist, über der Membran abgebaut wird, wodurch die Toxizität des Exports von TorA[G25N]-30aa-MalE durch die Tat-Translokase erklärt werden könnte. In der Arbeit von Richter & Brüser (2005) wurde ein ähnliches Phänomen beschrieben. Das authentische Sec-Substrat PhoA, welches zwei Disulfidbrücken enthält, kann aufgrund des reduzierenden Milieus im Cytoplasma von *E. coli* nicht korrekt falten. Wurde der reife Proteinanteil von PhoA an das Signalpeptid des Tat-spezifischen Proteins HiPIP fusioniert, so konnte dieses Fusionsprotein zwar an die Tat-Translokase binden, wurde jedoch aufgrund der mechanistischen Inkompatibilität des Tat-Systems mit entfalteten Proteinen nicht über die Membran transloziert. Dieser Transportversuch führte zu einer deutlichen Erniedrigung des Membranpotentials, welche auf einen Protoneneinstrom während des Bindeprozesses zurückgeführt werden könnte (Richter & Brüser, 2005).

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Studie demonstriert, dass das native TorA-Signalpeptid bereits optimal an die TatBC-Bindetasche adaptiert ist. Substitutionen von Aminosäureresten in der h-Region durch hydrophobe wie auch hydrophile Aminosäuren zeigen tendenziell eine negative Auswirkung auf die Exporteffizienz, welche auf die Veränderung der Konformation des Signalpeptids aufgrund dieser Mutationen zurückgeführt werden könnte.

1.5 TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit h-Region-lokalisierten Suppressormutationen inserieren tief in die TatBC-Bindetasche

Im Abschnitt 1.3 wurde anhand eines Modells eine mögliche Wirkungsweise der h-Region-lokalisierten Suppressormutationen im TorA[KQ]-Signalpeptid erklärt. Diesem Modell nach würden sich die Mutationen in der h-Region direkt auf die „*advanced-stage*“ –Bindung des Signalpeptids tief in der Membran auswirken und die hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb der TatBC-Bindetasche verstärken, wodurch eine produktive Bindung an den TatBC-Rezeptorkomplex wiederhergestellt wird. Diese Wirkungsweise der Mutationen in der h-Region setzt allerdings eine vorherige Insertion der Signalpeptide der verschiedenen mutierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten trotz einer inaktivierenden KQ-Mutation des Zwillingarginins in die TatBC-Bindetasche voraus. Um nun experimentell zu überprüfen, ob die h-Region-lokalisierten Suppressormutationen tatsächlich eine „*advanced-stage*“ -Bindung des TorA[KQ]-Signalpeptids in Abwesenheit eines intakten Zwillingarginin-Motivs tief innerhalb des TatBC-Bindetasche vermitteln, wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Matthias Müller (Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Freiburg) ortsspezifische *in vitro* Crosslinking-Experimente, wie im Kapitel IV, Abschnitt 1.7 beschrieben, durchgeführt. Dabei wurde das Crosslinking-Reagenz Bpa an mehrere Positionen im TatBC-Rezeptorkomplex eingeführt, welche anhand der Daten vorhergehender Crosslinking-Experimente ausgewählt wurden. Auf eine zusätzliche Platzierung des Bpa in den verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten wurde bewusst verzichtet. Da es sich hierbei um ein hydrophobes Phenylalanin-Derivat handelt,

wird durch die Substitution einer weniger hydrophoben Aminosäure durch Bpa die Gesamthydrophobizität erhöht. Daher ist es nicht unwahrscheinlich, dass Bpa auf den Exportdefekt von TorA[KQ]-30aa-MalE selbst supprimierend wirken würde, wodurch die Analyse der Effekte der einzelnen h-Region-lokalisierten Suppressormutationen auf die Bindung des TorA[KQ]-Signalpeptids verfälscht werden könnte. Von einer Auswirkung von Bpa auf die Bindung des Signalpeptids an den TatBC-Rezeporkomplex wurde auch in den neueren Arbeiten von Taubert *et al.* (2015) berichtet. In diesen wurde gezeigt, dass die Substitution eines Alaninrestes im Tat-Konsensusmotiv des Tat-abhängig translozierten Proteins HiPIP (S-R-R-D-A-V-K) durch Bpa eine inaktivierende KK-Mutation des Zwillingsarginins teilweise kompensieren kann (Taubert *et al.*, 2015).

Aufgrund vorhergehender Crosslinking-Studien war bekannt, dass die Positionen I4 im periplasmatisch orientierten N-Terminus von TatB und V202 im distalen Teil der TMH-5 von TatC tief inserierte Tat-Signalpeptide während der „advanced-stage“-Bindung kontaktieren (Blümmel *et al.* (2015). Die Platzierung des Bpa an diese Positionen im TatBC-Rezeptorkomplex eignete sich somit ideal zur Überprüfung einer Insertion der verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten, welche Suppressormutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids aufwiesen, in die TatBC-Bindetasche. Erwartungsgemäß wurden die stärksten Kontakte zwischen den Positionen I4 in TatB bzw. V202 in TatC und der Positivkontrolle TorA-30aa-MalE mit unverändertem Zwillingsarginin-Motiv detektiert, welche auf die starken Wechselwirkungen des nativen TorA-Signalpeptids mit der TatBC-Bindetasche während der „advanced-stage“-Bindung zurückgeführt werden können. Tatsächlich ist es in dieser Studie auch gelungen, Kontakte zwischen dem N-Terminus von TatB und den Reportervarianten iKQ-T22I, iKQ-G25M, iKQ-A16V+G28W und iKQ-G25V+G28W nachzuweisen, welche *in vivo* mit den höchsten Effizienzen durch die Wildtyp-Tat-Translokase exportiert werden. Diese UV-abhängigen TatB-Addukte konnten bei der Negativkontrolle TorA[KQ]-30aa-MalE, welche keine zusätzlichen Mutationen in der h-Region des Signalpeptids aufweist, nicht detektiert werden, wodurch die strikte Abhängigkeit der beobachteten Kontakte von der Anwesenheit der h-Region-lokalisierten Suppressormutationen bestätigt werden konnte. Da sich der N-Terminus von TatB auf der periplasmatischen Seite der Membran befindet, weisen diese Ergebnisse stark darauf hin, dass die TorA[KQ]-Signalpeptide der mutierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten offensichtlich trotz eines fehlenden Zwillingsarginins tief in die TatBC-Bindetasche inseriert werden.

Bei den Reportervarianten mit den schwächeren Suppressormutationen A16V, T22A, G25V, G28W und T22A+G28W, welche *in vivo* mit einer Effizienz zwischen 0,9% und 13,5% durch die wildtypische Tat-Translokase exportiert werden, konnten keine Banden detektiert werden, die von der Größe her einem TatB-TorA[KQ]-30aa-MalE-Addukt entsprechen würden. Dies kann sehr wahrscheinlich auf die bedeutend niedrigere Sensitivität des verwendeten *in vitro*-Systems zurückgeführt werden (Alami *et al.*, 2002). Die geringere Sensitivität einer *in vitro*-Untersuchung des Tat-abhängigen Exports gegenüber einem *in vivo*-System wurde auch in früheren Studien mit Reporterproteinen beobachtet, in denen das Zwillingsarginin konservativ durch ein

Zwillingslysin im Signalpeptid substituiert wurde. Während *in vitro* kein Export des Tat-abhängigen Proteins Sufl mit dieser Mutation im Signalpeptid nachgewiesen werden konnte (Alami *et al.*, 2003), konnte in anderen Arbeiten durch die Verwendung hochsensitiver Reportersysteme ein signifikanter, wenn auch reduzierter *in vivo* Transport in Anwesenheit der KK-Mutation des Zwillingsarginins detektiert werden (Ize *et al.*, 2002b; Kreutzenbeck *et al.*, 2007).

Überraschenderweise wurden die stärksten Kontakte nicht zu der Reportervariante iKQ-G25V+G28W nachgewiesen, welche *in vivo* am effizientesten durch die wildtypische Tat-Translokase exportiert wird (28,2%), sondern zu dem Reporterprotein iKQ-T22I, das mit deutlich geringerer Effizienz über die Membran transloziert wird (10,9%). Der Grund für diese Diskrepanz liegt wahrscheinlich darin, dass die Substitution von zwei α -Helix-brechenden Glycinresten in der TorA[KQ]-30aa-MaIE-Reportervariante mit der Doppelmutation G25V+G28W in weitaus drastischeren Konformationsänderungen des Signalpeptids resultiert als der Austausch von Threonin durch Isoleucin in der Reportervariante iKQ-T22I. Infolgedessen könnten sich bestimmte Aminosäurereste in der TatB- oder TatC-Komponente räumlich nicht mehr nahe genug am Signalpeptid befinden, sodass eine effiziente Quervernetzung verhindert wird. Es ist sogar denkbar, dass die transmembranen Helices von TatB und TatC durch die Reportervariante iKQ-G25V+G28W auseinander gedrückt werden, wodurch die Konformation der TatBC-Bindetasche erheblich verändert werden würde. Da die Effizienz der Ausbildung von Crosslinks von der Konformation der jeweiligen TorA[KQ]-Signalpeptidvarianten abhängig ist, kann daher nicht bei allen TorA[KQ]-30aa-MaIE-Reportervarianten mit h-Region-lokalisierten Suppressormutationen von einer strikten Korrelation zwischen der *in vivo* beobachteten Translokationseffizienz und der Menge an gebildeten Crosslinking-Produkten ausgegangen werden. Von allen getesteten Reportervarianten entspricht die Konformation des TorA[KQ,T22I]-Signalpeptids wahrscheinlich daher am ehesten derjenigen des nativen TorA-Signalpeptids, welches optimal an die TatBC-Bindetasche angepasst ist (siehe auch vorhergehenden Abschnitt 1.4), wodurch die stärksten Kontakte zum N-Terminus von TatB erklärt werden könnten. Die weiterführende Charakterisierung wurde daher nur mit der Reportervariante iKQ-T22I durchgeführt

In Übereinstimmung mit einer tiefen Insertion von Signalpeptiden in eine Bindetasche, welche gemeinsam von beiden Komponenten des TatBC-Rezeptorkomplexes gebildet wird (Fincher *et al.*, 1998; Fröbel *et al.*, 2012), kontaktierte diese Reportervariante erwartungsgemäß auch die Position V202 in der TMH-5 von TatC. Wurde Bpa hingegen an die Position L9 im cytoplasmatischen N-Terminus von TatC platziert, welcher einen Teil der Erkennungs- und Bindestelle für das Tat-Konsensusmotiv bildet (Alami *et al.*, 2003; Fröbel *et al.*, 2012; Kreutzenbeck *et al.*, 2007; Zoufaly *et al.*, 2012) konnten im Gegensatz zur Positivkontrolle TorA-30aa-MaIE mit unverändertem Zwillingsarginin keine UV-abhängigen TatC-Addukte bei der Reportervariante iKQ-T22I nachgewiesen werden. Dies stimmt mit den Ergebnissen mehrerer Crosslinking-Studien überein, welche gezeigt haben, dass die spezifische Erkennung und Bindung des Tat-Konsensusmotivs durch TatC strikt von einem intakten Zwillingsarginin-Motiv abhängig ist (Alami *et al.*, 2003). Da die h-Region-lokalisierte Suppressormutation T22I das Tat-

Konsensusmotiv nicht betrifft, wird im Falle des Reporterproteins iKQ-T22I die produktive Primärerkenntung des Tat-Konsensusmotivs durch TatC offensichtlich nicht wiederhergestellt. Die Ergebnisse weisen daher stark darauf hin, dass die Primärerkenntung des Zwillingsarginins durch TatC keine Voraussetzung für die Insertion des Signalpeptids in die TatBC-Bindetasche darstellt. Dies steht wiederum im Widerspruch zu dem Bindemodell von Alami *et al.* (2003), welches eine klare hierarchische Abfolge bei der Signalpeptidbindung suggeriert. Nach diesem Modell wird das Tat-Signalpeptid zuerst über das Tat-Konsensusmotiv von TatC, welches als primärer Rezeptor fungiert, erkannt und gebunden. Erst im Anschluss an die produktive Primärerkenntung wird das Signalpeptid an TatB übergeben und in eine Bindetasche inseriert, welche von beiden Komponenten gebildet wird (Alami *et al.*, 2003). Die Ergebnisse der vorliegenden Crosslinking-Studie würden mit diesem Modell übereinstimmen unter der Voraussetzung, dass die übrigen Aminosäurereste des Tat-Konsensusmotivs ausreichend sind um eine Erkennung des Signalpeptids durch TatC und die darauffolgende tiefe Insertion des Signalpeptids mit der KQ-Mutation im Zwillingsarginin-Motiv zu gewährleisten. Zwar konnte in mehreren Arbeiten gezeigt werden, dass die weniger konservierten Aminosäurereste des Tat-Konsensusmotivs sehr wahrscheinlich zur spezifischen Bindung an TatC beitragen (Lausberg *et al.*, 2012; Mendel *et al.*, 2008; Stanley *et al.*, 2000), jedoch weisen die fehlenden Kontakte zwischen der Position L9 im cytoplasmatischen N-Terminus von TatC und der Reportervariante iKQ-T22I sowie der Negativkontrolle TorA[KQ]-30aa-MalE mit unveränderter h-Region eher darauf hin, dass eine primäre Erkennung des Tat-Konsensusmotivs durch TatC im Falle des mutierten TorA[KQ]-Signalpeptids generell nicht erfolgt. Aufgrund dessen kann angenommen werden, dass sich die h-Region-lokalisierten Suppressormutationen nicht auf die Primärerkenntung, sondern auf einen späteren Schritt des Bindeprozesses an den TatBC-Rezeptorkomplex auswirken.

Durch die Verwendung von zwei verschiedenen Inhibitoren der PMK, CCCP und DCCD, ist es schließlich gelungen die beobachteten Kontakte zwischen den TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit h-Region-lokalisierten Suppressormutationen und dem TatBC-Rezeptorkomplex zeitlich genauer in den Tat-abhängigen Translokationsprozess einzuordnen. Während der Entkoppler CCCP lediglich den PMK-abhängigen Translokationsschritt über die Membran blockiert, verhindert DCCD zusätzlich die Insertion von Tat-Vorläuferproteinen in die TatBC-Bindetasche (Blümmel *et al.* (2017), unpublizierte Daten). Dadurch, dass die Kontakte zwischen dem periplasmatischen N-Terminus von TatB und der iKQ-T22I-Reportervariante auch in Abwesenheit der PMK detektiert werden konnten, müssen sich die h-Region-lokalisierten Mutationen daher bereits vor dem Translokationsschritt über die Membran auf die Bindung des Signalpeptids an den TatBC-Rezeptorkomplex auswirken. Zudem waren diese Kontakte strikt von der Insertion des TorA[KQ]-Signalpeptids in die TatBC-Bindetasche abhängig, da kein TatB-iKQ-T22I-Addukt nach Zugabe von DCCD nachgewiesen werden konnte. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die zusätzlichen Mutationen in der h-Region die Bindung des Signalpeptids an den TatBC-Rezeptorkomplex nach dessen tiefer Insertion in die „advanced-stage“ – Bindetasche beeinflussen, welche offensichtlich auch in Abwesenheit eines intakten

Zwillingsarginin-Motivs erfolgen kann. Da schließlich ein signifikanter *in vivo* –Export der verschiedenen mutierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten beobachtet werden konnte, muss durch die Mutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids die produktive Wechselwirkung zwischen einem normalerweise exportdefekten TorA[KQ]-30aa-MalE-Vorläuferprotein und dem TatBC-Rezeptorkomplex wiederhergestellt worden sein.

Die gewonnenen biochemischen Daten unterstützen somit das in Abschnitt 1.3 beschriebene Modell der direkten Auswirkung der h-Region-lokaliserten Suppressormutationen auf die „advanced-stage“-Bindung des Signalpeptids innerhalb der TatBC-Bindetasche. Zudem haben die Ergebnisse der *in vitro* Crosslinking-Experimente demonstriert, dass der Schritt der Primärerkenkung des Tat-Signalpeptids durch TatC, welcher ausschließlich über das Tat-Konsensusmotiv und vor der „advanced-stage“-Bindung des Tat-Substrats an den TatBC-Rezeptorkomplex erfolgt, nicht obligatorisch ist und eine Positionierung des Signalpeptids in der TatBC-Bindetasche auch in Abwesenheit eines intakten Zwillingsarginin-Motivs möglich ist. Die Ergebnisse implizieren somit, dass die „Qualität“ des Signalpeptids erst nach der Insertion in die TatBC-Bindetasche „gemessen“ wird. Dies bedeutet, dass erst bei diesem Schritt des Translokationsprozesses überprüft wird, ob das Tat-Substrat produktiv an den TatBC-Rezeptorkomplex binden kann. Zu den Interaktionen zwischen einem Tat-Vorläuferprotein und der TatBC-Bindetasche trägt nicht nur das Tat-Konsensusmotiv, sondern – wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde – auch die h-Region des Tat-Signalpeptids bei. Für eine produktive Bindung, welche die Translokation über die Membran initiiert, ist letztlich die Summe und die Stärke aller Bindungskontakte innerhalb der TatBC-Bindetasche entscheidend.

Die neuen Erkenntnisse wirken sich somit auch auf das aktuelle Modell des Tat-abhängigen Translokationsprozesses aus. Im letzten Abschnitt der Diskussion wird daher ein neues Modell vorgeschlagen, welches auf den neu gewonnenen Daten basiert (siehe Abschnitt 3).

1.6 h-Region-lokalisierte Suppressormutationen kooperieren mit Mutationen im TatBC-Rezeptorkomplex bei der Suppression des Exportdefekts von TorA[KQ]-30aa-MalE

Nachdem nun auch auf biochemischer Ebene gezeigt werden konnte, dass sich die h-Region-lokaliserten Suppressormutationen sehr wahrscheinlich direkt auf die „advanced-stage“-Bindung des TorA[KQ]-Signalpeptids tief innerhalb der TatBC-Bindetasche auswirken, erschien es realistisch, dass der Export der mutierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten durch zusätzliche Suppressormutationen im TatBC-Rezeptorkomplex, welche in vorhergehenden Arbeiten isoliert wurden (Kreutzenbeck *et al.*, 2007), weiter gesteigert werden könnte. Basierend auf dem vorgeschlagenen Modell für die Wirkungsweise der Suppressormutationen in der h-Region (siehe Abschnitt 1.3) bzw. im TatBC-Rezeptorkomplex (Kreutzenbeck *et al.*, 2007; Lausberg *et al.*, 2012) würden sowohl durch die neu eingeführten hydrophoberen Aminosäuren in der h-Region als auch durch die veränderten Aminosäuren im TatBC-Rezeptorkomplex neue Bindungskontakte innerhalb der TatBC-Bindetasche eingefügt oder bereits bestehende Interaktionen verstärkt werden. Es ist daher sehr gut möglich, dass die Kombination beider

Mutationstypen zu einer starken Erhöhung der Gesamtbindeaffinität des TorA[KQ]-Signalpeptids an die TatBC-Bindetasche führt, welche sich folglich in einer deutlichen Zunahme der Translokationseffizienz des TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterproteins widerspiegeln würde. Für diese Untersuchung wurden drei verschiedene h-Region-lokalisierte Einzelmutationen (A16V, T22I, G25V) sowie eine Doppelmutation (G25V+G28W) ausgewählt, welche sowohl in der Lage innerhalb der h-Region als auch in der Suppressorstärke variieren. Diese wurden einerseits mit den Suppressormutationen E8K in TatB und L9F in TatC kombiniert, welche in den vorhergehenden Arbeiten von Kreutzenbeck *et al.* bereits im Hinblick auf ihre Suppressoreigenschaften charakterisiert wurden (Kreutzenbeck *et al.*, 2007). Andererseits wurde der Export der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit den ausgewählten h-Region-lokalisierten Suppressormutationen auch durch die neu konstruierte TatAB[E8K]C[L9F]-Translokase untersucht, in welcher die beiden Einzelmutationen E8K(TatB) und L9F(TatC) kombiniert vorliegen.

Die Mutation E8K ist im periplasmatischen N-Terminus von TatB lokalisiert und wurde von Kreutzenbeck *et al.* (2007) als eine relativ schwache Suppressormutation des Exportdefekts von TorA[KQ]-MalE eingestuft. Dadurch, dass der Transport eines exportdefekten TorA[KQ]-MalE-Reporterproteins durch diese Mutation im TatBC-Rezeptorkomplex teilweise wiederhergestellt werden konnte, wurde einerseits angenommen, dass diese Mutation die Konformation der TatBC-Bindetasche so verändern könnte, dass die Bindung des TorA[KQ]-Signalpeptids an den TatBC-Rezeptorkomplex an einer bestimmten Position innerhalb der Bindetasche verstärkt wird (Kreutzenbeck *et al.*, 2007). Andererseits wäre aufgrund der tiefen Insertion des TorA[KQ]-Signalpeptids in die TatBC-Bindetasche, welche durch die zuvor beschriebenen Crosslinking-Experimente bestätigt wurde (siehe 1.5), auch eine direkte Interaktion zwischen dem eingeführten Lysinrest und dem Signalpeptid denkbar. In beiden Fällen würde die Suppression des Exportdefekts von TorA[KQ]-MalE durch die Mutation E8K aufgrund einer Erhöhung der Gesamtbindeaffinität des Tat-Vorläuferproteins an den TatBC-Rezeptorkomplex erfolgen.

Kürzlich wurde jedoch eine andere Wirkungsweise von TatB-lokalisierten Suppressormutationen postuliert (Alcock *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2017). In der aktuellen Arbeit von Alcock *et al.* (2016) wurde gezeigt, dass polare Aminosäurereste auf einer Seite der TMH von TatB mit einem polaren Cluster der TMH-5/TMH-6 von TatC über Wasserstoffbrückenbindungen interagieren (Alcock *et al.*, 2016). Diese TatB-Bindestelle in TatC stellt wahrscheinlich auch die Bindestelle für TatA dar. Es wird angenommen, dass die Bindung eines Substrats an den TatBC-Rezeptorkomplex mechanistisch mit einer Verdrängung von TatB von dieser TMH-5/TMH-6-Stelle in TatC verbunden ist, sodass TatA binden, oligomerisieren und den Export des Substrats vermitteln kann. In diesem Zusammenhang könnte die Mutation E8K in TatB, welche ein negativ-geladenes Glutamat durch ein positiv-geladenes Lysin substituiert und daher eine drastische Ladungsveränderung verursacht, die Interaktionen zwischen der TMH von TatB und dem polaren TMH-5/TMH-6-Cluster von TatC abschwächen (Huang *et al.*, 2017). Infolgedessen würde die Aktivierungsbarriere für die Konformationsänderung des TatBC-Rezeptorkomplexes, welche zum

TatB/TatA-Austausch führt, erniedrigt werden, sodass diese auch von schwach bindenden Signalpeptiden ausgelöst werden könnte (Alcock *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2017).

