

„UNTERSUCHUNGEN ZUR INTRAZELLULÄREN  
VERTEILUNG DER KOMPONENTEN DES  
TAT-SYSTEMS IN *ESCHERICHIA COLI*“

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

*doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Felix Berthelmann

geb. am 25. November 1978 in Halle (Saale)

Gutachter:

1. Prof. Dr. Thomas Brüser
2. Prof. Dr. Ralf Bernd Klösgen
3. Prof. Dr. Holger Lill

Verteidigung in Halle (Saale), den 21.01.2010

“In science it is better to be wrong than to be vague. Often we find the right way only after we tried all the wrong ways first.”

Freeman J. Dyson



# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>V</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>IX</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>XII</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1 PROTEINTRANSLOKATION IN BAKTERIEN.....	1
1.1.1 Die Proteinsekretionssysteme der gramnegativen Bakterien .....	2
1.1.2 Der generelle sekretorische Weg.....	5
1.2 DER TAT-TRANSPORT IN <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	6
1.2.1 Die Tat-Substrate .....	7
1.2.2 Tat-spezifische Signalpeptide.....	8
1.2.3 Die Komponenten des Tat-Systems .....	9
1.2.4 Über den Mechanismus des Tat-Systems .....	11
1.3 SUBZELLULÄRE LOKALISATIONEN IN BAKTERIEN.....	13
1.3.1 Das bakterielle Zytoskelett.....	14
1.4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....	16
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>17</b>
2.1 BAKTERIENSTÄMME, PLASMIDE UND PRIMER.....	17
2.2 ZELLKULTIVIERUNG.....	21
2.2.1 Nährmedien.....	21
2.2.2 Zusätze .....	22
2.2.3 Kultivierung .....	22
2.2.4 Zellernte.....	23
2.3 MOLEKULARGENETISCHE METHODEN .....	23
2.3.1 Vorbehandlung von Geräten und Lösungen .....	23
2.3.2 DNA-Reinigung.....	23
2.3.2.1 Reinigung genomischer DNA.....	23
2.3.2.2 Minipräparation von Plasmid-DNA.....	24
2.3.2.3 Mikro dialyse .....	24
2.3.2.4 DNA-Fragmentreinigung .....	24
2.3.2.5 Gelextraktion.....	24
2.3.3 Gelelektrophorese .....	25
2.3.4 Restriktionsverdau .....	26
2.3.4.1 Analytischer Verdau.....	26
2.3.4.2 Präparativer Verdau.....	26
2.3.5 Ligation von DNA-Fragmenten.....	27
2.3.6 Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	27
2.3.6.1 Normale Fragmentamplifikation .....	27
2.3.6.2 Fragmentamplifikation zur Schnittstelleneinführung.....	28
2.3.6.3 Gezielte Mutagenesen nach dem Quikchange™-Protokoll.....	29

2.3.6.4	Sequenzierung	30
2.3.7	Herstellung kompetenter Zellen	31
2.3.8	Herstellung hochkompetenter Zellen	31
2.3.9	Transformation kompetenter Zellen	32
2.4	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	32
2.4.1	SDS-PAGE	32
2.4.2	<i>Semi-dry</i> Western-Blot	33
2.4.3	Proteinnachweis durch Immunodetektion	34
2.4.3.1	Färbereaktion mit 4-Chloro-1-naphtol	35
2.4.3.2	Lichtreaktion (ECL-System)	35
2.4.4	Coomassie-Färbung von Proteingelen	36
2.4.5	Direkte Detektion der GFP-Fluoreszenz im Proteingel	36
2.4.6	Membranfraktionierung	37
2.4.7	Fraktionierung von Periplasma, Membranen und Cytoplasma	37
2.4.8	Zellaufschluss ohne Fraktionierung	38
2.4.9	Proteinreinigung mittels ‚His-tag‘	38
2.4.10	Proteinreinigung mittels ‚Strep-tag‘	39
2.4.11	Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation (SDZ)	39
2.5	ELEKTRONEN- UND LICHTMIKROSKOPISCHE METHODEN	40
2.5.1	Durchlichtmikroskopie	40
2.5.2	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM)	40
2.5.3	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	41
2.5.3.1	<i>High pressure freeze fixation</i> (HPF)	41
2.5.3.2	<i>Negative staining</i>	42
2.5.3.3	Immuno-Gold-Markierung	43
2.6	GERÄTE UND CHEMIKALIEN	43
2.6.1	Geräte	43
2.6.2	Zentrifugen und Rotoren	44
2.6.3	Mikroskope	45
2.6.4	Chemikalien und Enzyme	45
2.7	DATENAUSWERTUNG	46
2.7.1	Software	46
2.7.2	Bildverarbeitung	47
2.7.3	Sequenzdaten	47
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>48</b>
3.1	LOKALISATION VON TAT-KOMPONENTEN	49
3.1.1	Ist TatA polar?	49
3.1.2	TatB erscheint immer polar	52
3.1.2.1	MreB beeinflusst die Lokalisation von TatB	55
3.1.3	Ist TatC polar oder verteilt in der Membran?	56
3.2	LOKALISATION VON TAT-SUBSTRATEN	57