Die Untersuchung des Exports der verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit h-Region-lokalisierten Suppressormutationen durch die mutierte TatAB[E8K]CE-Translokase ergab interessanterweise, dass sich die zusätzliche Suppressormutation in der Tat-Translokase synergistisch auf die Exporteffizienz dieser Reporterproteine auswirkt. Dabei nahm der Export der verschiedenen Reportervarianten durch die TatB-Mutation nicht in gleicher Weise, sondern jeweils unterschiedlich stark zu. Unter der Annahme, dass die Mutation E8K lediglich zu einer Erniedrigung des Schwellenwerts für die minimale Bindeaffinität um einen bestimmten Betrag führt, welcher zur Auslösung der essentiellen Konformationsänderung im TatBC-Rezeptorkomplexes überschritten werden muss, würde eher ein additiver Effekt dieser Mutation auf die Exporteffizienz erwartet werden. Dies bedeutet, dass der Export aller Reporterproteine, d.h. der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit h-Region-lokalisierten Suppressormutationen wie auch der Negativkontrolle mit unveränderter h-Region, um einen ähnlichen Betrag durch die TatB-Mutation gesteigert werden würde. Die synergistische Zusammenwirkung der Mutation E8K mit den h-Region-lokalisierten Mutationen deutet daher darauf hin, dass sich die TatB-Mutation darüber hinaus auch auf die Gesamtbindeaffinität des Signalpeptids auszuwirken scheint. Da in den durchgeführten Crosslinking-Experimenten Kontakte zwischen dem N-Terminus von TatB und den TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterproteinen mit h-Region-lokalisierten Suppressormutationen nachgewiesen werden konnten, kommt hierbei auch eine direkte Interaktion des eingeführten Lysinrests an der Position E8 mit dem TorA[KQ]-Signalpeptid in Frage. Andererseits könnte sich die Mutation auch indirekt auf die Bindung des Signalpeptids auswirken. Durch die Abschwächung der Interaktionen zwischen TatB und der TMH-5/TMH-6 von TatC könnte die Konformation der TatBC-Bindetasche so verändert werden, dass die Wechselwirkungen zwischen dem TorA[KQ]-Signalpeptid und dem TatBC-Rezeptorkomplex an einer bestimmten Stelle innerhalb der TatBC-Bindetasche verstärkt werden könnten, wodurch die Gesamtbindeaffinität und damit auch die Translokationseffizienz des Reporterproteins zunehmen würde. Der beobachtete Effekt der TatB-Mutation E8K auf den Export der mutierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten ist daher sehr wahrscheinlich das Resultat einer Kombination aus beiden möglichen Wirkungsweisen.

Der stärkste synergistische Effekt auf den Export von TorA[KQ]-30aa-MalE konnte bei der Kombination der TatB-Mutation E8K mit der h-Region-Mutation T22I nachgewiesen werden, welche im Vergleich zur Doppelmutation G25V+G28W (26,6%) einen deutlich geringeren Export von TorA[KQ]-30aa-MalE durch die wildtypische Tat-Translokase erlaubt (11,7%). Während der Transport der übrigen Reportervarianten um maximal 13,8% (iKQ-G25V+G28W) durch die Mutation E8K gesteigert werden konnte, nahm die Translokationseffizienz von iKQ-T22I um ca. 18% zu. Die geringere Auswirkung der TatB-Mutation auf den Export der Reportervariante mit der Doppelmutation G25V+G28W, welche die stärksten Suppressoreigenschaften aufweist, könnte anhand der unterschiedlichen Konformationen der TorA[KQ]-Signalpeptidvarianten innerhalb der

TatBC-Bindetasche erklärt werden. Wie im vorhergehenden Abschnitt 1.5 bereits beschrieben wurde, kann bei der Mutation T22I im Zentrum der h-Region von geringfügigen Auswirkungen auf die Konformation des TorA[KQ]-Signalpeptids ausgegangen werden, während der Austausch des Helix-brechenden Glycins bei den Reportervarianten iKQ-G25V sowie iKQ-G25V+G28W zu weitaus drastischeren Konformationsveränderungen des Signalpeptids führt. In diesem Fall könnte eine Streckung der α -helikalen Struktur der h-Region durch die Mutationen G25V bzw. G25V+G28W zu einem Auseinanderdrücken der TatBC-Rezeptor-Komponenten führen, sodass die Wechselwirkungen zwischen der TMH von TatB und der TMH-5/TMH-6-Stelle in TatC bereits durch diese Mutationen abgeschwächt werden würden. Infolgedessen könnte sich die Mutation E8K nur noch geringfügig auf diese TatB/TatC-Wechselwirkungen auswirken, wodurch die geringere Zunahme der Exporteffizienz bei iKQ-G25V und iKQ-G25V+G28W im Vergleich zu iKQ-T22I erklärt werden könnte.

Im Vergleich zu der TatB-Mutation E8K weist die Mutation L9F im cytoplasmatischen N-Terminus von TatC wesentlich stärkere Suppressoreigenschaften auf (Kreutzenbeck *et al.*, 2007). Die Ergebnisse aus der Untersuchung des Exports der verschiedenen mutierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten durch die TatABC[L9F]E-Translokase zeigen, dass die h-Region-lokalisierten Mutationen auch mit der Mutation L9F in TatC synergistisch bei der Suppression des Exportdefekts von TorA[KQ]-30aa-MalE zusammenwirken. Dabei führte diese TatC-Mutation im Vergleich zur Mutation E8K in TatB jedoch zu einer wesentlich stärkeren Zunahme der Exporteffizienzen der verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten. Der Grund für den stärkeren synergistischen Effekt der Mutation L9F auf den Export dieser Reporterproteine liegt vermutlich nicht nur in der Fähigkeit, den Exportdefekt von TorA[KQ]-30aa-MalE generell stärker zu supprimieren (9,6% Export im Vergleich zu 4,5% durch TatAB[E8K]CE), sondern auch in der Wirkungsweise dieser Mutation. Aufgrund der Lage im cytoplasmatischen N-Terminus von TatC ist eine direkte Auswirkung der Mutation L9F auf die Wechselwirkungen zwischen TatB und TatC unwahrscheinlich, sodass der beobachtete Effekt auf die Exporteffizienzen der Reportervarianten nicht auf eine Erniedrigung des Schwellenwerts für die minimale Bindeaffinität zurückzuführen ist. Im Einklang mit dem vorgeschlagenen Modell für die Wirkungsweise der TatBC-gekoppelten Suppressormutationen (Kreutzenbeck *et al.*, 2007), könnte die starke Zunahme des Exports der verschiedenen mutierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten anhand einer engen Kooperation der Mutationen in der h-Region mit der Mutation L9F in TatC während der „advanced-stage“-Bindung begründet werden, wobei jeder einzelne Aminosäureaustausch entweder direkt oder indirekt zu einer Verstärkung der Signalpeptidbindung führt. Da zwischen der Position L9 in TatC und der Reportervariante iKQ-T22I keine Crosslinks detektiert werden konnten (siehe 1.5), welche auf eine direkte Interaktion mit dem Substrat hinweisen würden, wird angenommen, dass die TatC-Mutation L9F indirekt über eine Konformationsänderung im TatBC-Rezeptorkomplex agiert, welche zu einer verstärkten Wechselwirkung mit dem Signalpeptid an irgendeiner Position innerhalb der TatBC-Bindetasche führt.

Wurden die Wirkungsweisen der beiden Tat-gekoppelten Mutationen E8K(TatB) und L9F(TatC) miteinander kombiniert, so konnte der Transport der normalerweise exportdefekten TorA[KQ]-30aa-MaIE-Reportervariante in Anwesenheit von zusätzlichen Suppressormutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids sogar vollständig wiederhergestellt werden. Während sowohl in vorhergehenden Arbeiten als auch bei dieser Untersuchung gezeigt werden konnte, dass der Export des Reporterproteins mit einem nativen TorA-Signalpeptid durch zusätzliche Suppressormutationen im TatBC-Rezeptorkomplex nicht signifikant beeinflusst wird (Kreutzenbeck *et al.*, 2007), wurde die TorA[KQ]-30aa-MaIE-Reportervariante, welche die Mutation T22I in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids aufweist, erstaunlicherweise mit einer deutlich höheren Effizienz durch die mutierte TatAB[E8K]C[L9F]E-Translokase exportiert als der unveränderte TorA-30aa-MaIE-Reporter. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in der Studie von Lausberg *et al.* (2012) gemacht. Dabei wurde gezeigt, dass eine Kombination von drei Suppressormutationen im TatBC-Rezeptorkomplex einen Export von TorA[KQ]-MaIE mit einer enorm hohen Translokationseffizienz von bis zu 150% (bezogen auf die Exporteffizienz des unveränderten Reporters TorA-MaIE durch die wildtypische Tat-Translokase (100%)) vermitteln kann. Die fehlende Zunahme des Exports von TorA-MaIE bzw. TorA-30aa-MaIE durch die zusätzlichen Suppressormutationen im TatBC-Rezeptorkomplex entspricht den Erwartungen, da diese Mutationen spezifisch auf den Export eines Reporterproteins mit der inaktivierenden KQ-Mutation im TorA-Signalpeptid hin selektioniert wurden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass bestimmte Kombinationen von Suppressormutationen in der h-Region und im TatBC-Rezeptorkomplex nicht nur den Verlust des Zwillingsarginins durch eine direkte oder indirekte Verstärkung der Signalpeptidbindung vollständig kompensieren können, sondern auch eine optimale Adaptation des veränderten TorA[KQ]-Signalpeptids an die TatBC-Bindetasche bewirken, wodurch die hohe Translokationseffizienz von TorA[KQ]-30aa-MaIE erklärt werden kann. Diese Untersuchungen haben damit bestätigt, dass die h-Region-lokalisierten Suppressormutationen im TorA[KQ]-Signalpeptid und die Mutationen im TatBC-Rezeptorkomplex bei der Suppression des Exportdefekts von TorA[KQ]-30aa-MaIE miteinander kooperieren und sich entweder direkt oder indirekt über Konformationsänderungen innerhalb der TatBC-Bindetasche auf die Interaktionen zwischen dem Tat-Substrat und dem TatBC-Rezeptorkomplex während der „*advanced-stage*“-Bindung auswirken.

1.7 Eine zu starke Erhöhung der Hydrophobizität in Kombination mit einer Verlängerung der h-Region führt zu einem partiellen Sec-abhängigen Export einiger TorA[KQ]-30aa-MaIE-Reportervarianten mit h-Region-lokalisierten Suppressormutationen

Zuletzt blieb noch die Frage offen, warum einige Suppressormutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids auch einen partiellen Export der TorA[KQ]-30aa-MaIE-Reportervarianten über den Sec-Weg erlauben, während andere Aminosäureaustausche hingegen einen strikt Tat-spezifischen Transport vermitteln. Die Reportervarianten iKQ-Q17L, iKQ-G19V, iKQ-A16V+G19V und iKQ-A16V+T22I konnten über beide Transportwege exportiert werden. Die duale Spezifität

dieser TorA[KQ]-30aa-MalE-Varianten für beide Translokationssysteme äußerte sich einerseits durch die Fähigkeit der entsprechenden Stämme in Abwesenheit einer funktionalen Tat-Translokase mit Maltose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen und andererseits durch eine signifikante Zunahme der Wachstumsrate auf MMM in Anwesenheit beider Translokationssysteme. Es ist möglich, dass der Export der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten hierbei parallel über beide Transportsysteme erfolgt. Andererseits ist es auch denkbar, dass beim Vorliegen eines Sec- und Tat-Systems der Export über den Tat-Weg favorisiert und das Reporterprotein in diesem Fall spezifisch durch die Tat-Translokase ins Periplasma transloziert wird. Unter der Annahme, dass der Export über den Tat-Weg im Vergleich zu einer Sec-abhängigen Translokation effizienter erfolgen kann, könnte die Zunahme des Wachstums auf MMM in Gegenwart beider Transportsysteme auch durch einen effizienten strikt Tat-abhängigen Export von MalE erklärt werden.

Viele Tat-Signalpeptide weisen natürlicherweise einen bifunktionellen Charakter auf und können bei einer Blockierung des Tat-Weges eine Translokation über das Sec-System vermitteln (DeLisa *et al.*, 2003). *Vice versa*, konnte auch für das Sec-abhängige Ribosebindeprotein aus *E. coli* gezeigt werden, dass dieses bei einer Blockierung des Sec-Wegs auf den Tat-Weg ausweichen kann (Pradel *et al.*, 2003a). In der Regel wird bei einer vorliegenden Bifunktionalität des Signalpeptids jedoch der Sec-Weg kinetisch stark favorisiert (Blaudeck *et al.*, 2003). Inwiefern dies auch für den Export der Tat- und Sec-abhängigen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten zutrifft, kann allein aufgrund des Plattenassays nicht beurteilt werden. Hierfür müssten die entsprechenden Exporteffizienzen in An- und Abwesenheit der Tat-Translokase in Zellfraktionierungsstudien bestimmt werden. Die Untersuchung des MalE-Exports in einem *tat* – defizientem *E. coli* –Stamm auf Proteinebene erweist sich jedoch als problematisch. Aufgrund des fehlenden Tat-abhängigen Exports der periplasmatischen Zellwandamidasen AmiA und AmiC (Bernhardt & de Boer, 2003; Tarry *et al.*, 2009a) und des daraus resultierenden Zellwanddefekts, wird eine vorzeitige Lyse der Zellen begünstigt, sodass eine vollständige Abtrennung der PP-Fraktion von der kombinierten C/M-Fraktion kaum möglich ist.

Sowohl bei den strikt Tat-spezifischen als auch bei den Reportervarianten mit dualer Spezifität wurde die Hydrophobizität der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids durch das Einführen hydrophoberer Aminosäuren erhöht. Zuvor wurde berichtet, dass eine Erhöhung der Gesamthydrophobizität von Tat-Signalpeptiden eine Umleitung der Tat-Substrate in den Sec-Weg bewirken kann (Cristobal *et al.*, 1999). Im Falle der bifunktionalen TorA[KQ]-Signalpeptidvarianten könnte die Gesamthydrophobizität aufgrund der Mutationen in der h-Region daher einen Schwellenwert erreicht haben, ab welchem die Signalpeptide auch von den Zielsteuerungsfaktoren des Sec-Wegs erkannt und gebunden werden. Um dies zu überprüfen, wurde der GRAVY-Index für die TorA[KQ]-30aa-MalE nach Kyte & Doolittle (1982) bestimmt. Tatsächlich wiesen die TorA-Signalpeptide der Reportervarianten iKQ-Q17L, iKQ-A16V+T22I und iKQ-A16V+G19V die höchsten GRAVY-Indizes ($\geq 0,149$) auf und waren damit hydrophober als diejenigen von ausschließlich Tat-spezifisch translozierten Reporterproteinen ($\leq 0,103$).

Überraschenderweise wurde für das bifunktionale Signalpeptid der Reportervariante iKQ-G19V jedoch ein relativ niedriger GRAVY-Index (0,087) bestimmt. Offensichtlich scheinen neben einer Erhöhung der Gesamthydrophobizität noch andere Faktoren für die beobachtete duale Spezifität dieser TorA[KQ]-Signalpeptidvarianten verantwortlich zu sein. Die Analyse des Hydropathie-Plots nach Kyte & Doolittle (1982) ergab, dass bei allen bifunktionalen TorA[KQ]-Signalpeptiden auch eine N-terminale Verlängerung der h-Region durch die eingeführten Mutationen erfolgte. In diesem Zusammenhang wurde in einer Studie von Chou und Kendall (1990) gezeigt, dass eine Verringerung der Hydrophobizität eines Sec-Signalpeptids durch eine Verlängerung der h-Region zumindest partiell kompensiert werden kann (Chou & Kendall, 1990). Die beobachtete Bifunktionalität des TorA[KQ,G19V]-Signalpeptids könnte daher das Resultat einer Kombination der vergleichsweise geringfügigen Erhöhung der Gesamthydrophobizität und einer Verlängerung der h-Region darstellen.

Die Untersuchung der dualen Spezifität einiger TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit h-Region-lokalisieren Suppressormutationen hat gezeigt, dass auch stark hydrophobe TorA[KQ]-Signalpeptide produktiv mit dem Tat-System wechselwirken können. Daher kann angenommen werden, dass die generell geringe Hydrophobizität von Tat-Signalpeptiden offensichtlich keine mechanistische Voraussetzung für den Tat-abhängigen Translokationsprozess darstellt.

Im Falle von Sec-Substraten ist die Hydrophobizität des Signalpeptids entscheidend für die Wahl des Zielsteuerungsmechanismus: während stark hydrophobe Signalpeptide im Allgemeinen mit SRP interagieren und in den co-translationalen Transportweg gesteuert werden, binden weniger hydrophobe Signalsequenzen an frei im Cytoplasma vorliegendes oder ribosomal gebundenes SecA für den posttranslationalen Export über die Membran (Tsirigotaki *et al.*, 2017). Interessanterweise wurde für das TorA-Signalpeptid, welches im Vergleich zu den meisten anderen Tat-Signalpeptiden natürlicherweise eine relativ stark hydrophobe h-Region aufweist, gezeigt, dass dieses *in vitro* mit SecA produktiv interagieren und die ATPase-Aktivität stimulieren kann – jedoch bei Weitem nicht in dem gleichen Ausmaß wie Sec-Signalpeptide (Kebir & Kendall, 2002). Die Ergebnisse der Untersuchung in Kombination mit dieser Beobachtung weisen stark darauf hin, dass sich die geringere Hydrophobizität von Tat-Signalpeptiden im Vergleich zu Sec-Signalpeptiden im Laufe der Evolution nicht aus mechanistischen Gründen durchgesetzt hat, sondern vielmehr um eine Fehlsteuerung der Tat-Substrate in den Sec-Weg zu verhindern.

Dies könnte auch für das hochkonservierte Zwillingsarginin-Motiv von Tat-Signalpeptiden zutreffen. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass auch ein drastischer Austausch des Zwillingsarginins durch ein Lysin-Glutamin-Paar von dem Tat-System toleriert wird, sofern kompensatorische Mutationen eingeführt werden, welche die Hydrophobizität des Signalpeptids erhöhen. Aufgrund dessen ist es sogar denkbar, dass die starke Wechselwirkung zwischen dem Tat-Konsensusmotiv und der entsprechenden Erkennungs- und Bindestelle in TatC für die produktive Erkennung und Bindung von Tat-Substraten von herausragender Bedeutung ist, um die geringere Hydrophobizität des Signalpeptids und die daraus folgenden geringeren hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb der TatBC-Bindetasche zu kompensieren.

1.8 Die Hydrophobizität der h-Region des Signalpeptids ist von genereller Bedeutung für die Gesamtbindeaffinität von Tat-Vorläuferproteinen an den TatBC-Rezeptorkomplex

Zuletzt stellte sich die Frage, ob die neu gewonnenen Erkenntnisse spezifisch für das TorA-Signalpeptid gelten oder auch auf andere Tat-Signalpeptide übertragen werden können. Um dies zu überprüfen, wurde das neue Reporterprotein NapA-30aa-MalE konstruiert, in welchem das Signalpeptid der periplasmatischen Nitrat-Reduktase NapA aus *E. coli* über die ersten 30 Aminosäuren des reifen NapA-Proteins an den reifen Proteinanteil von MalE fusioniert wurde (siehe Kapitel IV, Abschnitt 1.10). Aufgrund der starken Hydrophobizität der nativen h-Region und dem schwachen „Sec avoidance“-Motiv in der c-Region des NapA-Signalpeptids, erfüllte das neu konstruierte Reporterprotein allerdings auch die Kriterien für eine effiziente Zielsteuerung und Wechselwirkung mit der Sec-Translokase (Cristobal *et al.*, 1999). Um einen Sec-abhängigen Export dieses Reporterproteins zu unterbinden, wurde daher das „Sec avoidance“-Motiv verstärkt, indem ein oder zwei Aminosäurereste in der c-Region durch basische Argininreste substituiert wurden. Auf diese Weise ist es gelungen ein neues Reporterprotein zu konstruieren, welches strikt Tat-spezifisch und mit hoher Effizienz ins Periplasma transloziert wird.

Um einen Exportdefekt zu kreieren, welcher als Ausgangspunkt für die geplante Mutagenesestudie dienen sollte, wurde das Zwillingsarginin im Tat-Konsensusmotiv des NapA-Signalpeptids durch ein Lysin-Glutamin-Paar substituiert. Tatsächlich konnte nachgewiesen werden, dass diese Mutation des Zwillingsarginin-Motivs, wie auch im Falle des TorA-Signalpeptids, zu einer vollständigen Inhibierung des Tat-abhängigen Exports führt. Ausgehend von dieser exportdefekten Variante des NapA-30aa-MalE-Reporterproteins wurde schließlich untersucht, ob eine Erhöhung der Gesamthydrophobizität im Signalpeptid den Export wiederherstellen kann. Hierzu wurden einerseits die Aminosäureaustausche A16V bzw. A19I und andererseits die Doppelmutation A18V+A19V in die h-Region des NapA-Signalpeptids eingeführt, wobei in jedem Fall ein schwach hydrophobes Alanin durch einen stark hydrophoben Valin- oder Isoleucinrest substituiert wurde. Die Untersuchung des Exports dieser Reportervarianten ergab, dass nur die Doppelmutation A18V+A19V den Export von NapA[KQ]-30aa-MalE signifikant wiederherstellen kann. Dadurch, dass für das TorA-Signalpeptid eine Korrelation zwischen der Gesamthydrophobizität der h-Region und der Gesamtbindeaffinität, welche wiederum funktional mit der Exporteffizienz des jeweiligen Reporterproteins verknüpft ist, nachgewiesen werden konnte (siehe Abschnitt 1.3), erscheint es nicht abwegig, dass die Zunahme der Hydrophobizität durch die Einzelaustausche A17V und A19I zu geringfügig war um den Schwellenwert für die minimale Gesamtbindeaffinität, welche für eine produktive Bindung an den TatBC-Rezeptorkomplex und folglich eine effektive Translokation erforderlich ist, zu überschreiten (Abbildung 45, schwarze gestrichelte Linien). Während im Falle des TorA[KQ]-Signalpeptids eine einzige Substitution innerhalb der h-Region, welche die Hydrophobizität geringfügig erhöhte, ausreichte, um einen signifikanten Export von TorA[KQ]-30aa-MalE zu erlauben, müssen im NapA[KQ]-Signalpeptid zwei stark hydrophobe Aminosäurereste in die h-Region eingeführt

werden, um den Export von NapA[KQ]-30aa-MalE zumindest partiell wiederherzustellen. Dies deutet darauf hin, dass sich die KQ-Mutation des Zwillingsarginin-Motivs weitaus drastischer auf die Gesamtbindeaffinität des NapA-Signalpeptids im Vergleich zum TorA-Signalpeptid auswirkt (Abbildung 45, vgl. violette mit grauer Linie).

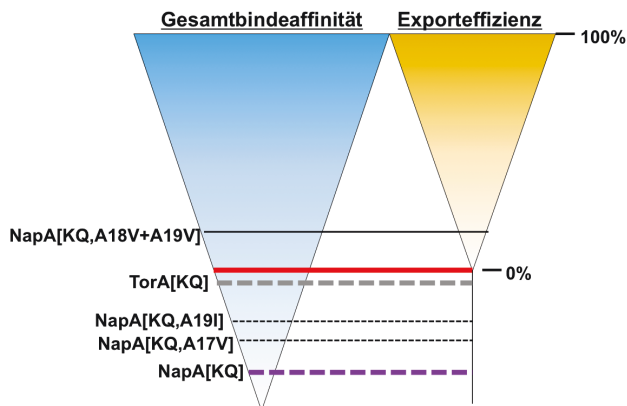


Abbildung 45: Schematische Darstellung der Auswirkung von Mutationen in der h-Region des NapA[KQ]-Signalpeptids auf die Gesamtbindeaffinität und folglich auf die Exporteffizienz von NapA[KQ]-30aa-MalE. Dargestellt ist der funktionale Zusammenhang zwischen der Bindeaffinität des Signalpeptids und der Exporteffizienz des Reporterproteins. Bei einer Exporteffizienz von 0% liegt der Schwellenwert für die minimale Bindeaffinität, welcher für eine produktive Bindung überschritten werden muss (rote Linie). Die violette gestrichelte Linie markiert das NapA[KQ]-30aa-MalE-Reporterprotein und die graue gestrichelte Linie den TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporter. Die übrigen schwarzen Linien stellen die verschiedenen NapA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit der h-Region-lokalisierten Einzelmutteration A17V bzw. A19I sowie der Doppelmutteration A18V+A19V dar.

Unabhängig davon welche genaue Auswirkung die inaktivierende KQ-Mutation auf die Gesamtbindeaffinität des NapA[KQ]-Signalpeptids hat, konnte gezeigt werden, dass die durch den Verlust des Zwillingsarginins verringerte Bindeaffinität durch eine ausreichende Erhöhung der Gesamthydrophobizität der h-Region kompensiert werden kann. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen, welche für das TorA-Signalpeptid erhalten wurden. Aufgrund dessen kann postuliert werden, dass die neuen Erkenntnisse über das TorA-Signalpeptid hinaus auch auf andere Tat-Signalpeptide generalisiert werden können.

2 Untersuchung der Rolle des frühen reifen Proteinanteils in der Tat-abhängigen Proteintranslokation

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die h-Region von Tat-Signalpeptiden, neben dem Tat-Konsensusmotiv, eine weitere wichtige Bindungsdeterminante von Tat-Vorläuferproteinen an den TatBC-Rezeptorkomplex darstellt. Nun wurde überprüft, ob und inwiefern auch der frühe reife Proteinanteil von Tat-Substraten eine Rolle im Bindeprozess an den TatBC-Rezeptorkomplex spielt.

Bislang ist über die Funktion der (frühen) reifen Domänen von Vorläuferproteinen im Tat-abhängigen Translokationsprozess nur sehr wenig bekannt. Mehrere Crosslinking-Experimente haben allerdings gezeigt, dass aufgrund der tiefen Haarnadel-ähnlichen Insertion des Signalpeptids während der „advanced-stage“-Bindung wahrscheinlich auch der frühe reife Proteinanteil von Tat-Vorläuferproteinen innerhalb der TatBC-Bindetasche positioniert ist (u.a. Blümmel *et al.*, 2015) (Abbildung 46 A).

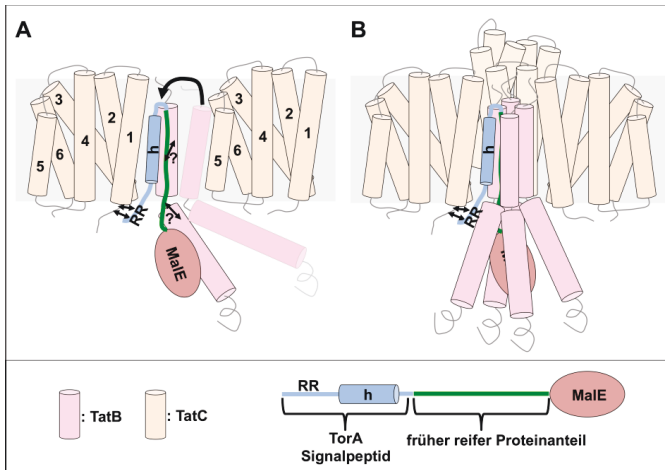


Abbildung 46: Modell einer möglichen Interaktion von TorA-30aa-MalE mit dem TatBC-Rezeptorkomplex. (A) Dargestellt ist die „advanced-stage“-Bindung des TorA-Signalpeptids an die TatBC-Bindetasche, welche eine Konformationsänderung im TatBC-Rezeptorkomplex induziert (schwarzer Pfeil). Die Interaktionen zwischen dem frühen reifen Proteinanteil (grün) und TatB sind rein spekulativ. (B) Dargestellt sind vier TatB-Monomere, welche den inneren Kern des TatBC-Rezeptorkomplexes bilden. Jede TMH von TatB kontaktiert jeweils ein TatC-Protomer, wobei die APHs den reifen gefalteten Proteinanteil umschließen. Das vordere TatC-Molekül wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. Modell basiert auf den Angaben und Darstellungen in Maurer *et al.* (2010).

Nach Engelman & Seitz (1981) besteht die Haarnadel-Struktur von inserierten Signalpeptiden extracytosolischer Proteine aus zwei Helices. Dabei bildet das Signalpeptid eine der beiden Helices aus und ist so innerhalb der Membran orientiert, dass sich der hydrophile N-Terminus im Cytoplasma befindet. Das Signalpeptid zieht darauf hin polare Bereiche des Proteins in die Membran, welche die zweite Helix der Haarnadel darstellen (Engelman & Steitz, 1981). Demnach würde die Länge der Membran-inserierten frühen reifen Proteinregion ungefähr der der transmembranen h-Region und c-Region des Signalpeptids entsprechen.

In diesem Zusammenhang wurden von Alami *et al.* (2003) Kontakte zwischen TatB und einer Aminosäureposition im frühen reifen Proteinanteil des Sufl-Vorläuferproteins identifiziert, welche sich über 20 Aminosäuren von der Signalpeptidspaltstelle entfernt befindet. In der tiefer gehenden Crosslinking-Studie von Maurer *et al.* (2010) wurde gezeigt, dass sich auch mehrere Oberflächen-exponierte Aminosäuren im gefalteten reifen Proteinanteil von Sufl in unmittelbarer Nähe zu TatB befinden. Im Vergleich hierzu konnten keine Kontakte zwischen TatB und solchen Aminosäurepositionen, welche sich im Inneren des gefalteten Proteins befinden, nachgewiesen werden. Wurde der Crosslinker an mehreren Positionen in der amphipathischen Helix von TatB platziert, so konnten *vice versa* auch Crosslinking-Produkte zwischen TatB und dem Sufl-Vorläuferprotein detektiert werden. Da die beobachteten Kontakte strikt von einem intakten Zwillingsarginin-Motiv – nicht jedoch von der PMK – abhängig waren, wurde angenommen, dass diese TatB-Sufl-Wechselwirkungen nach der Insertion des Tat-Substrats in die TatBC-Bindetasche während der „advanced-stage“-Bindung und vor dem PMK-abhängigen Translokationsschritt über die Membran stattfinden (Maurer *et al.*, 2010). Diese kombinierten Ergebnissen weisen stark darauf hin, dass der gefaltete Proteinanteil von Tat-Substraten während des Tat-abhängigen Translokationsprozesses vorübergehend von den amphipathischen Helices der TatB-Monomere des TatBC-Rezeptorkomplexes in einer Käfig-ähnlichen Weise umschlossen wird (Abbildung 46 B). Inwiefern es sich bei den Kontakten zwischen den cytoplasmatischen Domänen von TatB und dem reifen Proteinanteil von Tat-Substraten um Wechselwirkungen handelt, welche signifikant zur produktiven Bindung des Vorläuferproteins beitragen, ist bislang

noch nicht untersucht worden. Dennoch bietet der (frühe) reife Proteinanteil von Tat-Substraten aufgrund dieser Positionierung des Tat-Vorläuferproteins während der „*advanced-stage*“-Bindung an die Tat-Translokase eine große Kontaktfläche mit zahlreichen potentiellen Interaktionsstellen für die Aminosäurereste der transmembranen und cytoplasmatisch-lokalisierten Regionen der Komponenten des TatBC-Rezeptorkomplexes. Aufgrund dessen wurde spekuliert, dass neben dem Signalpeptid auch der (frühe) reife Proteinanteil von Tat-Substraten in den Bindeprozess an den TatBC-Rezeptorkomplex involviert sein könnte. Diese Annahme stellte den Ausgangspunkt für den zweiten Teil der vorliegenden Arbeit dar.

2.1 Mutationen im frühen reifen Proteinanteil können den Exportdefekt der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervariante signifikant supprimieren

Um direkt zu überprüfen, ob der (frühe) reife Proteinanteil von Tat-Substraten signifikant zur produktiven Bindung an den TatBC-Rezeptorkomplex beiträgt, wurden, analog zur Untersuchung der Rolle der h-Region von Tat-Signalpeptiden, Suppressormutationen in der 30aa-Region des exportdefekten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterproteins identifiziert, welche den Transport dieser Reportervariante durch die wildtypische Tat-Translokase wiederherstellen. So ist es gelungen 54 unterschiedliche Aminosäuresubstitutionen innerhalb der 30aa-Region zu isolieren, welche ein signifikantes Wachstum der entsprechenden *E. coli* –Stämme auf MMM nach spätestens 48 h erlaubten (siehe Kapitel IV, Abschnitt 2.1). Der Export der verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten ins Periplasma erfolgte hierbei strikt Tat-spezifisch.

Im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Suppressormutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids wiesen die 30aa-Region-lokalisierten Mutationen jedoch deutlich geringere Suppressionseffizienzen auf. Die stärksten Suppressormutationen waren an der Position K50 lokalisiert und führten, wie auch die Mutationen in der h-Region, jeweils hydrophobere Aminosäuren in den frühen reifen Proteinanteil ein. In diesem Fall reichte die exportierte MalE-Menge von maximal 3,2% (bezogen auf den Export des unveränderten TorA-30aa-MalE-Reporters) nicht aus, um eine Rotfärbung der Kolonien auf MCM zu induzieren. Die geringere Suppression des Exportdefekts von TorA[KQ]-30aa-MalE durch die 30aa-Region-lokalisierten Mutationen deutet darauf hin, dass der Bindung des frühen reifen Proteinanteils an den TatBC-Rezeptorkomplex im Allgemeinen schwächere Wechselwirkungen zugrunde liegen. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen der *in vitro* Crosslinking-Studie von Alami *et al.* (2003) überein. Während die Interaktionen des Sufl-Signalpeptids mit TatB von der Menge an vorliegendem TatB unabhängig waren, konnten Kontakte zwischen TatB und dem reifen Proteinanteil von Sufl nur im Falle einer starken Überexpression des *tatB*-Gens detektiert werden (Alami *et al.*, 2003).

Während die Suppression des Exportdefekts von TorA[KQ]-30aa-MalE durch die h-Region-lokalisierten Mutationen in jedem Fall auf einer Erhöhung der Gesamthydrophobizität des TorA[KQ]-Signalpeptids beruhte, scheinen sich die Suppressormutationen in der 30aa-Region interessanterweise auf zwei verschiedene Weisen auszuwirken. Die Aminosäureaustausche T44I,

D45L und K50L in der N-terminalen Hälfte der 30aa-Region führten jeweils hydrophobere Aminosäuren ein. Infolgedessen konnte eine Zunahme des GRAVY-Index nach Kyte & Doolittle, welches als Maß für die Gesamthydrophobizität einer Region gilt, für die entsprechenden mutierten 30aa-Regionen festgestellt werden (Tabelle 16) (Kyte & Doolittle, 1982). Die Einzelsubstitutionen T65R und D68R sowie die Doppelmutation T55R+T65R führten wiederum einen basischen Argininrest ein, wodurch die positive Nettoladung der 30aa-Region von +1 auf +2 (T65R) bzw. +3 (T55R+T65R, D68R) zunahm. Die positiven Ladungen verteilen sich dabei überwiegend auf die C-terminale Hälfte der 30aa-Region. Da die 30aa-Regionen der entsprechenden TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten aufgrund dieser Aminosäureaustausche nun einen hydrophileren Charakter aufweisen, kann die Suppression des Exportdefekts nicht auf eine Erhöhung der hydrophoben Wechselwirkungen zwischen dem frühen reifen Proteinanteil und dem TatBC-Rezeptorkomplex zurückgeführt werden. Die mögliche Wirkungsweise der beiden Typen 30aa-Region-lokalisierter Suppressormutationen wird in den folgenden zwei Unterkapiteln diskutiert.

Tabelle 16: Bestimmung der Nettoladung und des GRAVY-Index von Aminosäuresequenzen der mutierten 30aa-Regionen verschiedener isolierter TorA[KQ]-30aa-MalE-Varianten.

Mutation in 30aa-Region	Aminosäuresequenz der 30aa-Region (AS 40-69) von TorA[KQ]-30aa-MalE	Anzahl + Ladungen	Anzahl - Ladungen	Nettoladung	GRAVY-Index
Wt	AQAATDAVISKEGILTGSHWGAI R ATV KDG	4	3	+1	0,027
T44I	AQAA I DAVISKEGILTGSHWGAI R ATV KDG	4	3	+1	0,200
D45L	AQAATL A VISKEGILTGSHWGAI R ATV KDG	4	2	+2	0,270
K50L	AQAATDAVIS L EGILTGSHWGAI R ATV KDG	3	3	0	0,283
T55R+	AQAATDAVISKEGIL R GSHWGAI R ATV KDG	6	3	+3	-0,227
T65R	AQAATDAVISKEGILTGSHWGAI R ATV KDG	5	3	+2	-0,1
D68R	AQAATDAVISKEGILTGSHWGAI R ATV KRG	5	2	+3	-0,007

Aufgeführt sind die Aminosäuresequenzen der 30aa-Regionen verschiedener TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten, welche Mutationen (fett und unterstrichen) enthalten, die den Exportdefekt supprimieren. Die positiv geladenen Aminosäuren K, R und H wurden rot markiert und die negativ geladenen Aminosäurereste D und E grün. Die Nettoladung stellt die Summe der positiven und negativen Ladungen innerhalb der frühen reifen Proteinregion dar. Zusätzlich wurde für die aufgeführten Aminosäuresequenzen der GRAVY-Index nach Kyte & Doolittle (1982) bestimmt.

Diese ersten Ergebnisse zeigen bereits, dass Suppressormutationen nicht nur in der h-Region des Signalpeptids, sondern auch im frühen reifen Proteinanteil den Verlust des hochkonservierten Zwillingarginins zumindest partiell kompensieren und den Export des TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterproteins wiederherstellen können. Dies impliziert wiederum eine direkte Wechselwirkung zwischen dem frühen reifen Proteinanteil von TorA und der Tat-Translokase. Daher kann ausgeschlossen werden, dass diese Region von Tat-Vorläuferproteinen lediglich eine Passagierdomäne darstellt, welche eine ausschließlich passive Rolle im Tat-abhängigen Translokationsprozess spielt.

2.2 Mutationen in der N-terminalen Hälfte der 30aa-Region supprimieren den Exportdefekt von TorA[KQ]-30aa-MalE durch Erhöhung der Gesamthydrophobizität des frühen reifen Proteinanteils

Im Falle der stärksten Suppressormutationen in der N-terminalen Hälfte der 30aa-Region des TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterproteins wurden hydrophile Aminosäuren durch jeweils hydrophobere Aminosäurereste substituiert (T44I, D45L, K50L). Aufgrund der Lage dieser Aminosäurepositionen ist es nicht abwegig, dass diese in ähnlicher Weise wie die h-Region-lokalisierten Suppressormutationen die hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb der TatBC-Bindetasche beeinflussen (Abbildung 47).

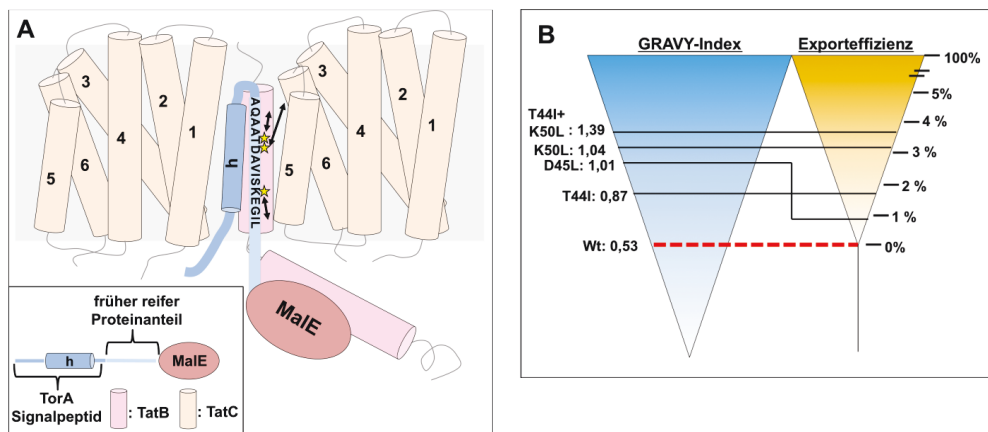


Abbildung 47: Schematische Darstellung der Wirkungsweise der Suppressormutationen in der N-terminalen Hälfte der 30aa-Region von TorA[KQ]-30aa-MalE. (A) Eingezeichnet sind die ersten 15 Aminosäuren des reifen TorA-Proteinanteils, welche wahrscheinlich innerhalb der TatBC-Bindetasche lokalisiert sind. Die Positionen der Aminosäureaustausche T44I, D45L und K50L sind durch gelbe Sterne markiert. Die schwarzen Pfeile deuten mögliche hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den neu eingeführten hydrophoberen Aminosäuren im frühen reifen Proteinanteil und der TMH von TatB bzw. der periplasmatischen Hälfte der TMH-5/TMH-6 von TatC an. (B) Angedeutet ist ein funktionaler Zusammenhang zwischen der Hydrophobizität der Membran-inserierten N-terminalen Hälfte der 30aa-Region und der Exporteffizienz der entsprechenden TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten. Als Maß für die Hydrophobizität gilt der GRAVY-Index nach Kyte & Doolittle (1982), welcher für die N-terminale Hälfte der mutierten 30aa-Regionen der Reportervarianten iKQ-T44I, iKQ-D45L, iKQ-K50L, iKQ-T44I+K50L bestimmt wurde. Die rote gestrichelte Linie markiert die unveränderte 30aa-Region der Negativkontrolle TorA[KQ]-30aa-MalE.

Das in Abbildung 47 A dargestellte Bindemodell zeigt eine mögliche Positionierung der ersten 15 Aminosäuren der 30aa-Region innerhalb der TatBC-Bindetasche. Es ist denkbar, dass diese frühe reife Proteinregion die zweite Helix der Haarnadel-Struktur ausbildet, welche in einer $N_{out}-C_{in}$ -Orientierung parallel zur TMH von TatB ausgerichtet wird. Infolgedessen könnten die neu eingeführten hydrophoberen Aminosäuren die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen dem frühen reifen Proteinanteil und der TMH von TatB bzw. der periplasmatisch-orientierten Hälfte der TMH-5/TMH-6 von TatC verstärken, welche sich in räumlicher Nähe zum Tat-Vorläuferprotein während der „advanced-stage“-Bindung befindet (siehe Abschnitt 1.5). Infolgedessen würde die Bindeaffinität des normalerweise exportdefekten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterproteins ausreichend erhöht werden, sodass der kritische Schwellenwert für die minimale Gesamtbindeaffinität überschritten und eine produktive Bindung wiederhergestellt wird. Für die h-

Region des TorA[KQ]-Signalpeptids wurde zuvor gezeigt, dass die Gesamthydrophobizität dieser Region mit der Translokationseffizienz der jeweiligen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervariante korreliert (siehe Abschnitt 1.3). Vergleicht man die GRAVY-Indizes für die ersten 15 Aminosäuren der 30aa-Regionen der Reportervarianten iKQ-T44I (0,87), iKQ-D65L (1,01), iKQ-K50L (1,04) sowie iKQ-T44I+K50L (1,39) mit den entsprechenden Exporteffizienzen, so kann in nahezu allen Fällen ebenfalls ein funktionaler Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern beobachtet werden (Abbildung 47 B). Mit Ausnahme des Reporterproteins iKQ-D45L steigt die Exporteffizienz der übrigen Reportervarianten mit zunehmender Hydrophobizität der N-terminalen Hälfte der 30aa-Region. Die Variante iKQ-D45L weist im Vergleich zum Reporterprotein iKQ-T44I trotz höherer Gesamthydrophobizität des frühen reifen Proteinanteils eine geringere Exporteffizienz auf. Dies könnte auf sterische Effekte zurückgeführt werden. Wie im Falle der h-Region-lokalisierten Mutationen muss auch bei Aminosäureaustauschen innerhalb der 30aa-Region von einer Auswirkung auf die Konformation des Membran-inserierten Anteils des TorA[KQ]-30aa-Reporterproteins ausgegangen werden, wodurch sich bestimmte Aminosäurereste nun in größerer Entfernung zu der jeweiligen Interaktionsstelle im TatBC-Rezeptorkomplex befinden könnten.

Wurden die 30aa-Region-lokalisierten Mutationen, welche die Hydrophobizität erhöhen, entweder miteinander oder mit den zuvor beschriebenen Mutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids kombiniert, so konnte generell ein additiver Effekt auf die Exporteffizienz von TorA[KQ]-30aa-MalE beobachtet werden. Weiterhin konnte auch für die Mutationen in der 30aa-Region eine synergistische Zusammenwirkung mit der Mutation L9F in TatC bei der Suppression des Exportdefekts nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen aus dem ersten Teil dieser Arbeit, dass intragene Mutationen im exportdefekten Vorläuferprotein und extragene Mutationen im TatBC-Rezeptorkomplex, welche die Wechselwirkungen innerhalb der TatBC-Bindetasche während der „advanced-stage“-Bindung des Substrats verstärken, miteinander bei der Wiederherstellung des Tat-abhängigen Transports kooperieren und eine verbesserte Adaptation des mutierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterproteins an die TatBC-Bindetasche bewirken.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen zudem, dass zur Aktivierung der Tat-Translokase für die Translokation des Substrats über die Membran die Bindeaffinität des C-terminal liegenden frühen reifen Proteinanteils sogar entscheidend sein kann. Wurde die Bindeaffinität des Signalpeptids aufgrund der Mutation des Zwillingsarginins so stark reduziert, dass die für den Translokationsschritt essentielle Konformationsänderung im TatBC-Rezeptorkomplex nicht ausgelöst werden kann, kann die zu schwache Bindung des Signalpeptids durch eine Erhöhung der Bindeaffinität des frühen reifen Proteinanteils kompensiert werden.