3.2.1	Transportiertes GFP bildet polare Aggregationen .....	57
3.2.1.1	Einfluss des Min-Systems auf die Lokalisation von Tat-Substraten .....	60
3.2.2	Die Verwendung von Substraten zur indirekten Lokalisation der Tat-Translokons .....	61
3.2.2.1	Das nukleäre Porenprotein Nsp1p .....	61
3.2.2.2	Die Lokalisation von HipSP-FG5-GFP-RR .....	62
3.2.2.3	Lokalisation von HipSP-FG5-GFP-RR ohne Überexpression aller Tat-Komponenten .....	64
3.2.2.4	Der Einfluss von MreB auf die Substratlokalisierung .....	66
3.2.2.5	Der Einfluss des Min-Systems auf die Substratlokalisierung .....	67
3.2.2.6	Die Lokalisation von HipSP-FG5-GFP-RR ist beeinflussbar durch das Protonophor CCCP .....	69
3.3	ÜBEREXPRIMIERTES TATA ORDNET SICH IN RÖHREN AN .....	70
3.3.1	Elektronenmikroskopische Entdeckung .....	70
3.3.2	Die TatA-Röhren im Detail .....	72
3.3.3	Gereinigtes TatA kann allein Röhren bilden .....	75
3.3.4	TatA allein führt nicht zu intrazellulär sichtbaren Röhren .....	76
3.3.5	Der Einfluss von TatB auf die Röhrenstruktur .....	79
3.3.6	Auswirkungen des Expressionsniveaus auf die TatA-Röhren .....	80
3.3.7	Der Einfluss von Substraten auf die Stapelbildung .....	81
3.3.8	Auswirkungen von Punktmutationen auf die TatA-Röhren .....	82
3.3.9	GFP-Fusionen an TatA unterdrücken die Röhrenbildung .....	85
3.3.10	Optische Lokalisierung der TatA-Röhren .....	86
3.3.11	PspA hat keinen Einfluss auf die TatA-Röhren .....	89
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>91</b>
4.1	DIE LOKALISATION DER TAT-KOMPONENTEN .....	91
4.1.1	Die duale Lokalisation von TatA .....	91
4.1.1.1	Der Einfluss möglicher Artefakte auf die Lokalisation von TatA .....	91
4.1.1.2	Ist TatA membranintegral? .....	92
4.1.2	Ist TatB wirklich polar? .....	93
4.1.2.1	Der sekundäre Kettenphänotyp als Folge der TatB-GFP-Fusion .....	95
4.1.3	Ist die TatC-Lokalisation abhängig von TatA und TatB? .....	95
4.2	DIE TATA-STRUKTUREN .....	96
4.2.1	Wie entstehen die TatA-Strukturen? .....	96
4.2.2	Warum liegen die TatA-Strukturen im Cytoplasma? .....	98
4.2.3	Die Ultrastruktur der Röhren .....	100
4.2.4	Die Funktion der TatA-Röhren .....	101
4.2.5	Sind die TatA-Röhren eine natürliche Struktur? .....	103
4.3	DIE LOKALISATION DER TAT-SUBSTRATE UND DES AKTIVEN TRANSLOKONS .....	104
4.3.1	Tendiert GFP zu Aggregationen? .....	105
4.3.2	Die indirekte Variante .....	106