Neben einer direkten Beteiligung des frühen reifen Proteinanteils von Tat-Substraten an der produktiven Bindung an den TatBC-Rezeptorkomplex kommt für diese Proteinregion auch eine Funktion bei der Zielsteuerung und initialen Erkennung des Vorläuferproteins durch die Tat-Translokase in Frage. Für das Sec-System wurde von Gouridis *et al.* (2009) bereits gezeigt, dass

Sec-Substrate auch ohne ein Signalpeptid mit hoher Affinität an den SecA-SecYEG-Komplex binden können. Das Vorhandensein eines Signalpeptids erhöht zwar weiter die Affinität des Sec-Substrats, jedoch besteht dessen essentielle Funktion in der allosterischen Aktivierung der Sec-Translokase für den Transport des extracytosolischen Proteins über die Membran (Gouridis *et al.*, 2009). Die aktuelle Studie von Huang *et al.* (2017) liefert erste Hinweise, dass auch in den reifen Proteindomänen von Tat-Substraten zusätzliche Zielsteuerungsinformationen kodiert vorliegen. Dabei wurde gezeigt, dass die Tat-abhängig translozierte Zellwandamidase AmiA auch in Abwesenheit eines Signalpeptids zur Tat-Translokase gesteuert und durch die mutierte TatAB[F13Y]C-Translokase ins Periplasma transportiert werden kann. Die Mutation F13Y verringert dabei die Affinität der TMH von TatB für die Tata/TatB-Bindestelle in TatC und imitiert dadurch die notwendigen Konformationsänderungen im TatBC-Rezeptorkomplex, welche normalerweise nur durch eine Substratbindung mit ausreichender Affinität induziert werden würden (Huang *et al.*, 2017).

Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass die Hydrophobizität des frühen reifen Proteinanteils offensichtlich für die Gesamtbindeaffinität und folglich auch für die Translokationseffizienz eine Rolle spielt, könnte spekuliert werden, dass es sich bei diesen Zielsteuerungssignalen in der reifen Proteindomäne um hydrophobe Abschnitte handelt, welche mit hydrophoben Regionen der Tat-Translokase wechselwirken. Solche hydrophoben Sequenzen wurden kürzlich auch in der Arbeit von Chatzi *et al.* (2017) als Zielsteuerungssignale in einem Sec-Substrat identifiziert. Es wurde gezeigt, dass der reife Proteinanteil der Sec-abhängig translozierten alkalischen Phosphatase PhoA multiple hydrophobe Abschnitte aufweist, welche an die SecA-Komponente der Translokase binden. Die Deletion oder Mutation aller hydrophoben Bereiche führte zu einer deutlichen Verringerung der Affinität des Substrats für SecA. Diese hydrophoben Abschnitte im reifen Proteinanteil spielten jedoch nicht nur für die Bindung an SecA eine Rolle, sondern wurden auch für den Translokationsschritt über die Membran benötigt. Extracytosolische Proteine ohne Zielsteuerungssignale im reifen Proteinanteil werden zwar aufgrund ihrer Signalpeptide zur Sec-Translokase gesteuert, werden jedoch weder *in vitro* noch *in vivo* transportiert. *Vice versa*, reichen auch die Zielsteuerungssequenzen in den reifen Proteindomänen nicht für eine Translokation aus. Demnach werden sowohl das Signalpeptid als auch die Zielsteuerungssignale im reifen Proteinanteil zur Aktivierung der Sec-Translokase und folglich zum Export über die Membran benötigt (Chatzi *et al.*, 2017). Im Falle des Tat-spezifischen Substrats AmiA, welches ohne ein Signalpeptid durch eine mutierte Tat-Translokase exportiert werden konnte, wurde die Funktion des Signalpeptids offensichtlich durch die TatB-Mutation F13Y übernommen, welche die Tat-Translokase für den Translokationsschritt aktivierte (Huang *et al.*, 2017).

Normalerweise würden diese hydrophoben Abschnitte im Inneren gefalteter Proteine lokalisiert sein. Da Sec-Substrate allerdings in ungefalteter Konformation zur Sec-Translokase geleitet werden, sind die hydrophoben Sequenzen auf der Oberfläche exponiert, sodass diese mit den hydrophoben Bindestellen in SecA interagieren können. Im Falle von TorA[KQ]-30aa-MalE,

welches vollständig gefaltet zur Tat-Translokase dirigiert wird, ist es allerdings wahrscheinlicher, dass hydrophile Aminosäurereste als solche Zielsteuerungsssignale im reifen Proteinanteil fungieren. Einen ersten Hinweis darauf lieferte die Isolierung von Suppressormutationen in der C-terminalen Hälfte der 30aa-Region, welche die Hydrophilie des frühen reifen Proteinanteils erhöhten.

2.3 Mutationen in der C-terminalen Hälfte der 30aa-Region supprimieren den Exportdefekt von TorA[KQ]-30aa-MalE durch Erhöhung der positiven Nettoladung des frühen reifen Proteinanteils

Interessanterweise wurden in der C-terminalen Hälfte der 30aa-Region (Positionen T55 bis G69) von TorA[KQ]-30aa-MalE auch Mutationen isoliert, welche anstelle jeweils hydrophoberer Aminosäurereste basische Aminosäuren einführen. In diesen Fällen kann die Suppression des Exportdefekts von TorA[KQ]-30aa-MalE daher nicht auf eine Erhöhung der Gesamthydrophobizität des frühen reifen Proteinanteils zurückgeführt werden. Folglich erscheint es wenig wahrscheinlich, dass diese Mutationen die Wechselwirkungen innerhalb der hydrophoben TatBC-Bindetasche beeinflussen. Betrachtet man das in Abbildung 47 A (Abschnitt 2.2) dargestellte Bindemodell ist es denkbar, dass die C-terminale Hälfte der 30aa-Region bereits außerhalb der TatBC-Bindetasche im Cytoplasma lokalisiert ist. Infolgedessen könnte diese Proteinregion von TorA[KQ]-30aa-MalE mit den cytoplasmatischen Domänen von TatB(C) interagieren.

Die Einzelsubstitutionen T65R und D68R bewirkten jeweils einen signifikanten Export des TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterproteins, welcher ein langsames Wachstum der entsprechenden *E. coli* -Stämme mit Maltose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle nach bereits 24 h ermöglichte, und wurden demnach der stärksten Suppressorgruppe zugeordnet (siehe Kapitel IV, Abschnitt 2.1). Dass basische Aminosäuren im distalen Abschnitt der 30aa-Region von der Tat-Translokase offensichtlich favorisiert werden, wurde durch die Isolierung der spontanen Doppelmutation T55R+T65R verdeutlicht, in welcher zwei ungeladene Threoninreste durch jeweils einen positiv geladenen Argininrest substituiert wurden. Offensichtlich erfolgt die Suppression des Exportdefekts von TorA[KQ]-30aa-MalE hierbei durch eine Erhöhung der positiven Nettoladung des frühen reifen Proteinanteils. Diese Ergebnisse unterscheiden sich grundlegend von jenen, welche bei der Untersuchung der Rolle des frühen reifen Proteinanteils von Sec-Substraten bei der Sec-abhängigen Translokation erzielt wurden.

Betrachtet man zunächst die Aminosäuresequenzen der frühen reifen Proteinregion verschiedener Sec- und Tat-Substrate aus *E. coli*, so lassen sich deutliche Unterschiede in der Nettoladung feststellen (Tabelle 17). Mit Ausnahme des äußeren Membranproteins OmpA und der Thiol-Disulfid-Oxidoreduktase DsbA heben sich die positiven und negativen Ladungen der ersten 30 Aminosäuren des reifen Proteinanteils von Sec-abhängig translozierten Substraten in der Regel auf, sodass die Nettoladung der frühen reifen Proteindomäne Null beträgt. Werden nur die ersten zehn Aminosäuren des reifen Proteins berücksichtigt, so liegt in allen Fällen keine positive Nettoladung vor. Im Gegensatz hierzu weist der frühe reife Proteinanteil von authentischen Tat-

Substraten tendenziell eine positive Gesamtladung auf, welche, wie im Falle von AmiA, sogar +6 betragen kann. In diesem Zusammenhang wurde in mehreren Studien gezeigt, dass die Einführung zusätzlicher positiver Ladungen in den N-Terminus des reifen Proteinanteils von Sec-Substraten einen Export über den Sec-Weg drastisch reduzieren oder sogar vollständig verhindern kann (Li *et al.*, 1988; Yamane & Mizushima, 1988). Infolgedessen fungiert die vergleichsweise höhere Anzahl an basischen Aminosäuren im reifen Proteinanteil von Tat-Substraten auch als ein zusätzliches „Sec avoidance“-Motiv, welches eine Fehlleitung in den Sec-abhängigen Translokationsweg unterbindet (Tullman-Ercek *et al.*, 2007). Dadurch, dass in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass sich die Einführung zusätzlicher basischer Aminosäuren positiv auf die Effizienz der Tat-abhängigen Translokation auswirkt, ist es unwahrscheinlich, dass sich eine höhere positive Nettoladung des frühen reifen Proteinanteils im Laufe der Evolution lediglich aus dem Grund durchgesetzt hat, um eine Zielsteuerung des Tat-Substrats in den Sec-Weg zu verhindern.

Tabelle 17: Nettoladung des frühen reifen Proteinanteils verschiedener Sec- und Tat-Substrate aus *E. coli*.

<i>E. coli</i> Substrat	Ersten 30 Aminosäuren des reifen Proteinanteils	Anzahl + Ladungen	Anzahl - Ladungen	Nettoladung
Sec				
MalE	KIEEGKLVIWINGDKGYNGLAEGVKKFEKD	6	6	0
PhoA	RTPEMPVLENRAAQSDITAPGGARRLTGDQ	4	4	0
LamB	VDFHGYARSGIGWTGSGGEQQCFQTGAQS	2	2	0
OmpA	APKDNWTYTGAKLGSQYHDTGFINNNGPT	3	2	+1
DsbA	AQYEDGKQYTTLEKPVAGAPQVLEFFSFFC	2	4	-2
MglB	ADTRIGVTIYKYDDNFMSVVRAIEQDAKA	5	5	0
Tat				
TorA	AQAATDAVISKEGILTGSHWGAIKATVKDG	4	3	+1
SufI	AGQQQLPVPPLLESRRGQPLFMTVQRAHW	4	1	+3
AmiA	KDEPLKTSNGHSPKAKKSGGKRVVVLDPG	9	3	+6
DmsA	VDSAIPKSGDEKVIWSACTVNCGSRCPLRM	4	3	+1
NapA	VVGQGEAIKWDKAPCFCGTGCGVLVGTQQ	3	2	+1
YnfE	AVQQAAREKVVWGACSVNCGSRCALRLHVKD	6	2	+4
HyaA	LENKPRIPVWVHGLETCCTESFIRSAHP	5	3	+2
FdnG	QARNYKLLRAKEIRNTCTYCSVGCGLLMYS	5	1	+4

Aufgeführt sind die Aminosäuresequenzen der frühen reifen Proteindomänen verschiedener Sec- und Tat-Substrate aus *E. coli*, welche aus den ersten 30 Aminosäuren des reifen Proteinanteils bestehen. Die positiv geladenen Aminosäuren K, R und H wurden rot markiert und die negativ geladenen Aminosäurereste D und E grün. Die Nettoladung stellt die Summe der positiven und negativen Ladungen innerhalb der frühen reifen Proteinregion dar.

Die geringe Toleranz der Sec-Translokase für basische Aminosäuren im frühen reifen Protein kann mehrere Gründe haben. Mehrere frühe Studien haben gezeigt, dass positive Ladungen in der n-Region des Signalpeptids sowie eine neutrale oder negative Nettoladung im N-Terminus des reifen Proteins als topologische Determinanten agieren, welche für die korrekte transmembrane Orientierung des Signalpeptids vom Cytoplasma ins Periplasma ($N_{in}C_{out}$ -Topologie) während des Sec-abhängigen Translokationsprozesses eine Rolle spielen (von Heijne, 1986; Yamane & Mizushima, 1988). Die positiv geladenen Aminosäurereste in der n-Region des Signalpeptids sind gemäß der „positive inside“-Regel von Gunnar von Heijne, welche sich auf die Ergebnisse statistischer Analysen der Verteilung von geladenen Aminosäuren in den

cytoplasmatischen und periplasmatischen Segmenten von Membranproteinen stützt, auf der cytoplasmatischen Seite der Membran lokalisiert (von Heijne & Gavel, 1988; von Heijne, 1992). Unmittelbar auf die n-Region folgt die h-Region, welche das transmembrane Segment ausbildet. Im Einklang mit der Regel von von Heijne befinden sich aufgrund der $N_{in}C_{out}$ -Orientierung der h-Region die c-Region des Signalpeptids sowie der N-Terminus des reifen Proteinanteils mit neutraler bzw. negativer Nettoladung auf der periplasmatischen Seite der Membran. Mehrere frühe Studien weisen darauf hin, dass durch die Verringerung der Nettoladung der n-Region des Signalpeptids bzw. Erhöhung der Gesamtladung des frühen reifen Proteinanteils eine Insertion des Sec-Signalpeptids mit einer korrekten $N_{in}C_{out}$ -Orientierung, welche eine Voraussetzung für die Einleitung des Exportprozesses darstellt, nicht mehr möglich ist (Iino *et al.*, 1987; Li *et al.*, 1988; Puziss *et al.*, 1989; Puziss *et al.*, 1992; Yamane & Mizushima, 1988). Dadurch, dass im Falle des TorA-30aa-MalE-Proteins eine höhere Anzahl positiver Ladungen im frühen reifen Proteinanteil vielmehr zu einer Erhöhung der Translokationseffizienz führte, erscheint eine Auswirkung der 30aa-Region-lokalisierten Mutationen auf die transmembrane Orientierung des TorA-Signalpeptids eher unwahrscheinlich.

Andere Studien suggerieren, dass die Einführung positiver Ladungen in den frühen reifen Proteinanteil die Wechselwirkungen des Sec-Substrats mit der Sec-Translokase beeinflussen könnte. Andersson und von Heijne beschrieben die ersten 30 Aminosäuren des reifen Proteins als die sogenannte „Translokations-Initiations-Domäne“, welche für eine effiziente Translokation des Sec-Substrats von Bedeutung ist (Andersson & von Heijne, 1991). Die produktive Interaktion dieser Proteinregion mit bestimmten Komponenten der Sec-Translokase, wahrscheinlich SecA (Gouridis *et al.*, 2009; Lill *et al.*, 1990), könnte gegenüber einer Anhäufung positiver Ladungen anfällig sein (Yoshihisa & Ito, 1996). Dies steht im Einklang mit den neuen Erkenntnissen aus der Arbeit von Chatzi *et al.* (2017), dass die spezifischen Wechselwirkungen zwischen dem reifen Proteinanteil und SecA eher hydrophober Natur sind.

Aufgrund der gefalteten Struktur von TorA[KQ]-30aa-MalE würden der Bindung der (frühen) reifen Proteindomäne an die cytoplasmatischen Domänen der Tat-Translokase hingegen überwiegend elektrostatische Wechselwirkungen zwischen geladenen Aminosäureresten und/oder Wasserstoffbrückenbindungen zwischen polaren Aminosäuren zugrunde liegen. Dies würde auch die beobachtete Zunahme der Translokationseffizienz der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten erklären, in welche zusätzliche geladene Argininreste eingeführt wurden. Folglich könnte für die isolierten Suppressormutationen in der C-terminalen Hälfte der 30aa-Region einerseits angenommen werden, dass durch die Einführung basischer Aminosäuren die Bindung des Reporterproteins an die cytoplasmatischen Domänen von TatB (Maurer *et al.*, 2010) verstärkt wird, wodurch die Gesamtbindeaffinität ausreichend erhöht wird, um eine produktive Interaktion von TorA[KQ]-30aa-MalE mit dem TatBC-Rezeptorkomplex während der „advanced-stage“-Bindung zu erlauben. Andererseits könnten die hydrophilen Aminosäurereste, analog zu den hydrophoben Abschnitten in den reifen Proteindomänen von Sec-Substraten (Chatzi *et al.*, 2017), auch als Zielsteuerungssignale agieren und zur initialen Erkennung und Bindung des Tat-

Substrats durch die Tat-Translokase beitragen. In beiden Fällen erfolgt eine spezifische Wechselwirkung zwischen dem reifen Proteinanteil und der Tat-Translokase, sodass von einer direkten Beteiligung dieser Proteinregion des Tat-Substrats am Bindeprozess ausgegangen werden kann.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern somit die ersten Hinweise darauf, dass der frühe reife Proteinanteil von Tat-Vorläuferproteinen, neben dem Tat-Konsensusmotiv und der h-Region des Signalpeptids, eine weitere wichtige Bindungsdeterminante von Tat-Vorläuferproteinen an den TatBC-Rezeptorkomplex darstellt und daher eine aktive Rolle im Tat-abhängigen Translokationsprozess spielt.

3 Auswirkung der Ergebnisse auf das derzeitige Modell des Tat-abhängigen Translokationsprozesses

In Kapitel II, Abschnitt 3.4 wurde das bisherige Modell des Tat-abhängigen Translokationsprozesses beschrieben, welches das Vorhandensein eines Argininpaares im Tat-Konsensusmotiv des Signalpeptids voraussetzt. Im Rahmen der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente erfolgte die Translokation verschiedener Reporterproteine jedoch in Abwesenheit eines intakten Zwillingsarginin-Motivs. Im Folgenden wird daher unter Berücksichtigung aller neu gewonnenen Erkenntnisse ein neues Modell für die Erkennung und Bindung der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten durch die Tat-Translokase vorgeschlagen. Dieses in Abbildung 48 (am Ende dieses Abschnitts) dargestellte Modell ähnelt in einigen Aspekten dem zweistufigen Bindemodell, welches bereits in den Arbeiten von Panahandeh *et al.* (2008) und Gerard & Cline (2007) beschrieben wurde.

Im ersten Schritt nähern sich die Tat-Vorläuferproteine entweder direkt aus dem Cytoplasma (Abbildung 48 A, Schritt 1a) oder in membrangebundener Form dem TatBC-Rezeptorkomplex (Abbildung 48 A, Schritt 1b), an welchem die erste spezifische Wechselwirkung zwischen dem Tat-Substrat und der Tat-Translokase erfolgt (Bageshwar *et al.*, 2009; Hou *et al.*, 2006; Shanmugham *et al.*, 2006). Anschließend wird das Tat-Vorläuferprotein von den cytoplasmatischen Domänen des TatBC-Rezeptorkomplexes erkannt und gebunden (Abbildung 48 A, Schritt 2). Abweichend von dem Modell von Alami *et al.* (2003) wird postuliert, dass der Primärererkennungsschritt nicht strikt von dem Vorhandensein eines intakten Zwillingsarginin-Motivs im Signalpeptid abhängig ist, sondern einen größeren Bereich berücksichtigt, welcher auch andere Aminosäuren der n- und h-Region des Signalpeptids sowie des (frühen) reifen Proteinanteils umfasst. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass die weniger stark konservierten Aminosäurereste des Tat-Konsensusmotivs sehr wahrscheinlich ebenfalls zur Erkennung des Signalpeptids durch den TatBC-Rezeptorkomplex beitragen (Lausberg *et al.*, 2012; Mendel *et al.*, 2008; Stanley *et al.*, 2000). Darüber hinaus wurde von Alami *et al.* (2003) berichtet, dass Kontakte zwischen der h-Region des Sufl-Signalpeptids und TatB auch nach der Substitution des Zwillingsarginins durch ein Zwillingslysin im Tat-Konsensusmotiv nachgewiesen werden können. Weiterhin wurde in der Arbeit von McDevitt *et al.* (2006) gezeigt, dass das Sufl-

Vorläuferprotein mit der KK-Mutation im Zwillingsarginin-Motiv, welches *in vitro* zwar nicht Tat-abhängig über die Membran transportiert wird, mit dem TatBC-Rezeptorkomplex jedoch cogereinigt werden kann. Schließlich demonstrierte die Studie von Panahandeh *et al.* (2008), dass das artifizielle Tat-Substrat TorA-PhoA mit einem Zwillingslysin im Tat-Konsensusmotiv sogar in ungefalteter Konformation an den TatBC-Rezeptorkomplex binden kann. Auch in diesem Fall erfolgte die Translokation über die Membran nur in Anwesenheit eines intakten Zwillingsarginin-Motivs und nach vollständiger Faltung. Im Einklang mit den Ergebnissen der Crosslinking-Experimente, welche mit den verschiedenen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit h-Region-lokalisierten Suppressormutationen durchgeführt wurden, befanden sich die Aminosäurereste an der Zwillingsarginin-Position des exportdefekten, reduzierten TorA-PhoA-Vorläuferproteins trotz der Bindung an die Tat-Translokase nicht in unmittelbarer Nähe zu TatB/TatC (Panahandeh *et al.*, 2008). Das aufgrund dieser Ergebnisse postulierte zweistufige Bindemodell von Panahandeh *et al.* (2008) nimmt an, dass die Bindung des Zwillingsarginins durch TatC erst nach einer initialen, vom Zwillingsarginin-Motiv unabhängigen, Interaktion des Tat-Substrats mit der Tat-Translokase erfolgt. Die Ergebnisse der beschriebenen Studien unterstützen daher die Annahme, dass in die initiale Wechselwirkung mit der Tat-Translokase andere Regionen des Tat-Substrats involviert sind und dass für die erste Assoziation des Tat-Substrats mit dem TatBC-Rezeptorkomplex infolgedessen kein intaktes Zwillingsarginin-Motiv im Signalpeptid erforderlich ist.

In Übereinstimmung mit dem zweistufigen Bindemodell von Panahandeh *et al.* (2008) wird nun vorgeschlagen, dass die initiale Wechselwirkung des TorA[KQ]-30aa-MalE-Vorläuferproteins mit den cytoplasmatischen Domänen des TatBC-Rezeptorkomplexes eine Konformationsänderung des Rezeptors auslöst, welche zu einer Haarnadel-ähnlichen Insertion des TorA[KQ]-Signalpeptids in die Membran führt (Abbildung 48 A, Schritt 3). Kürzlich wurde gezeigt, dass solche Konformationsänderungen, welche durch die Substratbindung induziert werden, für die Verdrängung von TatB von der gemeinsamen TatA/TatB-Bindestelle in TatC verantwortlich sind. Durch die Verschiebung von TatB wird die Bindung zwischen der TMH von TatB und dem polaren Cluster der TMH-5/TMH-6 von TatC gebrochen, wodurch die PMF-abhängige Rekrutierung von TatA an den Substrat-beladenen TatBC-Rezeptorkomplex ermöglicht und die Tat-Translokase für die darauffolgende Translokation des Substrats über die Membran aktiviert wird (Alcock *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2017). Um eine solche Konformationsänderung des TatBC-Rezeptorkomplexes auszulösen, welche zum TatB/TatA-Austausch führt, muss die Bindeaffinität des Tat-Substrats allerdings ausreichend hoch sein. Das zweistufige Bindemodell von Panahandeh *et al.* (2008) besagt, dass erst bei dem Insertionsschritt des Signalpeptids in die TatBC-Bindetasche das Zwillingsarginin-Motiv in räumlicher Nähe zu Tat(B)C positioniert wird. Im Falle des unveränderten TorA-30aa-MalE-Reporterproteins wird durch die hochaffine Bindung des Zwillingsarginins an TatC der Schwellenwert für die minimale Bindeaffinität überschritten, sodass die für den Translokationsschritt über die Membran essentielle Konformationsänderung des TatBC-Rezeptorkomplexes ausgelöst wird (siehe Kapitel II, Abschnitt 3.4, Abbildung 6, Schritt 6).

Im Falle des exportdefekten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterproteins wird angenommen, dass die schwache Bindung des TorA[KQ]-Signalpeptids an die TatBC-Bindetasche aufgrund der fehlenden Wechselwirkungen zwischen dem KQ-Paar im Tat-Konsensusmotiv und TatC höchstens zu einer Abschwächung der TatB/TatC-Interaktion führt. Da die Translokation über die Membran infolgedessen nicht initiiert wird, erfolgt die Freisetzung des TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterproteins zurück ins Cytoplasma (Abbildung 48 B, Schritt 3a). Die fehlenden Kontakte zwischen dem TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterprotein und dem periplasmatisch-orientierten Teil des TatBC-Rezeptorkomplexes weisen darauf hin, dass die Membraninsertion dieser Reportervariante nur einen kurzlebigen Übergangszustand darstellen könnte, welcher keine effiziente Ausbildung von Crosslinking-Produkten mit TatB/TatC erlaubt. Möglich ist auch, dass die Insertion in diesem Fall nicht tief genug in die TatBC-Bindetasche erfolgt. Im Gegensatz hierzu konnte in den durchgeführten Crosslinking-Experimenten eine „*advanced-stage*“ –Bindung des Signalpeptids der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit h-Region-lokalisierten Suppressormutationen tief innerhalb der TatBC-Bindetasche nachgewiesen werden. Abweichend zum Modell von Panahandeh *et al.* (2008) wurden jedoch auch nach der Insertion dieser Reporterproteine keine Kontakte zum N-Terminus von TatC detektiert, welche auf eine Interaktion von TatC mit dem Tat-Konsensusmotiv hinweisen würden. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen stark darauf hin, dass die isolierten Suppressormutationen in der h-Region nach der Insertion des TorA[KQ]-Signalpeptids die fehlende Wechselwirkung zwischen dem KQ-Paar und TatC sehr wahrscheinlich durch die Verstärkung der hydrophoben Wechselwirkungen zwischen dem Signalpeptid und der hydrophoben TatBC-Bindetasche kompensieren und dadurch die produktive Bindung der normalerweise exportdefekten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten wiederherstellen (Abbildung 48 B, Schritt 3b). Diese Schlussfolgerung wird durch die Ergebnisse weiterer Crosslinking-Studien von Alami *et al.* (2003) und Blümmel *et al.* (2015) bekräftigt. In diesen wurde gezeigt, dass Kontakte zwischen mehreren Aminosäurepositionen in der h-Region des Sufl- bzw. TorA-Signalpeptids und TatB strikt von der Anwesenheit von TatC abhängig waren. Da diese nach der Dissipation der PMK nach wie vor nachgewiesen werden konnten, finden diese Interaktionen sehr wahrscheinlich nach der Insertion des Signalpeptids in die TatBC-Bindetasche und vor dem PMK-abhängigen Translokationsschritt über die Membran statt (Alami *et al.*, 2003; Blümmel *et al.*, 2015). Für die isolierten Suppressormutationen in der N-terminalen Hälfte der 30aa-Region von TorA[KQ]-30aa-MalE, welche die Hydrophobizität des frühen reifen Proteinanteils erhöhen, wird postuliert, dass sich diese auf die gleiche Weise auf die hydrophoben Interaktionen innerhalb der TatBC-Bindetasche auswirken wie die h-Region-lokalisierten Suppressormutationen (Abbildung 48 B, Schritt 3c). Im Einklang mit den Ergebnissen der Crosslinking-Studien von Maurer *et al.* (2010), welche auf eine Umschließung des reifen Proteinanteils von den amphipathischen Helices der TatB-Monomere des TatBC-Rezeptorkomplexes unmittelbar vor dem Translokationsschritt über die Membran hinweisen, stabilisieren die weiter distal liegenden Suppressormutationen im cytoplasmatisch-lokalisierten frühen reifen Proteinanteil des TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterproteins wahrscheinlich die Bindung

des Tat-Vorläuferproteins an die cytoplasmatischen Domänen des TatBC-Rezeptorkomplexes (Abbildung 48 B, Schritt 3d). In allen Fällen wird die Bindeaffinität des TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterproteins an den TatBC-Rezeptorkomplex ausreichend erhöht, sodass der kritische Schwellenwert überschritten und die für den Export essentielle Konformationsänderung im TatBC-Rezeptorkomplex induziert wird. Folglich geht dieses Modell der Erkennung und Bindung von Tat-Substraten durch die Tat-Translokase davon aus, dass die Qualität der Bindung – gemessen an der Anzahl aller Bindungskontakte zwischen dem Tat-Substrat und dem TatBC-Rezeptorkomplex – erst nach der Insertion des Signalpeptids in die TatBC-Bindetasche überprüft wird. Liegt – wie im Falle des TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporterproteins mit unmutagenisierter h-Region im Signalpeptid bzw. 30aa-Region – keine ausreichende Anzahl an Bindungskontakten vor, wird das Substrat wieder ins Cytosol freigesetzt.

In der vorliegenden Arbeit wurde somit zum ersten Mal demonstriert, dass das hochkonservierte Zwillingsarginin im Tat-Konsensusmotiv von Tat-Signalpeptiden für einen signifikanten Tat-abhängigen Export über die Membran nicht zwingend benötigt wird, sofern kompensatorische Mutationen im Signalpeptid oder im frühen reifen Proteinanteil vorliegen, welche die Bindung des Tat-Substrats an den TatBC-Rezeptorkomplex an einer anderen Position außerhalb des Zwillingsarginin-Motivs verstärken. Dennoch ist es sehr wahrscheinlich, dass eine effiziente Primärerkenntnis und Bindung des unveränderten Tat-Konsensusmotivs durch TatC die Translokationseffizienz des Tat-Substrats positiv beeinflusst. Diese hochaffine Bindung, welche über die gesamte Dauer des Translokationsprozesses bestehen bleibt (Gerard & Cline, 2006), kann durch die alleinige Verstärkung der hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb der TatBC-Bindetasche oder der Interaktionen zwischen dem reifen Proteinanteil und den cytoplasmatischen Regionen des TatBC-Rezeptorkomplexes nicht erreicht werden. Daher stellt das Zwillingsarginin-Motiv zweifellos die wichtigste, jedoch nicht die einzige Bindungsdeterminante von Tat-Vorläuferproteinen an den TatBC-Rezeptorkomplex dar. In dieser Arbeit konnte erstmalig demonstriert werden, dass, neben dem Tat-Konsensusmotiv, auch die h-Region des Tat-Signalpeptids sowie der (frühe) reife Proteinanteil von Tat-Substraten signifikant zur produktiven Bindung an den TatBC-Rezeptorkomplex beitragen.

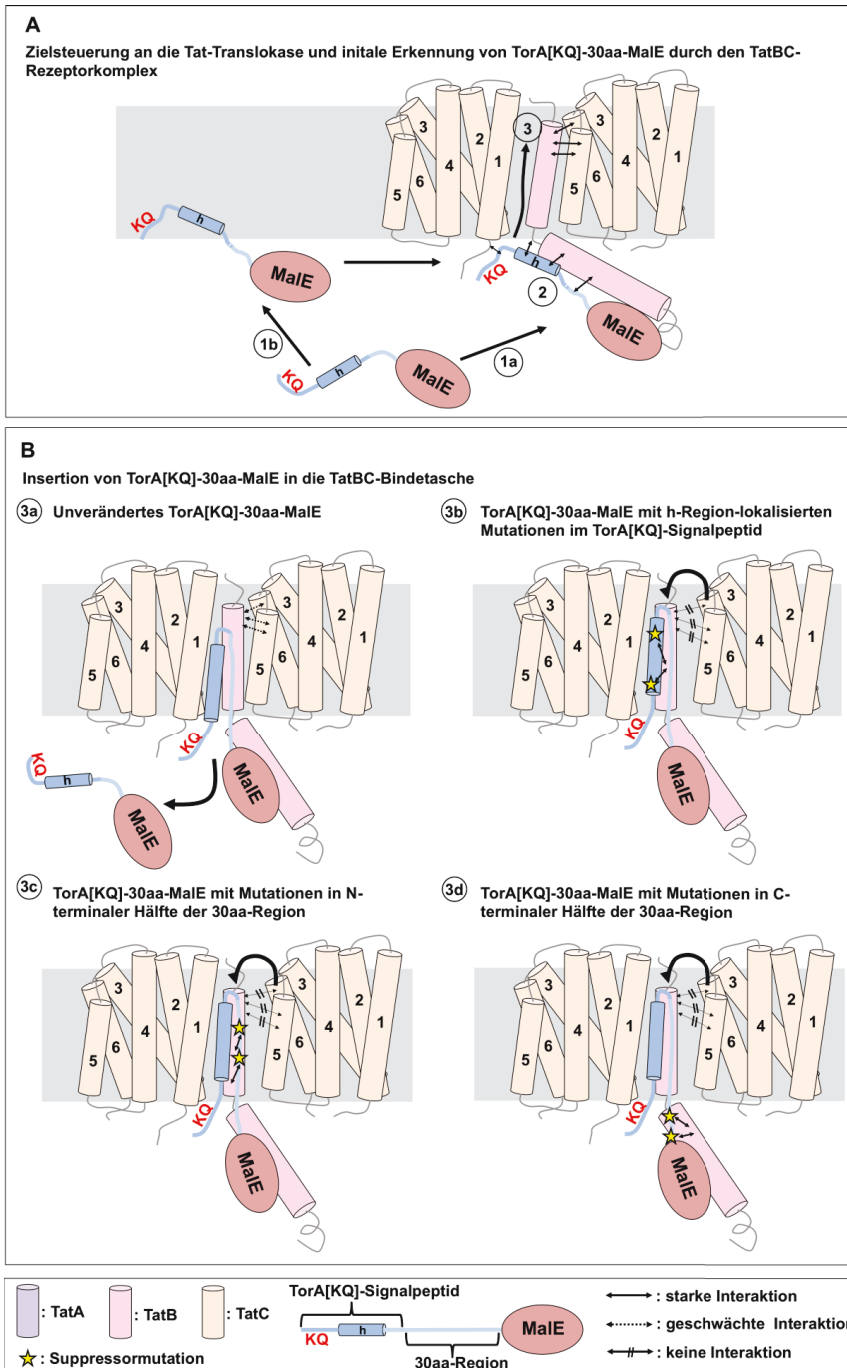


Abbildung 48: Modell der Erkennung und Bindung der mutierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten durch die Tat-Translokase. Dargestellt sind die Schritte der (A) Zielsteuerung (1a, 1b) und initialen Erkennung (2) sowie (B) Insertion (3a, 3b, 3c, 3d) des mutierten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporters in die TatBC-Bindetasche. Im Falle des unveränderten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporters (3a) erfolgt eine Freisetzung des Vorläuferproteins zurück ins Cytoplasma (schwarzer dicker Pfeil). Im Falle der TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit h-Region (3b)- bzw. 30aa-Region-lokalisierten (3c, 3d) Suppressormutationen ist die Gesamtbindeaffinität ausreichend hoch, um die essentielle Konformationsänderung (symbolisiert durch schwarzen dicken Pfeil) des TatBC-Rezeptorkomplexes auszulösen. Eine ausführliche Beschreibung der einzelnen Teilschritte ist im Text vorzufinden.

VI. Zusammenfassung

Die Tat-Translokase besitzt die besondere Fähigkeit Proteine in vollständig gefalteter Konformation über die Plasmamembran von Bakterien zu transportieren. Im Vergleich zum gut untersuchten Sec-System sind viele Aspekte des Tat-abhängigen Translokationsmechanismus allerdings noch unerforscht. Im Fokus dieser Arbeit stand der Bindeprozess von Tat-Vorläuferproteinen an den TatBC-Rezeptorkomplex, welcher einen zentralen Schritt im Translokationsprozess darstellt. Eine erfolgreiche Translokation über die Membran setzt eine produktive Interaktion des Substrats mit dem TatBC-Rezeptorkomplex voraus. Die meisten Studien zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Tat-Substraten und dem TatBC-Rezeptorkomplex konzentrierten sich bislang weitgehend auf das Tat-Konsensusmotiv mit dem hochkonservierten Zwillingsarginin in der n-Region des Tat-Signalpeptids, welches zweifelsfrei die wichtigste Bindungsdeterminante von Tat-Vorläuferproteinen an den TatBC-Rezeptorkomplex darstellt. Bis zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit war unklar, ob und welche weiteren Bereiche des Tat-Signalpeptids und/oder des reifen Proteinanteils zur Gesamtbindeaffinität des Tat-Substrats beitragen.

Vorhergehende Untersuchungen in dieser Arbeitsgruppe ergaben dass, neben einem intakten Zwillingsarginin-Motiv, auch eine minimale ununterbrochene hydrophobe (h-) Region im Tat-Signalpeptid für den Tat-abhängigen Export in *Escherichia coli* benötigt wird. Diese Ergebnisse implizieren, dass eine bestimmte Mindestlänge der h-Region für eine produktive Wechselwirkung des Tat-Substrats mit dem TatBC-Rezeptorkomplex erforderlich ist. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe genetischer Ansätze unter der Verwendung des TorA-MalE-Reportersystems die direkte Beteiligung der h-Region des TorA-Signalpeptids am Bindeprozess an den TatBC-Rezeptorkomplex untersucht. Ausgehend von der exportdefekten Reportervariante TorA[KQ]-30aa-MalE, in welcher das Zwillingsarginin durch ein Lysin-Glutamin-Paar (KQ) substituiert wurde, ist es gelungen Suppressormutationen in der h-Region des TorA[KQ]-Signalpeptids zu identifizieren, welche den Verlust der wichtigen Bindungskontakte an der Zwillingsarginin-Position zumindest partiell kompensieren und den Tat-abhängigen Export dieses Reporterproteins signifikant wiederherstellen konnten. Durch Kombinationen dieser Mutationen konnte der Export des normalerweise Transport-inkompetenten Reporters erheblich gesteigert werden, wodurch eine synergistische Zusammenwirkung dieser Mutationen bei der Suppression des Exportdefekts von TorA[KQ]-30aa-MalE demonstriert wurde. Interessanterweise wurde durch jede dieser Suppressormutationen die Gesamthydrophobizität der h-Region erhöht. Des Weiteren konnte eine positive Korrelation zwischen der Hydrophobizität der h-Region und der Translokationseffizienz der jeweiligen TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervariante festgestellt werden. Es wurde angenommen, dass durch die Einführung hydrophober Aminosäuren in die h-Region des Signalpeptids die Substrat-Rezeptor-Wechselwirkungen während der sogenannten „advanced-stage“-Bindung des Tat-Vorläuferproteins tief innerhalb der hydrophoben TatBC-Bindetasche verstärkt werden, wodurch die Gesamtbindeaffinität des normalerweise exportdefekten TorA[KQ]-30aa-MalE-Reporters erhöht und eine produktive Bindung wiederhergestellt wird. Um diese Annahme, die eine direkte Beteiligung der h-Region an der produktiven TatBC-Rezeptorbindung impliziert, experimentell zu überprüfen, wurden ortsspezifische *in vitro* Crosslinking-Experimente durchgeführt. Diese haben gezeigt, dass die TorA[KQ]-30aa-MalE-Reportervarianten mit h-Region-lokalisierten Suppressormutationen trotz der KQ-Mutation des Zwillingsarginins - im Gegensatz zur Negativkontrolle mit unveränderter h-Region - tief in die TatBC-Bindetasche inserieren. Dadurch wurde bestätigt, dass die Suppressormutationen in der h-Region eine „advanced-stage“-Bindung des Signalpeptids vermitteln und sich daher direkt auf den Bindungsschritt des TorA-Signalpeptids an den TatBC-Rezeptorkomplex nach dessen Insertion in die TatBC-Bindetasche und vor der Translokation über die Membran auswirken. Diese Ergebnisse zeigen somit, dass die h-Region von Tat-Signalpeptiden, neben dem Tat-Konsensusmotiv, eine weitere wichtige Bindungsdeterminante von Tat-Vorläuferproteinen an den TatBC-Rezeptorkomplex darstellt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob der frühe reife Proteinanteil von Tat-Substraten ebenfalls zur Gesamtbindeaffinität an den TatBC-Rezeptorkomplex beiträgt. Dabei wurden Suppressormutationen in der frühen reifen Proteinregion von TorA[KQ]-30aa-MalE (in den ersten 30 auf das Signalpeptid folgenden Aminosäuren, d.h. der 30aa-Region) identifiziert, welche den Export dieser Reportervariante durch eine Erhöhung der Gesamthydrophobizität oder der positiven Nettoladung des frühen reifen Proteinanteils signifikant wiederherstellen konnten. Während die neu eingeführten hydrophoberen Aminosäuren in der N-terminalen Hälfte der 30aa-Region analog zu den h-Region-lokalisierten Suppressormutationen sehr wahrscheinlich die hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb der TatBC-Bindetasche verstärken, wird durch zusätzliche positiv geladene Aminosäurereste in der C-terminalen Hälfte der 30aa-Region die Bindeaffinität des Vorläuferproteins an die cytoplasmatischen Domänen des TatBC-Rezeptorkomplexes erhöht. In beiden Fällen erfolgt eine spezifische Wechselwirkung des frühen reifen Proteinanteils mit der Tat-Translokase, sodass von einer direkten Beteiligung dieser Region des Tat-Substrats am Bindeprozess ausgegangen werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde somit zum ersten Mal demonstriert, dass das hochkonservierte Zwillingsarginin im Tat-Konsensusmotiv von Tat-Signalpeptiden für einen Tat-abhängigen Export über die Membran nicht zwingend benötigt wird, sofern kompensatorische Mutationen in der h-Region des Signalpeptids oder im frühen reifen Proteinanteil vorliegen, welche die Bindung des Tat-Substrats an den TatBC-Rezeptorkomplex an einer anderen Position außerhalb des Zwillingsarginin-Motivs verstärken. Daher stellen die h-Region und der frühe reife Proteinanteil von Tat-Substraten - neben dem Tat-Konsensusmotiv – weitere wichtige Bindungsdeterminanten des Tat-Substrats an den TatBC-Rezeptorkomplex dar.

VII. Summary

The Tat translocase has the remarkable ability to transport fully folded proteins across the cytoplasmic membrane of bacteria. In contrast to the well-studied Sec system, many aspects of the Tat-dependent translocation mechanism are still unexplored. The present work was focused on the binding step of Tat precursor proteins to the TatBC receptor complex, which is a crucial part of the translocation process. A productive interaction between the Tat substrate and the TatBC receptor complex is required for a successful translocation across the membrane. Most studies of the interactions between Tat substrates and the TatBC receptor complex focused primarily on the Tat consensus motif in the n-region of the Tat signal peptide containing two highly conserved twin arginine residues, which are indisputably the most important binding determinants of Tat precursor proteins to the TatBC substrate receptor. However, it remained unclear whether other regions of the Tat signal peptide and/or the early mature protein region also contribute to the overall binding of the Tat substrate to TatBC.

Previous studies of this working group revealed that, besides an intact twin arginine motif, a minimal uninterrupted hydrophobic (h-) region in the signal peptide is required for effective Tat-dependent export in *Escherichia coli*. These results suggested that a certain minimum length of the h-region is required to establish a productive interaction between the Tat substrate and the TatBC receptor complex. In the first part of the present work, the direct participation of the hydrophobic core of the signal peptide of the reporter protein TorA-30aa-MalE in the binding process to the TatBC receptor complex was investigated using a genetic approach. Using an export-defective reporter variant TorA[KQ]-30aa-MalE, in which the twin arginine residues had been substituted by a lysine-glutamine pair (KQ), as starting point for the mutagenesis study, suppressing mutations in the h region of the TorA[KQ] signal peptide were identified, which compensated to a certain degree for the loss of the important binding contact at the twin arginine position and significantly restored the Tat-dependent export. Combinations of these mutations strongly increased the export demonstrating that the h-region-located mutations synergistically act together in promoting export of the otherwise transport-incompetent TorA[KQ]-30aa-MalE precursor protein. Interestingly, all of these mutations increased the overall hydrophobicity of the h-region. Furthermore, a positive correlation between the hydrophobicity and the translocation efficiency of the respective TorA[KQ]-30aa-MalE reporter variant could be observed. These results indicated that the newly introduced hydrophobic amino acid residues in the h-region enhanced the substrate-receptor-interactions within the hydrophobic TatBC binding cavity at the stage of advanced binding, thereby sufficiently increasing the overall binding affinity required for productive binding of the otherwise export-defective reporter variant. To directly analyze whether the h-region is in fact directly involved in productive TatBC receptor binding, site-specific *in vitro* crosslinking experiments were performed. It was shown that – in contrast to the negative control harboring an unaltered h-region – the signal peptides of the mutated TorA[KQ]-30aa-MalE variants had been threaded deep into the TatBC binding cavity, even in the absence of an intact twin arginine motif. These results confirmed that the mutations in the h-region exert their effect by directly affecting the binding step of the TorA signal peptide to the TatBC receptor complex upon insertion into the TatBC binding cavity and prior to the translocation of the Tat substrate across the membrane. Taken together, the results of the first part of the present work show that, besides the Tat consensus motif, the h-region of Tat signal peptides is another important binding determinant of Tat precursor proteins to the TatBC receptor complex.