4.3.3	Die Lokalisation des TatBC-Komplexes .....	108
4.3.4	Der Einfluss polarer Determinanten auf das Tat-Translokon .....	109
4.4	DIE LOKALISATION DES TAT-SYSTEMS .....	110
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>112</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>113</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b>	<b>125</b>
7.1	LEBENS LAUF .....	125
7.2	PUBLIKATIONS LISTE .....	126
7.3	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....	127
7.4	DANKSAGUNG .....	128

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Tab. 1: Verwendete Einheiten und Abkürzungen

Abk.	Erklärung
% (v/v)	Volumen pro Volumen = Konzentration in ml pro 100 ml Lösungsmittel
% (w/v)	Gewicht pro Volumen = Konzentration in g pro 100 ml Lösungsmittel
A22	S-(3,4-dichlorobenzyl)-isothioharnstoff = MreB-Inhibitor
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin = Antibiotikum
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASKA	<i>A complete Set of E. coli K-12 ORF Archive</i> (engl.)
ATP	Adenosintriphosphat
BN-PAGE	<i>blue native polyacrylamide gel electrophoresis</i> (engl.)
Cam	Chloramphenicol = Antibiotikum
CHAPS	zwitterionisches Detergens (3-[(Cholaminopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat)
DIC	<i>differential interference contrast</i> (engl.)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i> -System
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESX-1	Proteintransportweg in Mycobakterien (als T7SS vorgeschlagen)
FACS	<i>fluorescent-activated cell sorting</i> (engl.)
GTP	Guanosintriphosphat
<i>ibid.</i>	<i>ibidem</i> (lat.) = ebenda
Kan	Kanamycin = Antibiotikum
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
MOPS	3-N-(Morpholino)propansulfonsäure = Puffer
MTB	<i>main terminal branch</i> (engl.)
Mtt	<i>membrane targeting and translocation</i> (engl.)
Ni-NTA	Ni <sup>2+</sup> -Nitrilotriessigsäure = His-tag Säulenmaterial
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	<i>open reading frame</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
psi	<i>pounds per square inch</i> (engl.) = Pfund pro Quadratzoll (20 000 psi = 138 MPa)
PWS	Phosphorwolframsäure
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> (engl.) = Schüttel- bzw. Rotationsgeschwindigkeit
RSS	Restriktionsschnittstelle
RT	Raumtemperatur
RZB	Relative Zentrifugalbeschleunigung
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (engl.)



Abk.	Erklärung
Sec	<i>general secretory pathway</i> (engl.) = genereller sekretorischer Weg
SP	Signalpeptid
T1SS	Typ I-Sekretionssystem
T2SS	Typ II-Sekretionssystem
T3SS	Typ III-Sekretionssystem
T4SS	Typ IV-Sekretionssystem
T5SS	Typ V-Sekretionssystem
T6SS	Typ VI-Sekretionssystem
T7SS	Typ VII-Sekretionssystem
T8SS	Typ VIII-Sekretionssystem
Tat	<i>twin-arginine translocation</i> (engl.)
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetrazyklin = Antibiotikum
TIF	<i>tagged image file format</i> (engl.)
TMAO	Trimethylamin-N-Oxid
UA	Uranylacetat
ÜNK	Über-Nacht-Kultur
UV	ultraviolettes Licht = Licht mit Wellenlängen von 1 nm bis 380 nm

Tab. 2: Verwendete Protein- bzw. Genbezeichnungen

Protein / Gen	Erklärung
AmiA	N-Acetylmuramoyl-L-Alanin Amidase (Tat-Substrat)
AmiC	N-Acetylmuramoyl-L-Alanin Amidase, Regulator (Tat-Substrat)
BSA	bovines Serumalbumin
CckA	Sensor-Histidin-Kinase in <i>Caulobacter crescentus</i>
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i> (engl.)
CreS	Crescentin in <i>Caulobacter crescentus</i>
<i>dam</i>	Gen für die DNA-Adenin-Methyltransferase
DivIVA	Zellteilungsinitiationsprotein in <i>Bacillus subtilis</i>
DivJ	Histidin-Protein-Kinase in <i>Caulobacter crescentus</i>
DmsA	Untereinheit A der Dimethylsulfoxid-Reduktase (Tat-Substrat)
DNasen	Desoxyribonukleasen
FhuD	Eisen(III)-Hydroxamat Bindeprotein (Tat-Substrat)
FtsA	Actin-homologes Zellteilungsprotein
FtsZ	Tubulin-homologes Zellteilungsprotein
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (engl.)
Hcp	<i>Haemolysin A co-regulated protein</i> (engl.) (Substrat des T6SS)
HiPIP	<i>high-potential iron sulfur protein</i> (engl.)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (engl.) = Meerrettichperoxidase
IbpA	Hitzeschockprotein in <i>Escherichia coli</i>
IcsA	Virulenzfaktor in <i>Shigella</i>