In the second part of this work, the direct contribution of the the early mature protein region of Tat substrates to the overall binding affinity to the TatBC receptor complex was investigated. Suppressing mutations in the early mature protein region of TorA[KQ]-30aa-MalE (in the 30 amino acids following the signal peptide, i.e. the 30aa-region) could be successfully identified which restored the export of the otherwise transport-incompetent reporter protein by either increasing the overall hydrophobicity or by increasing the positive net charge of the early mature protein part. While the newly introduced hydrophobic amino acids in the N-terminal part of the 30aa-region – analogous to the h-region located mutations – most likely enhanced the hydrophobic interactions within the TatBC binding cavity, the additional positively charged residues in the C-terminal half of the 30aa-region presumably increased the binding affinity of the precursor protein to the cytoplasmically localized domains of the TatBC receptor complex. In both cases, the early mature protein part interacts specifically with the Tat translocase strongly suggesting that this region of the precursor protein is also directly involved in the binding process to the TatBC receptor complex.

Taken together, the present work provides direct evidence that the highly conserved twin arginine residues in the Tat consensus motif of Tat signal peptides are not strictly required for Tat-dependent protein export across the membrane, if compensatory mutations in the h-region of the signal peptide or the early mature protein region were present which enhance binding of the Tat substrate to the TatBC receptor complex at a non-twin arginine position. The results clearly demonstrate that, besides the Tat consensus motif, the h-region of Tat signal peptides and the early mature protein region are other important binding determinants which play a pivotal role in the binding process of Tat precursor proteins to the TatBC receptor complex.

VIII. Literaturverzeichnis

Akita, M., Sasaki, S., Matsuyama, S. & Mizushima, S. (1990). SecA interacts with secretory proteins by recognizing the positive charge at the amino terminus of the signal peptide in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **265**, 8164-8169.

Akopian, D., Shen, K., Zhang, X. & Shan, S. O. (2013). Signal recognition particle: an essential protein-targeting machine. *Annu Rev Biochem* **82**, 693-721.

Alami, M., Trescher, D., Wu, L. F. & Muller, M. (2002). Separate analysis of twin-arginine translocation (Tat)-specific membrane binding and translocation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **277**, 20499-20503.

Alami, M., Luke, I., Deitermann, S., Eisner, G., Koch, H. G., Brunner, J. & Muller, M. (2003). Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in *Escherichia coli*. *Mol Cell* **12**, 937-946.

Alanen, H. I., Walker, K. L., Lourdes Velez Suberbie, M., Matos, C. F., Bönisch, S., Freedman, R. B., Keshavarz-Moore, E., Ruddock, L. W. & Robinson, C. (2015). Efficient export of human growth hormone, interferon alpha2b and antibody fragments to the periplasm by the *Escherichia coli* Tat pathway in the absence of prior disulfide bond formation. *Biochim Biophys Acta* **1853**, 756-763.

Alcock, F., Stansfeld, P. J., Basit, H., Habersetzer, J., Baker, M. A., Palmer, T., Wallace, M. I. & Berks, B. C. (2016). Assembling the Tat protein translocase. *Elife* **5**.

Aldridge, C., Ma, X., Gerard, F. & Cline, K. (2014). Substrate-gated docking of pore subunit Tha4 in the TatC cavity initiates Tat translocase assembly. *J Cell Biol* **205**, 51-65.

Andersson, H. & von Heijne, G. (1991). A 30-residue-long "export initiation domain" adjacent to the signal sequence is critical for protein translocation across the inner membrane of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9751-9754.

Angelini, S., Deitermann, S. & Koch, H. G. (2005). FtsY, the bacterial signal-recognition particle receptor, interacts functionally and physically with the SecYEG translocon. *EMBO Rep* **6**, 476-481.

Argos, P., Rao, J. K. & Hargrave, P. A. (1982). Structural prediction of membrane-bound proteins. *Eur J Biochem* **128**, 565-575.

Auclair, S. M., Bhanu, M. K. & Kendall, D. A. (2012). Signal peptidase I: cleaving the way to mature proteins. *Protein Sci* **21**, 13-25.

Avican, U., Doruk, T., Ostberg, Y., Fahlgren, A. & Forsberg, A. (2017). The Tat Substrate SufI Is Critical for the Ability of *Yersinia pseudotuberculosis* To Cause Systemic Infection. *Infect Immun* **85**.

Bachmann, J., Bauer, B., Zwicker, K., Ludwig, B. & Anderka, O. (2006). The Rieske protein from *Paracoccus denitrificans* is inserted into the cytoplasmic membrane by the twin-arginine translocase. *FEBS J* **273**, 4817-4830.

Bageshwar, U. K., Whitaker, N., Liang, F. C. & Musser, S. M. (2009). Interconvertibility of lipid- and translocon-bound forms of the bacterial Tat precursor pre-SufI. *Mol Microbiol* **74**, 209-226.

Bageshwar, U. K., VerPlank, L., Baker, D., Dong, W., Hamsanathan, S., Whitaker, N., Sacchettini, J. C. & Musser, S. M. (2016). High Throughput Screen for *Escherichia coli* Twin Arginine Translocation (Tat) Inhibitors. *PLoS One* **11**, e0149659.

- Baglieri, J., Beck, D., Vasisht, N., Smith, C. J. & Robinson, C. (2012).** Structure of TatA paralogue, TatE, suggests a structurally homogeneous form of Tat protein translocase that transports folded proteins of differing diameter. *J Biol Chem* **287**, 7335-7344.
- Barrett, C. M., Mangels, D. & Robinson, C. (2005).** Mutations in subunits of the Escherichia coli twin-arginine translocase block function via differing effects on translocation activity or tat complex structure. *J Mol Biol* **347**, 453-463.
- Beck, K., Wu, L. F., Brunner, J. & Müller, M. (2000).** Discrimination between SRP- and SecA/SecB-dependent substrates involves selective recognition of nascent chains by SRP and trigger factor. *EMBO J* **19**, 134-143.
- Beck, K., Eisner, G., Trescher, D., Dalbey, R. E., Brunner, J. & Müller, M. (2001).** YidC, an assembly site for polytopic Escherichia coli membrane proteins located in immediate proximity to the SecYE translocon and lipids. *EMBO Rep* **2**, 709-714.
- Beckwith, J. (2013).** The Sec-dependent pathway. *Res Microbiol* **164**, 497-504.
- Behrendt, J., Standar, K., Lindenstrauss, U. & Bruser, T. (2004).** Topological studies on the twin-arginine translocase component TatC. *FEMS Microbiol Lett* **234**, 303-308.
- Belin, D., Plaia, G., Boulfekhar, Y. & Silva, F. (2015).** Escherichia coli SecG is required for residual export mediated by mutant signal sequences and for SecY-SecE complex stability. *J Bacteriol* **197**, 542-552.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., Widdick, D., Palmer, T. & Brunak, S. (2005).** Prediction of twin-arginine signal peptides. *BMC Bioinformatics* **6**, 167.
- Benoit, S. L. & Maier, R. J. (2014).** Twin-arginine translocation system in Helicobacter pylori: TatC, but not TatB, is essential for viability. *MBio* **5**, e01016-01013.
- Berks, B. C. (1996).** A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol Microbiol* **22**, 393-404.
- Berks, B. C. (2015).** The twin-arginine protein translocation pathway. *Annu Rev Biochem* **84**, 843-864.
- Bernhardt, T. G. & de Boer, P. A. (2003).** The Escherichia coli amidase AmiC is a periplasmic septal ring component exported via the twin-arginine transport pathway. *Mol Microbiol* **48**, 1171-1182.
- Bernstein, H. D. & Hyndman, J. B. (2001).** Physiological basis for conservation of the signal recognition particle targeting pathway in Escherichia coli. *J Bacteriol* **183**, 2187-2197.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *NAR* **7**, 1513-1523.
- Blattner, F. R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. & Shao, Y. (1997).** The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. *Science* **277**, 1453-1462.
- Blaudeck, N., Sprenger, G. A., Freudl, R. & Wiegert, T. (2001).** Specificity of signal peptide recognition in tat-dependent bacterial protein translocation. *J Bacteriol* **183**, 604-610.
- Blaudeck, N., Kreutzenbeck, P., Freudl, R. & Sprenger, G. A. (2003).** Genetic analysis of pathway specificity during posttranslational protein translocation across the Escherichia coli plasma membrane. *J Bacteriol* **185**, 2811-2819.

- Blaudeck, N., Kreutzenbeck, P., Müller, M., Sprenger, G. A. & Freudl, R. (2005).** Isolation and characterization of bifunctional *Escherichia coli* TatA mutant proteins that allow efficient tat-dependent protein translocation in the absence of TatB. *J Biol Chem* **280**, 3426-3432.
- Blümmel, A. S., Haag, L. A., Eimer, E., Müller, M. & Fröbel, J. (2015).** Initial assembly steps of a translocase for folded proteins. *Nat Commun* **6**, 7234.
- Bogsch, E., Brink, S. & Robinson, C. (1997).** Pathway specificity for a delta pH-dependent precursor thylakoid lumen protein is governed by a 'Sec-avoidance' motif in the transfer peptide and a 'Sec-incompatible' mature protein. *EMBO J* **16**, 3851-3859.
- Bolhuis, A., Mathers, J. E., Thomas, J. D., Barrett, C. M. & Robinson, C. (2001).** TatB and TatC form a functional and structural unit of the twin-arginine translocase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **276**, 20213-20219.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Brundage, L., Hendrick, J. P., Schiebel, E., Driessen, A. J. & Wickner, W. (1990).** The purified *E. coli* integral membrane protein SecY/E is sufficient for reconstitution of SecA-dependent precursor protein translocation. *Cell* **62**, 649-657.
- Brüser, T., Deutzmann, R. & Dahl, C. (1998).** Evidence against the double-arginine motif as the only determinant for protein translocation by a novel Sec-independent pathway in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **164**, 329-336.
- Brüser, T. & Sanders, C. (2003).** An alternative model of the twin arginine translocation system. *Microbiol Res* **158**, 7-17.
- Brüser, T., Yano, T., Brune, D. C. & Daldal, F. (2003).** Membrane targeting of a folded and cofactor-containing protein. *Eur J Biochem* **270**, 1211-1221.
- Buchanan, G., Sargent, F., Berks, B. C. & Palmer, T. (2001).** 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* **177**, 107-112.
- Buchanan, G., de Leeuw, E., Stanley, N. R., Wexler, M., Berks, B. C., Sargent, F. & Palmer, T. (2002).** Functional complexity of the twin-arginine translocase TatC component revealed by site-directed mutagenesis. *Mol Microbiol* **43**, 1457-1470.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. & Short, J. M. (1987).** XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with Beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376-379.
- Calloni, G., Chen, T., Schermann, S. M., Chang, H. C., Genevoux, P., Agostini, F., Tartaglia, G. G., Hayer-Hartl, M. & Hartl, F. U. (2012).** DnaK functions as a central hub in the *E. coli* chaperone network. *Cell Rep* **1**, 251-264.
- Carrie, C., Weissenberger, S. & Soll, J. (2016).** Plant mitochondria contain the protein translocase subunits TatB and TatC. *J Cell Sci* **129**, 3935-3947.
- Castanie-Cornet, M. P., Bruel, N. & Genevoux, P. (2014).** Chaperone networking facilitates protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Biochim Biophys Acta* **1843**, 1442-1456.
- Celedon, J. M. & Cline, K. (2012).** Stoichiometry for binding and transport by the twin arginine translocation system. *J Cell Biol* **197**, 523-534.

Chaddock, A. M., Mant, A., Karnauchov, I., Brink, S., Herrmann, R. G., Klosgen, R. B. & Robinson, C. (1995). 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* **14**, 2715-2722.

Chang, Z. (2016). The function of the DegP (HtrA) protein: Protease versus chaperone. *IUBMB Life* **68**, 904-907.

Chatzi, K. E., Sardis, M. F., Karamanou, S. & Economou, A. (2013). Breaking on through to the other side: protein export through the bacterial Sec system. *Biochem J* **449**, 25-37.

Chatzi, K. E., Sardis, M. F., Tsirigotaki, A., Koukaki, M., Sostaric, N., Konijnenberg, A., Sobott, F., Kalodimos, C. G., Karamanou, S. & Economou, A. (2017). Preprotein mature domains contain translocase targeting signals that are essential for secretion. *J Cell Biol* **216**, 1357-1369.

Chen, J. (2013). Molecular mechanism of the Escherichia coli maltose transporter. *Curr Opin Struct Biol* **23**, 492-498.

Chin, J. W., Martin, A. B., King, D. S., Wang, L. & Schultz, P. G. (2002). Addition of a photocrosslinking amino acid to the genetic code of Escherichiacoli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11020-11024.

Chou, M. M. & Kendall, D. A. (1990). Polymeric sequences reveal a functional interrelationship between hydrophobicity and length of signal peptides. *J Biol Chem* **265**, 2873-2880.

Christie, P. J., Whitaker, N. & Gonzalez-Rivera, C. (2014). Mechanism and structure of the bacterial type IV secretion systems. *Biochim Biophys Acta* **1843**, 1578-1591.

Cline, K., Ettinger, W. F. & Theg, S. M. (1992). Protein-specific energy requirements for protein transport across or into thylakoid membranes. Two luminal proteins are transported in the absence of ATP. *J Biol Chem* **267**, 2688-2696.

Cline, K. & Mori, H. (2001). Thylakoid DeltapH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport. *J Cell Biol* **154**, 719-729.

Cline, K. & McCaffery, M. (2007). Evidence for a dynamic and transient pathway through the TAT protein transport machinery. *EMBO J* **26**, 3039-3049.

Cristobal, S., de Gier, J. W., Nielsen, H. & von Heijne, G. (1999). Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in Escherichia coli. *EMBO J* **18**, 2982-2990.

d'Enfert, C., Ryter, A. & Pugsley, A. P. (1987). Cloning and expression in Escherichia coli of the Klebsiella pneumoniae genes for production, surface localization and secretion of the lipoprotein pullulanase. *EMBO J* **6**, 3531-3538.

Dabney-Smith, C., Mori, H. & Cline, K. (2003). Requirement of a Tha4-conserved transmembrane glutamate in thylakoid Tat translocase assembly revealed by biochemical complementation. *J Biol Chem* **278**, 43027-43033.

Dabney-Smith, C., Mori, H. & Cline, K. (2006). Oligomers of Tha4 organize at the thylakoid Tat translocase during protein transport. *J Biol Chem* **281**, 5476-5483.

Dalbey, R. E. & Chen, M. (2004). Sec-translocase mediated membrane protein biogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1694**, 37-53.

De Buck, E., Vranckx, L., Meyen, E., Maes, L., Vandersmissen, L., Anne, J. & Lammertyn, E. (2007). The twin-arginine translocation pathway is necessary for correct membrane insertion of the Rieske Fe/S protein in Legionella pneumophila. *FEBS Lett* **581**, 259-264.

- de Cock, H. & Tommassen, J. (1991).** Conservation of components of the Escherichia coli export machinery in prokaryotes. *FEMS Microbiol Lett* **64**, 195-199.
- De Geyter, J., Tsirigotaki, A., Orfanoudaki, G., Zorzini, V., Economou, A. & Karamanou, S. (2016).** Protein folding in the cell envelope of Escherichia coli. *Nat Microbiol* **1**, 16107.
- De Leeuw, E., Porcelli, I., Sargent, F., Palmer, T. & Berks, B. C. (2001).** Membrane interactions and self-association of the TatA and TatB components of the twin-arginine translocation pathway. *FEBS Lett* **506**, 143-148.
- de Leeuw, E., Granjon, T., Porcelli, I., Alami, M., Carr, S. B., Müller, M., Sargent, F., Palmer, T. & Berks, B. C. (2002).** Oligomeric properties and signal peptide binding by Escherichia coli Tat protein transport complexes. *J Mol Biol* **322**, 1135-1146.
- DeLisa, M. P., Tullman, D. & Georgiou, G. (2003).** Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin-arginine translocation pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6115-6120.
- den Blaauwen, T., Fekkes, P., de Wit, J. G., Kuiper, W. & Driessen, A. J. (1996).** Domain interactions of the peripheral preprotein Translocase subunit SecA. *Biochemistry* **35**, 11994-12004.
- Denks, K., Vogt, A., Sachelaru, I., Petriman, N. A., Kudva, R. & Koch, H. G. (2014).** The Sec translocon mediated protein transport in prokaryotes and eukaryotes. *Mol Membr Biol* **31**, 58-84.
- Doud, S. K., Chou, M. M. & Kendall, D. A. (1993).** Titration of protein transport activity by incremental changes in signal peptide hydrophobicity. *Biochemistry* **32**, 1251-1256.
- Driessen, A. J. & Wickner, W. (1991).** Proton transfer is rate-limiting for translocation of precursor proteins by the Escherichia coli translocase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2471-2475.
- Duong, F. & Wickner, W. (1997).** Distinct catalytic roles of the SecYE, SecG and SecDFyajC subunits of preprotein translocase holoenzyme. *EMBO J* **16**, 2756-2768.
- Economou, A. & Wickner, W. (1994).** SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. *Cell* **78**, 835-843.
- Eimer, E., Fröbel, J., Blümmel, A. S. & Müller, M. (2015).** TatE as a Regular Constituent of Bacterial Twin-arginine Protein Translocases. *J Biol Chem* **290**, 29281-29289.
- Eisenberg D., W. R. M., Terwilliger T.C., Wilcox W. (1982).** Hydrophobic moments and protein structure. *Faraday Symposia of the Chemical Society* **17**, 109-120.
- Engelman, D. M. & Steitz, T. A. (1981).** The spontaneous insertion of proteins into and across membranes: the helical hairpin hypothesis. *Cell* **23**, 411-422.
- Engelman, D. M., Steitz, T. A. & Goldman, A. (1986).** Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **15**, 321-353.
- Fan, E., Chauhan, N., Udatha, D. B., Leo, J. C. & Linke, D. (2016).** Type V Secretion Systems in Bacteria. *Microbiol Spectr* **4**.
- Feilmeier, B. J., Iseminger, G., Schroeder, D., Webber, H. & Phillips, G. J. (2000).** Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in Escherichia coli. *J Bacteriol* **182**, 4068-4076.
- Fekkes, P., de Wit, J. G., van der Wolk, J. P., Kimsey, H. H., Kumamoto, C. A. & Driessen, A. J. (1998).** Preprotein transfer to the Escherichia coli translocase requires the co-operative binding of SecB and the signal sequence to SecA. *Mol Microbiol* **29**, 1179-1190.

Feltcher, M. E., Sullivan, J. T. & Braunstein, M. (2010). Protein export systems of *Mycobacterium tuberculosis*: novel targets for drug development? *Future Microbiol* **5**, 1581-1597.

Fincher, V., McCaffery, M. & Cline, K. (1998). Evidence for a loop mechanism of protein transport by the thylakoid Delta pH pathway. *FEBS Lett* **423**, 66-70.

Fluman, N., Navon, S., Bibi, E. & Pilpel, Y. (2014). mRNA-programmed translation pauses in the targeting of *E. coli* membrane proteins. *Elife* **3**.

Fröbel, J., Rose, P., Lausberg, F., Blümmel, A. S., Freudl, R. & Müller, M. (2012). Transmembrane insertion of twin-arginine signal peptides is driven by TatC and regulated by TatB. *Nat Commun* **3**, 1311.

Genest, O., Neumann, M., Seduk, F., Stöcklein, W., Mejean, V., Leimkühler, S. & Iobbi-Nivol, C. (2008). Dedicated metallochaperone connects apoenzyme and molybdenum cofactor biosynthesis components. *J Biol Chem* **283**, 21433-21440.

Genest, O., Mejean, V. & Iobbi-Nivol, C. (2009). Multiple roles of TorD-like chaperones in the biogenesis of molybdoenzymes. *FEMS Microbiol Lett* **297**, 1-9.

Gerard, F. & Cline, K. (2006). Efficient twin arginine translocation (Tat) pathway transport of a precursor protein covalently anchored to its initial cpTatC binding site. *J Biol Chem* **281**, 6130-6135.

Gerard, F. & Cline, K. (2007). The thylakoid proton gradient promotes an advanced stage of signal peptide binding deep within the Tat pathway receptor complex. *J Biol Chem* **282**, 5263-5272.

Gohlke, U., Pullan, L., McDevitt, C. A., Porcelli, I., de Leeuw, E., Palmer, T., Saibil, H. R. & Berks, B. C. (2005). The TatA component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 10482-10486.

Gouridis, G., Karamanou, S., Gelis, I., Kalodimos, C. G. & Economou, A. (2009). Signal peptides are allosteric activators of the protein translocase. *Nature* **462**, 363-367.

Grahl, S., Maillard, J., Spronk, C. A., Vuister, G. W. & Sargent, F. (2012). Overlapping transport and chaperone-binding functions within a bacterial twin-arginine signal peptide. *Mol Microbiol* **83**, 1254-1267.

Graubner, W., Schierhorn, A. & Brüser, T. (2007). DnaK plays a pivotal role in Tat targeting of CueO and functions beside SlyD as a general Tat signal binding chaperone. *J Biol Chem* **282**, 7116-7124.

Greene, N. P., Porcelli, I., Buchanan, G., Hicks, M. G., Schermann, S. M., Palmer, T. & Berks, B. C. (2007). Cysteine scanning mutagenesis and disulfide mapping studies of the TatA component of the bacterial twin arginine translocase. *J Biol Chem* **282**, 23937-23945.

Gu, S. Q., Peske, F., Wieden, H. J., Rodnina, M. V. & Wintermeyer, W. (2003). The signal recognition particle binds to protein L23 at the peptide exit of the *Escherichia coli* ribosome. *RNA* **9**, 566-573.

Guerin, J., Bigot, S., Schneider, R., Buchanan, S. K. & Jacob-Dubuisson, F. (2017). Two-Partner Secretion: Combining Efficiency and Simplicity in the Secretion of Large Proteins for Bacteria-Host and Bacteria-Bacteria Interactions. *Front Cell Infect Microbiol* **7**, 148.

Halbig, D., Wiegert, T., Blaudeck, N., Freudl, R. & Sprenger, G. A. (1999). 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* **263**, 543-551.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.

Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *E. coli*. *Glover DM (ed), DNA cloning, vol1 IRL Press, Oxford, United Kingdom*, 109-135.

Hatzixanthis, K., Palmer, T. & Sargent, F. (2003). A subset of bacterial inner membrane proteins integrated by the twin-arginine translocase. *Mol Microbiol* **49**, 1377-1390.

Hatzixanthis, K., Clarke, T. A., Oubrie, A., Richardson, D. J., Turner, R. J. & Sargent, F. (2005). Signal peptide-chaperone interactions on the twin-arginine protein transport pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 8460-8465.

Hegde, R. S. & Bernstein, H. D. (2006). The surprising complexity of signal sequences. *Trends Biochem Sci* **31**, 563-571.

Heitmann, P. (1968). A model for sulfhydryl groups in proteins. Hydrophobic interactions of the cysteine side chain in micelles. *Eur J Biochem* **3**, 346-350.

Hengge, R. & Boos, W. (1983). Maltose and lactose transport in *Escherichia coli*. Examples of two different types of concentrative transport systems. *Biochim Biophys Acta* **737**, 443-478.

Hennon, S. W., Soman, R., Zhu, L. & Dalbey, R. E. (2015). YidC/Alb3/Oxa1 Family of Insertases. *J Biol Chem* **290**, 14866-14874.

Henry, R., Carrigan, M., McCaffrey, M., Ma, X. & Cline, K. (1997). Targeting determinants and proposed evolutionary basis for the Sec and the Delta pH protein transport systems in chloroplast thylakoid membranes. *J Cell Biol* **136**, 823-832.

Hicks, M. G., de Leeuw, E., Porcelli, I., Buchanan, G., Berks, B. C. & Palmer, T. (2003). The *Escherichia coli* twin-arginine translocase: conserved residues of TatA and TatB family components involved in protein transport. *FEBS Lett* **539**, 61-67.

Hicks, M. G., Lee, P. A., Georgiou, G., Berks, B. C. & Palmer, T. (2005). Positive selection for loss-of-function tat mutations identifies critical residues required for TatA activity. *J Bacteriol* **187**, 2920-2925.

Hinsley, A. P., Stanley, N. R., Palmer, T. & Berks, B. C. (2001). A naturally occurring bacterial Tat signal peptide lacking one of the 'invariant' arginine residues of the consensus targeting motif. *FEBS Lett* **497**, 45-49.

Hoeren, F. U., Berks, B. C., Ferguson, S. J. & McCarthy, J. E. (1993). Sequence and expression of the gene encoding the respiratory nitrous-oxide reductase from *Paracoccus denitrificans*. New and conserved structural and regulatory motifs. *Eur J Biochem* **218**, 49-57.

Hoffmann, A., Becker, A. H., Zachmann-Brand, B., Deuerling, E., Bukau, B. & Kramer, G. (2012). Concerted action of the ribosome and the associated chaperone trigger factor confines nascent polypeptide folding. *Mol Cell* **48**, 63-74.

Holland, I. B. (2010). The extraordinary diversity of bacterial protein secretion mechanisms. *Methods Mol Biol* **619**, 1-20.

Holzappel, E., Eisner, G., Alami, M., Barrett, C. M., Buchanan, G., Luke, I., Betton, J. M., Robinson, C., Palmer, T., Moser, M. & Müller, M. (2007). The entire N-terminal half of TatC is involved in twin-arginine precursor binding. *Biochemistry* **46**, 2892-2898.

- Hopp, T. P. & Woods, K. R. (1981).** Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 3824-3828.
- Hou, B., Frielingsdorf, S. & Klösgen, R. B. (2006).** Unassisted membrane insertion as the initial step in DeltapH/Tat-dependent protein transport. *J Mol Biol* **355**, 957-967.
- Huang, Q., Alcock, F., Kneuper, H., Deme, J. C., Rollauer, S. E., Lea, S. M., Berks, B. C. & Palmer, T. (2017).** A signal sequence suppressor mutant that stabilizes an assembled state of the twin arginine translocase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E1958-E1967.
- Huber, D., Rajagopalan, N., Preissler, S., Rocco, M. A., Merz, F., Kramer, G. & Bukau, B. (2011).** SecA interacts with ribosomes in order to facilitate posttranslational translocation in bacteria. *Mol Cell* **41**, 343-353.
- Ignatova, Z., Hornle, C., Nurk, A. & Kasche, V. (2002).** Unusual signal peptide directs penicillin amidase from *Escherichia coli* to the Tat translocation machinery. *Biochem Biophys Res Commun* **291**, 146-149.
- Iino, T., Takahashi, M. & Sako, T. (1987).** Role of amino-terminal positive charge on signal peptide in staphylokinase export across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **262**, 7412-7417.
- Ilbert, M., Mejean, V. & Iobbi-Nivol, C. (2004).** Functional and structural analysis of members of the TorD family, a large chaperone family dedicated to molybdoproteins. *Microbiology* **150**, 935-943.
- Izard, J. W., Doughty, M. B. & Kendall, D. A. (1995).** Physical and conformational properties of synthetic idealized signal sequences parallel their biological function. *Biochemistry* **34**, 9904-9912.
- Ize, B., Gerard, F. & Wu, L. F. (2002a).** In vivo assessment of the Tat signal peptide specificity in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol* **178**, 548-553.
- Ize, B., Gerard, F., Zhang, M., Chanal, A., Voulhoux, R., Palmer, T., Filloux, A. & Wu, L. F. (2002b).** In vivo dissection of the Tat translocation pathway in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **317**, 327-335.
- Ize, B., Porcelli, I., Lucchini, S., Hinton, J. C., Berks, B. C. & Palmer, T. (2004).** Novel phenotypes of *Escherichia coli* tat mutants revealed by global gene expression and phenotypic analysis. *J Biol Chem* **279**, 47543-47554.
- Jack, R. L., Sargent, F., Berks, B. C., Sawers, G. & Palmer, T. (2001).** Constitutive expression of *Escherichia coli* tat genes indicates an important role for the twin-arginine translocase during aerobic and anaerobic growth. *J Bacteriol* **183**, 1801-1804.
- Jack, R. L., Buchanan, G., Dubini, A., Hatzixanthis, K., Palmer, T. & Sargent, F. (2004).** Coordinating assembly and export of complex bacterial proteins. *EMBO J* **23**, 3962-3972.
- Jani, A. J. & Cotter, P. A. (2010).** Type VI secretion: not just for pathogenesis anymore. *Cell Host Microbe* **8**, 2-6.
- Jones, A. S., Austerberry, J. I., Dajani, R., Warwicker, J., Curtis, R., Derrick, J. P. & Robinson, C. (2016).** Proofreading of substrate structure by the Twin-Arginine Translocase is highly dependent on substrate conformational flexibility but surprisingly tolerant of surface charge and hydrophobicity changes. *Biochim Biophys Acta* **1863**, 3116-3124.
- Jong, W. S., ten Hagen-Jongman, C. M., Genevaux, P., Brunner, J., Oudega, B. & Luirink, J. (2004).** Trigger factor interacts with the signal peptide of nascent Tat substrates but does not play a critical role in Tat-mediated export. *Eur J Biochem* **271**, 4779-4787.

- Jongbloed, J. D., Grieger, U., Antelmann, H., Hecker, M., Nijland, R., Bron, S. & van Dijk, J. M. (2004).** Two minimal Tat translocases in *Bacillus*. *Mol Microbiol* **54**, 1319-1325.
- Kang, D. H., Ghoo, Y. S., Suh, M. K. & Kang, C. H. (2002).** Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *B Kor Chem Soc* **23**, 1511-1512.
- Karamyshev, A. L. & Johnson, A. E. (2005).** Selective SecA association with signal sequences in ribosome-bound nascent chains: a potential role for SecA in ribosome targeting to the bacterial membrane. *J Biol Chem* **280**, 37930-37940.
- Kauer, J. C., Erickson-Viitanen, S., Wolfe, H. R., Jr. & DeGrado, W. F. (1986).** p-Benzoyl-L-phenylalanine, a new photoreactive amino acid. Photolabeling of calmodulin with a synthetic calmodulin-binding peptide. *J Biol Chem* **261**, 10695-10700.
- Kebir, M. O. & Kendall, D. A. (2002).** SecA specificity for different signal peptides. *Biochemistry* **41**, 5573-5580.
- Kihara, A., Akiyama, Y. & Ito, K. (1995).** FtsH is required for proteolytic elimination of uncomplexed forms of SecY, an essential protein translocase subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4532-4536.
- Knoblauch, N. T., Rüdiger, S., Schönfeld, H. J., Driessen, A. J., Schneider-Mergener, J. & Bukau, B. (1999).** Substrate specificity of the SecB chaperone. *J Biol Chem* **274**, 34219-34225.
- Koch, H. G., Hengelage, T., Neumann-Haefelin, C., MacFarlane, J., Hoffschulte, H. K., Schimz, K. L., Mechler, B. & Müller, M. (1999).** In vitro studies with purified components reveal signal recognition particle (SRP) and SecA/SecB as constituents of two independent protein-targeting pathways of *Escherichia coli*. *Mol Biol Cell* **10**, 2163-2173.
- Koch, H. G. & Müller, M. (2000).** Dissecting the translocase and integrase functions of the *Escherichia coli* SecYEG translocon. *J Cell Biol* **150**, 689-694.
- Koch, S., Fritsch, M. J., Buchanan, G. & Palmer, T. (2012).** *Escherichia coli* TatA and TatB proteins have N-out, C-in topology in intact cells. *J Biol Chem* **287**, 14420-14431.
- Kol, S., Nouwen, N. & Driessen, A. J. (2008).** Mechanisms of YidC-mediated insertion and assembly of multimeric membrane protein complexes. *J Biol Chem* **283**, 31269-31273.
- Kostecki, J. S., Li, H., Turner, R. J. & DeLisa, M. P. (2010).** Visualizing interactions along the *Escherichia coli* twin-arginine translocation pathway using protein fragment complementation. *PLoS One* **5**, e9225.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., 2nd & Peterson, K. M. (1995).** Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**, 175-176.
- Kreutzenbeck, P., Kroger, C., Lausberg, F., Blaudeck, N., Sprenger, G. A. & Freudl, R. (2007).** *Escherichia coli* twin arginine (Tat) mutant translocases possessing relaxed signal peptide recognition specificities. *J Biol Chem* **282**, 7903-7911.
- Kuzniatsova, L., Winstone, T. M. & Turner, R. J. (2016).** Identification of protein-protein interactions between the TatB and TatC subunits of the twin-arginine translocase system and respiratory enzyme specific chaperones. *Biochim Biophys Acta* **1858**, 767-775.
- Kyte, J. & Doolittle, R. F. (1982).** A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**, 105-132.

- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lausberg, F., Fleckenstein, S., Kreutzenbeck, P., Frobel, J., Rose, P., Muller, M. & Freudl, R. (2012).** Genetic evidence for a tight cooperation of TatB and TatC during productive recognition of twin-arginine (Tat) signal peptides in *Escherichia coli*. *PLoS One* **7**, e39867.
- Lavander, M., Ericsson, S. K., Broms, J. E. & Forsberg, A. (2006).** The twin arginine translocation system is essential for virulence of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Immun* **74**, 1768-1776.
- Leake, M. C., Greene, N. P., Godun, R. M., Granjon, T., Buchanan, G., Chen, S., Berry, R. M., Palmer, T. & Berks, B. C. (2008).** Variable stoichiometry of the TatA component of the twin-arginine protein transport system observed by in vivo single-molecule imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 15376-15381.
- Lee, H. C., Portnoff, A. D., Rocco, M. A. & DeLisa, M. P. (2014).** An engineered genetic selection for ternary protein complexes inspired by a natural three-component hitchhiker mechanism. *Sci Rep* **4**, 7570.
- Lee, P. A., Buchanan, G., Stanley, N. R., Berks, B. C. & Palmer, T. (2002).** Truncation analysis of TatA and TatB defines the minimal functional units required for protein translocation. *J Bacteriol* **184**, 5871-5879.
- Lee, P. A., Orriss, G. L., Buchanan, G., Greene, N. P., Bond, P. J., Punginelli, C., Jack, R. L., Sansom, M. S., Berks, B. C. & Palmer, T. (2006a).** Cysteine-scanning mutagenesis and disulfide mapping studies of the conserved domain of the twin-arginine translocase TatB component. *J Biol Chem* **281**, 34072-34085.
- Lee, P. A., Tullman-Ercek, D. & Georgiou, G. (2006b).** The bacterial twin-arginine translocation pathway. *Annu Rev Microbiol* **60**, 373-395.
- Li, H., Faury, D. & Morosoli, R. (2006).** Impact of amino acid changes in the signal peptide on the secretion of the Tat-dependent xylanase C from *Streptomyces lividans*. *FEMS Microbiol Lett* **255**, 268-274.
- Li, P., Beckwith, J. & Inouye, H. (1988).** Alteration of the amino terminus of the mature sequence of a periplasmic protein can severely affect protein export in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 7685-7689.
- Lill, R., Dowhan, W. & Wickner, W. (1990).** The ATPase activity of SecA is regulated by acidic phospholipids, SecY, and the leader and mature domains of precursor proteins. *Cell* **60**, 271-280.
- Lindenstrauss, U., Matos, C. F., Graubner, W., Robinson, C. & Brüser, T. (2010).** Malfolded recombinant Tat substrates are Tat-independently degraded in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **584**, 3644-3648.
- Liu, C. C. & Schultz, P. G. (2010).** Adding new chemistries to the genetic code. *Annu Rev Biochem* **79**, 413-444.
- Lüke, I., Handford, J. I., Palmer, T. & Sargent, F. (2009).** Proteolytic processing of *Escherichia coli* twin-arginine signal peptides by LepB. *Arch Microbiol* **191**, 919-925.
- Lycklama, A. N. J. A. & Driessen, A. J. (2012).** The bacterial Sec-translocase: structure and mechanism. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **367**, 1016-1028.
- Ma, X. & Cline, K. (2010).** Multiple precursor proteins bind individual Tat receptor complexes and are collectively transported. *EMBO J* **29**, 1477-1488.

- Ma, X. & Cline, K. (2013).** Mapping the signal peptide binding and oligomer contact sites of the core subunit of the pea twin arginine protein translocase. *Plant Cell* **25**, 999-1015.
- Maurer, C., Panahandeh, S., Jungkamp, A. C., Moser, M. & Müller, M. (2010).** TatB functions as an oligomeric binding site for folded Tat precursor proteins. *Mol Biol Cell* **21**, 4151-4161.
- McBride, M. J. & Zhu, Y. (2013).** Gliding motility and Por secretion system genes are widespread among members of the phylum bacteroidetes. *J Bacteriol* **195**, 270-278.
- McDevitt, C. A., Hicks, M. G., Palmer, T. & Berks, B. C. (2005).** Characterisation of Tat protein transport complexes carrying inactivating mutations. *Biochem Biophys Res Commun* **329**, 693-698.
- McDevitt, C. A., Buchanan, G., Sargent, F., Palmer, T. & Berks, B. C. (2006).** Subunit composition and in vivo substrate-binding characteristics of Escherichia coli Tat protein complexes expressed at native levels. *FEBS J* **273**, 5656-5668.
- McDonough, J. A., Hacker, K. E., Flores, A. R., Pavelka, M. S., Jr. & Braunstein, M. (2005).** The twin-arginine translocation pathway of Mycobacterium smegmatis is functional and required for the export of mycobacterial beta-lactamases. *J Bacteriol* **187**, 7667-7679.
- Mendel, S., McCarthy, A., Barnett, J. P., Eijlander, R. T., Nenninger, A., Kuipers, O. P. & Robinson, C. (2008).** The Escherichia coli TatABC system and a Bacillus subtilis TatAC-type system recognise three distinct targeting determinants in twin-arginine signal peptides. *J Mol Biol* **375**, 661-672.
- Miller, J. H. (1972).** Experiments in Molecular Genetics. Cold-Spring-Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Molik, S., Karnauchov, I., Weidlich, C., Herrmann, R. G. & Klosgen, R. B. (2001).** 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* **276**, 42761-42766.
- Monera, O. D., Sereda, T. J., Zhou, N. E., Kay, C. M. & Hodges, R. S. (1995).** Relationship of sidechain hydrophobicity and alpha-helical propensity on the stability of the single-stranded amphipathic alpha-helix. *J Pept Sci* **1**, 319-329.
- Mori, H., Summer, E. J., Ma, X. & Cline, K. (1999).** Component specificity for the thylakoidal Sec and Delta pH-dependent protein transport pathways. *J Cell Biol* **146**, 45-56.
- Mori, H., Summer, E. J. & Cline, K. (2001).** Chloroplast TatC plays a direct role in thylakoid (Delta)pH-dependent protein transport. *FEBS Lett* **501**, 65-68.
- Mori, H. & Cline, K. (2002).** A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid [Delta]pH/Tat translocase. *J Cell Biol* **157**, 205-210.
- Morita, K., Tokuda, H. & Nishiyama, K. (2012).** Multiple SecA molecules drive protein translocation across a single translocon with SecG inversion. *J Biol Chem* **287**, 455-464.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987).** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-350.
- Musser, S. M. & Theg, S. M. (2000).** Characterization of the early steps of OE17 precursor transport by the thylakoid DeltapH/Tat machinery. *Eur J Biochem* **267**, 2588-2598.
- Nagano, N., Ota, M. & Nishikawa, K. (1999).** Strong hydrophobic nature of cysteine residues in proteins. *FEBS Lett* **458**, 69-71.

Neumann-Haefelin, C., Schafer, U., Muller, M. & Koch, H. G. (2000). SRP-dependent co-translational targeting and SecA-dependent translocation analyzed as individual steps in the export of a bacterial protein. *EMBO J* **19**, 6419-6426.

Nishiyama, K., Kabuyama, Y., Akimaru, J., Matsuyama, S., Tokuda, H. & Mizushima, S. (1991). SecY is an indispensable component of the protein secretory machinery of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1065**, 89-97.

Nishiyama, K., Mizushima, S. & Tokuda, H. (1993). A novel membrane protein involved in protein translocation across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J* **12**, 3409-3415.

Nishiyama, K., Hanada, M. & Tokuda, H. (1994). Disruption of the gene encoding p12 (SecG) reveals the direct involvement and important function of SecG in the protein translocation of *Escherichia coli* at low temperature. *EMBO J* **13**, 3272-3277.

Niviere, V., Wong, S. L. & Voordouw, G. (1992). Site-directed mutagenesis of the hydrogenase signal peptide consensus box prevents export of a beta-lactamase fusion protein. *J Gen Microbiol* **138**, 2173-2183.

Notti, R. Q. & Stebbins, C. E. (2016). The Structure and Function of Type III Secretion Systems. *Microbiol Spectr* **4**.

Nouwen, N., de Kruijff, B. & Tommassen, J. (1996). Delta mu H⁺ dependency of in vitro protein translocation into *Escherichia coli* inner-membrane vesicles varies with the signal-sequence core-region composition. *Mol Microbiol* **19**, 1205-1214.

Oates, J., Barrett, C. M., Barnett, J. P., Byrne, K. G., Bolhuis, A. & Robinson, C. (2005). The *Escherichia coli* twin-arginine translocation apparatus incorporates a distinct form of TatABC complex, spectrum of modular TatA complexes and minor TatAB complex. *J Mol Biol* **346**, 295-305.

Ochsner, U. A., Snyder, A., Vasil, A. I. & Vasil, M. L. (2002). Effects of the twin-arginine translocase on secretion of virulence factors, stress response, and pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8312-8317.

Oh, E., Becker, A. H., Sandikci, A., Huber, D., Chaba, R., Gloge, F., Nichols, R. J., Typas, A., Gross, C. A., Kramer, G., Weissman, J. S. & Bukau, B. (2011). Selective ribosome profiling reveals the cotranslational chaperone action of trigger factor in vivo. *Cell* **147**, 1295-1308.

Oresnik, I. J., Ladner, C. L. & Turner, R. J. (2001). Identification of a twin-arginine leader-binding protein. *Mol Microbiol* **40**, 323-331.

Palmer, T., Sargent, F. & Berks, B. C. (2005). Export of complex cofactor-containing proteins by the bacterial Tat pathway. *Trends Microbiol* **13**, 175-180.

Palmer, T. & Berks, B. C. (2012). The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nat Rev Microbiol* **10**, 483-496.

Panahandeh, S., Maurer, C., Moser, M., DeLisa, M. P. & Müller, M. (2008). Following the path of a twin-arginine precursor along the TatABC translocase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **283**, 33267-33275.

Papish, A. L., Ladner, C. L. & Turner, R. J. (2003). The twin-arginine leader-binding protein, DmsD, interacts with the TatB and TatC subunits of the *Escherichia coli* twin-arginine translocase. *J Biol Chem* **278**, 32501-32506.

- Parlitz, R., Eitan, A., Stjepanovic, G., Bahari, L., Bange, G., Bibi, E. & Sinning, I. (2007).** Escherichia coli signal recognition particle receptor FtsY contains an essential and autonomous membrane-binding amphipathic helix. *J Biol Chem* **282**, 32176-32184.
- Perez-Rodriguez, R., Fisher, A. C., Perlmutter, J. D., Hicks, M. G., Chanal, A., Santini, C. L., Wu, L. F., Palmer, T. & DeLisa, M. P. (2007).** An essential role for the DnaK molecular chaperone in stabilizing over-expressed substrate proteins of the bacterial twin-arginine translocation pathway. *J Mol Biol* **367**, 715-730.
- Pogliano, J. A. & Beckwith, J. (1994).** SecD and SecE facilitate protein export in Escherichia coli. *EMBO J* **13**, 554-561.
- Pohlschroder, M., Murphy, C. & Beckwith, J. (1996).** In vivo analyses of interactions between SecE and SecY, core components of the Escherichia coli protein translocation machinery. *J Biol Chem* **271**, 19908-19914.
- Pommier, J., Mejean, V., Giordano, G. & Iobbi-Nivol, C. (1998).** TorD, a cytoplasmic chaperone that interacts with the unfolded trimethylamine N-oxide reductase enzyme (TorA) in Escherichia coli. *J Biol Chem* **273**, 16615-16620.
- Pradel, N., Santini, C. L., Ye, C. Y., Fevat, L., Gerard, F., Alami, M. & Wu, L. F. (2003a).** Influence of tat mutations on the ribose-binding protein translocation in Escherichia coli. *Biochem Biophys Res Commun* **306**, 786-791.
- Pradel, N., Ye, C., Livrelli, V., Xu, J., Joly, B. & Wu, L. F. (2003b).** Contribution of the twin arginine translocation system to the virulence of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7. *Infect Immun* **71**, 4908-4916.
- Prickril, B. C., Czechowski, M. H., Przybyla, A. E., Peck, H. D., Jr. & LeGall, J. (1986).** Putative signal peptide on the small subunit of the periplasmic hydrogenase from Desulfovibrio vulgaris. *J Bacteriol* **167**, 722-725.
- Pugsley, A. P. (1993).** The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* **57**, 50-108.
- Punginelli, C., Maldonado, B., Grahl, S., Jack, R., Alami, M., Schröder, J., Berks, B. C. & Palmer, T. (2007).** Cysteine scanning mutagenesis and topological mapping of the Escherichia coli twin-arginine translocase TatC Component. *J Bacteriol* **189**, 5482-5494.
- Puziss, J. W., Fikes, J. D. & Bassford, P. J., Jr. (1989).** Analysis of mutational alterations in the hydrophilic segment of the maltose-binding protein signal peptide. *J Bacteriol* **171**, 2303-2311.
- Puziss, J. W., Strobel, S. M. & Bassford, P. J., Jr. (1992).** Export of maltose-binding protein species with altered charge distribution surrounding the signal peptide hydrophobic core in Escherichia coli cells harboring prl suppressor mutations. *J Bacteriol* **174**, 92-101.
- Ramasamy, S., Abrol, R., Suloway, C. J. & Clemons, W. M., Jr. (2013).** The glove-like structure of the conserved membrane protein TatC provides insight into signal sequence recognition in twin-arginine translocation. *Structure* **21**, 777-788.
- Randall, L. L. & Hardy, S. J. (1986).** Correlation of competence for export with lack of tertiary structure of the mature species: a study in vivo of maltose-binding protein in E. coli. *Cell* **46**, 921-928.
- Randall, L. L., Topping, T. B., Smith, V. F., Diamond, D. L. & Hardy, S. J. (1998a).** SecB: a chaperone from Escherichia coli. *Methods Enzymol* **290**, 444-459.
- Randall, L. L., Topping, T. B., Suciu, D. & Hardy, S. J. (1998b).** Calorimetric analyses of the interaction between SecB and its ligands. *Protein Sci* **7**, 1195-1200.