Protein / Gen	Erklärung
IgG	Immunglobulin G
LepB	Signalpeptidase
MBP	Maltosebindeprotein (Sec-Substrat)
MinC	bestimmt den Ort des Septums; FtsZ-Inhibitor
MinD	bestimmt den Ort des Septums
MinE	bestimmt den Ort des Septums; topologischer Regulator
MreB	Zellform bestimmendes Protein
mRFP1	<i>monomeric red fluorescent protein</i> (engl.)
NapG	Quinol-Dehydrogenase, FeS-Protein (Tat-Substrat)
NrfC	Nitritreduktase, FeS-Protein (Tat-Substrat)
Nsp1p	Nukleoporin der Hefe
OmpA	<i>outer membrane protein A</i> (engl.) (Sec-Substrat)
<i>parC</i>	Bindestelle von ParR
ParM	Plasmidsegregationsprotein
ParR	Plasmidsegregationsprotein; DNA-Bindeprotein
<i>Pfu</i>	thermostabile DNA-Polymerase aus <i>Pyrococcus furiosus</i>
PhoA	alkalische Phosphatase (Sec-Substrat)
PleC	Histidin-Protein-Kinase in <i>Caulobacter crescentus</i>
ProP	osmoregulatorischer Substrat/Protonen-Symporter
PspA	<i>phage shock protein A</i> (engl.)
SecA	Komponente des Sec-Systems = ATPase
SecB	Komponente des Sec-Systems = Chaperon
SecYEG	Komponenten des Sec-Systems = Translokon
SRP	<i>signal recognition particle</i> (engl.)
SulA	Zellteilungsinhibitor
<i>Taq</i>	thermostabile DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
Tar	eines der vier Methyl-akzeptierenden Chemotaxisproteine in <i>Escherichia coli</i>
TatA	eine der drei Hauptkomponenten des Tat-Systems
TatB	eine der drei Hauptkomponenten des Tat-Systems
TatC	eine der drei Hauptkomponenten des Tat-Systems
TatD	eventuell Komponente des Tat-Systems = Nuklease
TatE	Komponente des Tat-Systems
TolC	Kanalprotein der äußeren Membran gramnegativer Bakterien
TorZ	katalytische Untereinheit der Trimethylamin-N-Oxid-Reduktase (Tat-Substrat)
VgrG	<i>valine-glycine repeats</i> (engl.) (Substrat des T6SS)
YcdB	Hämoprotein (Tat-Substrat)
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i> (engl.)
YidC	Insertase
ZapA	unterstützendes Zellteilungsprotein
ZipA	unterstützendes Zellteilungsprotein