Raynaud, C., Guilhot, C., Rauzier, J., Bordat, Y., Pelicic, V., Manganelli, R., Smith, I., Gicquel, B. & Jackson, M. (2002). Phospholipases C are involved in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **45**, 203-217.

Richter, S. & Brüser, T. (2005). Targeting of unfolded PhoA to the TAT translocon of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **280**, 42723-42730.

Richter, S., Lindenstrauss, U., Lucke, C., Bayliss, R. & Brüser, T. (2007). Functional Tat transport of unstructured, small, hydrophilic proteins. *J Biol Chem* **282**, 33257-33264.

Robinson, C., Klösgen, R. B., Herrmann, R. G. & Shackleton, J. B. (1993). Protein translocation across the thylakoid membrane--a tale of two mechanisms. *FEBS Lett* **325**, 67-69.

Rocco, M. A., Waraho-Zhmayev, D. & DeLisa, M. P. (2012). Twin-arginine translocase mutations that suppress folding quality control and permit export of misfolded substrate proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 13392-13397.

Rodrigue, A., Chanal, A., Beck, K., Muller, M. & Wu, L. F. (1999). Co-translocation of a periplasmic enzyme complex by a hitchhiker mechanism through the bacterial tat pathway. *J Biol Chem* **274**, 13223-13228.

Rodriguez, F., Rouse, S. L., Tait, C. E., Harmer, J., De Riso, A., Timmel, C. R., Sansom, M. S., Berks, B. C. & Schnell, J. R. (2013). Structural model for the protein-translocating element of the twin-arginine transport system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, E1092-1101.

Rollauer, S. E., Tarry, M. J., Graham, J. E., Jääskeläinen, M., Jager, F., Johnson, S., Krehenbrink, M., Liu, S. M., Lukey, M. J., Marcoux, J., McDowell, M. A., Rodriguez, F., Roversi, P., Stansfeld, P. J., Robinson, C. V., Sansom, M. S., Palmer, T., Högbom, M., Berks, B. C. & Lea, S. M. (2012). Structure of the TatC core of the twin-arginine protein transport system. *Nature* **492**, 210-214.

Rossier, O. & Cianciotto, N. P. (2005). The *Legionella pneumophila* tatB gene facilitates secretion of phospholipase C, growth under iron-limiting conditions, and intracellular infection. *Infect Immun* **73**, 2020-2032.

Ruiz, N. & Silhavy, T. J. (2005). Sensing external stress: watchdogs of the *Escherichia coli* cell envelope. *Curr Opin Microbiol* **8**, 122-126.

Rusch, S. L., Chen, H., Izard, J. W. & Kendall, D. A. (1994). Signal peptide hydrophobicity is finely tailored for function. *J Cell Biochem* **55**, 209-217.

Rusch, S. L. & Kendall, D. A. (1994). Transport of an export-defective protein by a highly hydrophobic signal peptide. *J Biol Chem* **269**, 1243-1248.

Saint-Joanis, B., Demangel, C., Jackson, M., Brodin, P., Marsollier, L., Boshoff, H. & Cole, S. T. (2006). Inactivation of Rv2525c, a substrate of the twin arginine translocation (Tat) system of *Mycobacterium tuberculosis*, increases beta-lactam susceptibility and virulence. *J Bacteriol* **188**, 6669-6679.

Saio, T., Guan, X., Rossi, P., Economou, A. & Kalodimos, C. G. (2014). Structural basis for protein antiaggregation activity of the trigger factor chaperone. *Science* **344**, 1250494.

Sambasivarao, D., Turner, R. J., Simala-Grant, J. L., Shaw, G., Hu, J. & Weiner, J. H. (2000). Multiple roles for the twin arginine leader sequence of dimethyl sulfoxide reductase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**, 22526-22531.

Sandkvist, M. (2001). Biology of type II secretion. *Mol Microbiol* **40**, 271-283.

- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 5463-5467.
- Santini, C. L., Ize, B., Chanal, A., Muller, M., Giordano, G. & Wu, L. F. (1998). A novel sec-independent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli*. *EMBO J* **17**, 101-112.
- Santini, C. L., Bernadac, A., Zhang, M., Chanal, A., Ize, B., Blanco, C. & Wu, L. F. (2001). Translocation of jellyfish green fluorescent protein via the Tat system of *Escherichia coli* and change of its periplasmic localization in response to osmotic up-shock. *J Biol Chem* **276**, 8159-8164.
- Sargent, F., Bogesch, E. G., Stanley, N. R., Wexler, M., Robinson, C., Berks, B. C. & Palmer, T. (1998). Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. *EMBO J* **17**, 3640-3650.
- Sargent, F., Stanley, N. R., Berks, B. C. & Palmer, T. (1999). Sec-independent protein translocation in *Escherichia coli*. A distinct and pivotal role for the TatB protein. *J Biol Chem* **274**, 36073-36082.
- Sato, K., Naito, M., Yukitake, H., Hirakawa, H., Shoji, M., McBride, M. J., Rhodes, R. G. & Nakayama, K. (2010). A protein secretion system linked to bacteroidete gliding motility and pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 276-281.
- Schatz, P. J., Bieker, K. L., Ottemann, K. M., Silhavy, T. J. & Beckwith, J. (1991). One of three transmembrane stretches is sufficient for the functioning of the SecE protein, a membrane component of the *E. coli* secretion machinery. *EMBO J* **10**, 1749-1757.
- Schiebel, E., Driessen, A. J., Hartl, F. U. & Wickner, W. (1991). Delta mu H⁺ and ATP function at different steps of the catalytic cycle of preprotein translocase. *Cell* **64**, 927-939.
- Schierle, C. F., Berkmen, M., Huber, D., Kumamoto, C., Boyd, D. & Beckwith, J. (2003). The DsbA signal sequence directs efficient, cotranslational export of passenger proteins to the *Escherichia coli* periplasm via the signal recognition particle pathway. *J Bacteriol* **185**, 5706-5713.
- Settles, A. M., Yonetani, A., Baron, A., Bush, D. R., Cline, K. & Martienssen, R. (1997). Sec-independent protein translocation by the maize Hcf106 protein. *Science* **278**, 1467-1470.
- Shanmugham, A., Wong Fong Sang, H. W., Bollen, Y. J. & Lill, H. (2006). Membrane binding of twin arginine preproteins as an early step in translocation. *Biochemistry* **45**, 2243-2249.
- Shiozuka, K., Tani, K., Mizushima, S. & Tokuda, H. (1990). The proton motive force lowers the level of ATP required for the in vitro translocation of a secretory protein in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **265**, 18843-18847.
- Shrivastava, A., Johnston, J. J., van Baaren, J. M. & McBride, M. J. (2013). *Flavobacterium johnsoniae* GldK, GldL, GldM, and SprA are required for secretion of the cell surface gliding motility adhesins SprB and RemA. *J Bacteriol* **195**, 3201-3212.
- Singh, R., Kraft, C., Jaiswal, R., Sejwal, K., Kasaragod, V. B., Kuper, J., Burger, J., Mielke, T., Lührink, J. & Bhushan, S. (2014). Cryo-electron microscopic structure of SecA protein bound to the 70S ribosome. *J Biol Chem* **289**, 7190-7199.
- Sone, M., Kishigami, S., Yoshihisa, T. & Ito, K. (1997). Roles of disulfide bonds in bacterial alkaline phosphatase. *J Biol Chem* **272**, 6174-6178.
- Stanley, N. R., Palmer, T. & Berks, B. C. (2000). The twin arginine consensus motif of Tat signal peptides is involved in Sec-independent protein targeting in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**, 11591-11596.

- Stanley, N. R., Findlay, K., Berks, B. C. & Palmer, T. (2001).** Escherichia coli strains blocked in Tat-dependent protein export exhibit pleiotropic defects in the cell envelope. *J Bacteriol* **183**, 139-144.
- Stewart, V., Lu, Y. & Darwin, A. J. (2002).** Periplasmic nitrate reductase (NapABC enzyme) supports anaerobic respiration by Escherichia coli K-12. *J Bacteriol* **184**, 1314-1323.
- Strauch, E. M. & Georgiou, G. (2007).** Escherichia coli tatC mutations that suppress defective twin-arginine transporter signal peptides. *J Mol Biol* **374**, 283-291.
- Takeshita, S., Sato, M., Toba, M., Masahashi, W. & Hashimoto-Gotoh, T. (1987).** High-copy-number and low-copy-number plasmid vectors for lacZ alpha-complementation and chloramphenicol- or kanamycin-resistance selection. *Gene* **61**, 63-74.
- Tanaka, S., Lerner, S. A. & Lin, E. C. (1967).** Replacement of a phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase by a nicotinamide adenine dinucleotide-linked dehydrogenase for the utilization of mannitol. *Journal of bacteriology* **93**, 642-648.
- Tarry, M., Arends, S. J., Roversi, P., Piette, E., Sargent, F., Berks, B. C., Weiss, D. S. & Lea, S. M. (2009a).** The Escherichia coli cell division protein and model Tat substrate SufI (FtsP) localizes to the septal ring and has a multicopper oxidase-like structure. *J Mol Biol* **386**, 504-519.
- Tarry, M. J., Schäfer, E., Chen, S., Buchanan, G., Greene, N. P., Lea, S. M., Palmer, T., Saibil, H. R. & Berks, B. C. (2009b).** Structural analysis of substrate binding by the TatBC component of the twin-arginine protein transport system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 13284-13289.
- Taubert, J., Hou, B., Risselada, H. J., Mehner, D., Lünsdorf, H., Grubmüller, H. & Brüser, T. (2015).** TatBC-independent Tata/Tat substrate interactions contribute to transport efficiency. *PLoS One* **10**, e0119761.
- Thanassi, D. G., Saulino, E. T. & Hultgren, S. J. (1998).** The chaperone/usher pathway: a major terminal branch of the general secretory pathway. *Curr Opin Microbiol* **1**, 223-231.
- Thomas, G., Potter, L. & Cole, J. A. (1999).** The periplasmic nitrate reductase from Escherichia coli: a heterodimeric molybdoprotein with a double-arginine signal sequence and an unusual leader peptide cleavage site. *FEMS Microbiol Lett* **174**, 167-171.
- Thomas, J. D., Daniel, R. A., Errington, J. & Robinson, C. (2001).** Export of active green fluorescent protein to the periplasm by the twin-arginine translocase (Tat) pathway in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **39**, 47-53.
- Thomas, S., Holland, I. B. & Schmitt, L. (2014).** The Type 1 secretion pathway - the hemolysin system and beyond. *Biochim Biophys Acta* **1843**, 1629-1641.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 4350-4354.
- Tsirigotaki, A., De Geyter, J., Sostaric, N., Economou, A. & Karamanou, S. (2017).** Protein export through the bacterial Sec pathway. *Nat Rev Microbiol* **15**, 21-36.
- Tsukazaki, T., Mori, H., Echizen, Y., Ishitani, R., Fukai, S., Tanaka, T., Perederina, A., Vassilyev, D. G., Kohno, T., Maturana, A. D., Ito, K. & Nureki, O. (2011).** Structure and function of a membrane component SecDF that enhances protein export. *Nature* **474**, 235-238.
- Tullman-Ercek, D., DeLisa, M. P., Kawarasaki, Y., Iranpour, P., Ribnicky, B., Palmer, T. & Georgiou, G. (2007).** Export pathway selectivity of Escherichia coli twin arginine translocation signal peptides. *J Biol Chem* **282**, 8309-8316.

Turner, R. J., Papish, A. L. & Sargent, F. (2004). Sequence analysis of bacterial redox enzyme maturation proteins (REMPs). *Can J Microbiol* **50**, 225-238.

Ulfig, A., Fröbel, J., Lausberg, F., Blümmel, A. S., Heide, A. K., Müller, M. & Freudl, R. (2017). The h-region of twin arginine signal peptides supports productive binding of bacterial Tat precursor proteins to the TatBC receptor complex. *J Biol Chem*.

Urbanus, M. L., Scotti, P. A., Froderberg, L., Saaf, A., de Gier, J. W., Brunner, J., Samuelson, J. C., Dalbey, R. E., Oudega, B. & Luirink, J. (2001). Sec-dependent membrane protein insertion: sequential interaction of nascent FtsQ with SecY and YidC. *EMBO Rep* **2**, 524-529.

van Dalen, A., Killian, A. & de Kruijff, B. (1999). Delta psi stimulates membrane translocation of the C-terminal part of a signal sequence. *J Biol Chem* **274**, 19913-19918.

Van den Berg, B., Clemons, W. M., Jr., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S. C. & Rapoport, T. A. (2004). X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* **427**, 36-44.

van der Laan, M., Nouwen, N. & Driessen, A. J. (2004). SecYEG proteoliposomes catalyze the Deltaphi-dependent membrane insertion of FtsQ. *J Biol Chem* **279**, 1659-1664.

van der Sluis, E. O. & Driessen, A. J. (2006). Stepwise evolution of the Sec machinery in Proteobacteria. *Trends Microbiol* **14**, 105-108.

Van Gerven, N., Klein, R. D., Hultgren, S. J. & Remaut, H. (2015). Bacterial amyloid formation: structural insights into curli biogenesis. *Trends Microbiol* **23**, 693-706.

von Heijne, G. (1986). Net N-C charge imbalance may be important for signal sequence function in bacteria. *J Mol Biol* **192**, 287-290.

von Heijne, G. & Gavel, Y. (1988). Topogenic signals in integral membrane proteins. *Eur J Biochem* **174**, 671-678.

von Heijne, G. (1990). The signal peptide. *J Membr Biol* **115**, 195-201.

von Heijne, G. (1992). Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J Mol Biol* **225**, 487-494.

Voulhoux, R., Ball, G., Ize, B., Vasil, M. L., Lazdunski, A., Wu, L. F. & Filloux, A. (2001). Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *EMBO J* **20**, 6735-6741.

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. (2013). Folding and self-assembly of the TatA translocation pore based on a charge zipper mechanism. *Cell* **152**, 316-326.

Weiner, J. H., Bilous, P. T., Shaw, G. M., Lubitz, S. P., Frost, L., Thomas, G. H., Cole, J. A. & Turner, R. J. (1998). A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins. *Cell* **93**, 93-101.

Wexler, M., Sargent, F., Jack, R. L., Stanley, N. R., Bogsch, E. G., Robinson, C., Berks, B. C. & Palmer, T. (2000). TatD is a cytoplasmic protein with DNase activity. No requirement for TatD family proteins in sec-independent protein export. *J Biol Chem* **275**, 16717-16722.

Winans, S. C., Burns, D. L. & Christie, P. J. (1996). Adaptation of a conjugal transfer system for the export of pathogenic macromolecules. *Trends Microbiol* **4**, 64-68.

- Xu, Z., Knafels, J. D. & Yoshino, K. (2000).** Crystal structure of the bacterial protein export chaperone secB. *Nat Struct Biol* **7**, 1172-1177.
- Yahr, T. L. & Wickner, W. T. (2001).** Functional reconstitution of bacterial Tat translocation in vitro. *EMBO J* **20**, 2472-2479.
- Yamada, K., Sanzen, I., Ohkura, T., Okamoto, A., Torii, K., Hasegawa, T. & Ohta, M. (2007).** Analysis of twin-arginine translocation pathway homologue in *Staphylococcus aureus*. *Curr Microbiol* **55**, 14-19.
- Yamane, K. & Mizushima, S. (1988).** Introduction of basic amino acid residues after the signal peptide inhibits protein translocation across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. Relation to the orientation of membrane proteins. *J Biol Chem* **263**, 19690-19696.
- Yoshida, Y., Takai, M., Satoh, T. & Takami, S. (1991).** Molybdenum requirement for translocation of dimethyl sulfoxide reductase to the periplasmic space in a photodenitrifier, *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. denitrificans. *J Bacteriol* **173**, 3277-3281.
- Yoshihisa, T. & Ito, K. (1996).** Pro-OmpA derivatives with a His6 tag in their N-terminal "translocation initiation domains" are arrested by Ni²⁺ at an early post-targeting stage of translocation. *J Biol Chem* **271**, 9429-9436.
- Zhang, L., Zhu, Z., Jing, H., Zhang, J., Xiong, Y., Yan, M., Gao, S., Wu, L. F., Xu, J. & Kan, B. (2009).** Pleiotropic effects of the twin-arginine translocation system on biofilm formation, colonization, and virulence in *Vibrio cholerae*. *BMC Microbiol* **9**, 114.
- Zhang, Y., Wang, L., Hu, Y. & Jin, C. (2014).** Solution structure of the TatB component of the twin-arginine translocation system. *Biochim Biophys Acta* **1838**, 1881-1888.
- Zoufaly, S., Fröbel, J., Rose, P., Flecken, T., Maurer, C., Moser, M. & Müller, M. (2012).** Mapping precursor-binding site on TatC subunit of twin arginine-specific protein translocase by site-specific photo cross-linking. *J Biol Chem* **287**, 13430-13441.
- Zupan, J. R., Ward, D. & Zambryski, P. (1998).** Assembly of the VirB transport complex for DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *Curr Opin Microbiol* **1**, 649-655.

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Roland Freudl für die Überlassung des interessanten und spannenden Themas, für sein stetiges Interesse an meiner Arbeit, die ständige Diskussionsbereitschaft und seine konstruktiven Ratschläge, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. Vlada Urlacher danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Herrn Prof. Dr. Michael Bott danke ich für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen im IBG-1-Institut.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Bakterielle Proteinsekretion“ Astrid Bida, Doris Dohmen-Olma und Sarah Jurischka für das angenehme Arbeitsklima und für ihre Hilfsbereitschaft bedanken. Ein besonderer Dank gilt hierbei Astrid Bida für die hervorragende technische Assistenz.

Julia Fröbel, AnSo Blümmel und Matthias Müller vom Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Freiburg danke ich für die sehr angenehme und äußerst produktive Zusammenarbeit sowie die anregenden Diskussionen bei den jährlichen “Tat-Meetings”.

Zuletzt möchte ich meiner Familie für die stetige Unterstützung während des gesamten Studiums danken. Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Freund Ragnar für das Verständnis, die Unterstützung sowie die Aufmunterung und Motivation im passenden Moment. Takk fyrir !

Band / Volume 147

Neutron Scattering

Lectures of the JCNS Laboratory Course held at Forschungszentrum Jülich and at the Heinz-Maier-Leibnitz Zentrum Garching
edited by T. Brückel, S. Förster, G. Roth, and R. Zorn (Eds.) (2017),
ca 400 pp
ISBN: 978-3-95806-243-6

Band / Volume 148

Neutron scattering

Experimental Manuals of the JCNS Laboratory Course held at Forschungszentrum Jülich and at the Heinz-Maier-Leibnitz Zentrum Garching
edited by T. Brückel, S. Förster, G. Roth, and R. Zorn (Eds.) (2017),
ca 200 pp
ISBN: 978-3-95806-244-3

Band / Volume 149

Kinetic and thermodynamic considerations on the formation of heteromolecular layers on metal surfaces

C. Henneke (2017), vii, 157, XIV pp
ISBN: 978-3-95806-245-0

Band / Volume 150

Spectroscopic characterization of local valence change processes in resistively switching complex oxides

C. Bäumer (2017), x, 206 pp
ISBN: 978-3-95806-246-7

Band / Volume 151

Magnetic structure in relation to the magnetic field induced ferroelectricity in Y-type hexaferrite $\text{Ba}_{2-x}\text{Sr}_x\text{Zn}_2\text{Fe}_{12}\text{O}_{22}$

P. Thakuria (2017), 17, 180 pp
ISBN: 978-3-95806-250-4

Band / Volume 152

Statistical analysis tools for assessing the functional relevance of higher-order correlations in massively parallel spike trains

V. Rostami (2017), x, 176 pp
ISBN: 978-3-95806-251-1

Band / Volume 153

The influence of the substrate on the structure and electronic properties of carbon-based 2D materials

J. Sforzini (2017), XIII, 145 pp
ISBN: 978-3-95806-255-9

Band / Volume 154

Gate-All-Around Silicon Nanowire Tunnel FETs for Low Power Applications

G. V. Luong (2017), ii, 136 pp

ISBN: 978-3-95806-259-7

Band / Volume 155

Graphene Devices for Extracellular Measurements

D. Kireev (2017), ix, 169 pp

ISBN: 978-3-95806-265-8

Band / Volume 156

Nanoscale 3D structures towards improved cell-chip coupling on microelectrode arrays

S. D. Weidlich (2017), II, 154 pp

ISBN: 978-3-95806-278-8

Band / Volume 157

Interface phenomena in $\text{La}_{1/3}\text{Sr}_{2/3}\text{FeO}_3$ / $\text{La}_{2/3}\text{Sr}_{1/3}\text{MnO}_3$ heterostructures and a quest for p-electron magnetism

M. Waschk (2017), ix, 205 pp

ISBN: 978-3-95806-281-8

Band / Volume 158

Physics of Life

Lecture Notes of the 49th IFF Spring School 2018

26 February – 09 March 2018, Jülich, Germany

ed. by G. Gompfer, J. Dhont, J. Elgeti, C. Fahlke, D. Fedosov,

S. Förster, P. Lettinga, A. Offenhäusser (2018), ca 1000 pp

ISBN: 978-3-95806-286-3

Band / Volume 159

Identifizierung von Bindungs determinanten von Tat-Vorläuferproteinen an den TatBC-Rezeptorkomplex während der Tat-abhängigen Proteintranslokation in *Escherichia coli*

A. Ulfing (2018), 186 pp

ISBN: 978-3-95806-290-0

Weitere **Schriften des Verlags im Forschungszentrum Jülich** unter
<http://wwwzb1.fz-juelich.de/verlagextern1/index.asp>

Schlüsseltechnologien / Key Technologies
Band / Volume 159
ISBN 978-3-95806-290-0