Tab. 3: Ein- und Drei-Buchstabencodes der Aminosäuren

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

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Übersichtsschema zum Proteintransport in gramnegativen Bakterien.....	3
Abb. 2: Die Signalpeptide des Sec- und des Tat-Weges.....	8
Abb. 3: Die drei Hauptkomponenten des Tat-Systems in <i>E. coli</i> .....	9
Abb. 4: Modell des Tat-Systems in <i>E. coli</i> .....	12
Abb. 5: Wichtige Zytoskelettbestandteile in Bakterien.....	14
Abb. 6: Schema zum Einführen einer Restriktionsschnittstelle im Zuge einer PCR. ....	28
Abb. 7: TatA-GFP (konstitutiv) ist teilweise polar im Wildtypstamm MC4100 und im Mutantenstamm DADE. ....	49
Abb. 8: TatA-GFP (induziert) ist ausschließlich membranständig im Wildtypstamm MC4100 ara <sup>R</sup> und im Mutantenstamm DADE ara <sup>R</sup> . ....	50
Abb. 9: Fluoreszenzverteilung von TatA-YFP im Stamm MC4100 ara <sup>R</sup> . ....	50
Abb. 10: Immuno-Gold-Markierung von TatA bei Überexpression von <i>tatABC</i> .....	51
Abb. 11: Fluoreszenzverteilung von TatB-GFP in den Stämmen BØD und MC4100.....	52
Abb. 12: Fluoreszenzverteilung von TatB-GFP (induziert) im $\Delta$ <i>tatB</i> -Stamm BØD ara <sup>R</sup> . ....	53
Abb. 13: Periodische Verteilung von TatB-GFP.....	53
Abb. 14: Immuno-Gold-Markierung von TatB.....	54
Abb. 15: Fluoreszenz von TatB-GFP (induziert) im Wildtyp-Hintergrund und in einem MreB-Mutantenstamm. ....	55
Abb. 16: Schwache Fluoreszenz von TatC-GFP im Wildtypstamm MC4100.....	56
Abb. 17: Fluoreszenz von TatC-GFP im Stamm MC4100 ara <sup>R</sup> bei gleichzeitiger Expression von <i>tatABC</i> . ....	57
Abb. 18: Fluoreszenzverteilung des Tat-Substrates DmsA-SP-GFP im Stamm MC4100. ....	58
Abb. 19: Die Verteilung von DmsA-SP-GFP in einer Tat-Mutante.....	58
Abb. 20: Fluoreszenz von DmsA-SP-GFP in einer 3 h-Kultur. ....	59
Abb. 21: Vergleich von DmsA-SP-GFP mit und ohne Tat-Signalpeptid.....	59
Abb. 22: Polare Flecken in einer <i>minC</i> -Deletionsmutante.....	60
Abb. 23: Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz des Fusionsproteins HipSP-FG5-GFP-RR. ....	61
Abb. 24: Das Fusionsprotein HipSP-FG5-GFP wird nicht ins Periplasma transloziert. ....	62
Abb. 25: Fluoreszenz von HipSP-FG5-GFP-RR.....	63
Abb. 26: Fluoreszenz von HipSP-FG5-GFP-KK.....	63

---

Abb. 27: Vergleich des Sedimentationsverhaltens von HipSP-FG5-GFP-RR und der KK-Variante. ....	64
Abb. 28: Fluoreszenz von HipSP-FG5-GFP-RR ohne <i>tatABC</i> -Überexpression. ....	65
Abb. 29: Fluoreszenz von HipSP-FG5-GFP-RR bei gleichzeitiger Überexpression ausgewählter Tat-Komponenten. ....	66
Abb. 30: Fluoreszenz von HipSP-FG5-GFP-RR in einem Stamm ohne MreB. ....	67
Abb. 31: Teilweise Komplementation der MreB-Mutante. ....	67
Abb. 32: HipSP-FG5-GFP-RR in einem Stamm ohne funktionierendes Min-System. ....	68
Abb. 33: Der Einfluss von CCCP auf HipSP-FG5-GFP-RR. ....	69
Abb. 34: Überexpression von <i>tatABC</i> führte zu geordneten intrazellulären Röhrenstrukturen im Cytoplasma. ....	71
Abb. 35: Immuno-Gold-Markierungen zeigten, dass die Tat-Strukturen hauptsächlich von TatA gebildet werden. ....	72
Abb. 36: Schematische Darstellung der möglichen Schnittwinkel der TatA-Röhren. ....	73
Abb. 37: Schematische Verdeutlichung der Symmetrie und der Verbindungslinien zwischen den TatA-Röhren. ....	74
Abb. 38: <i>Negative stains</i> von gereinigtem TatA aus einem Stamm ohne weitere Tat-Komponenten. ....	75
Abb. 39: Reinigung von TatA-H6 aus Stämmen mit und ohne PspA. ....	76
Abb. 40: Die Überexpression von <i>tatA</i> allein führt nicht zu Röhrenstrukturen. ....	77
Abb. 41: Bei Überexpression von <i>tatA</i> und <i>tatB</i> findet man kurze und ungeordnete Röhren. ....	78
Abb. 42: Bei Überexpression von <i>tatA</i> und <i>tatC</i> werden wieder Röhren gebildet. ....	79
Abb. 43: Durch Überexpression von <i>tatA</i> und <i>tatC</i> entstehen TatA-Röhren mit einer leicht geänderten Konformation. ....	80
Abb. 44: Expressionsniveaus von pABS- <i>tatABC</i> und pRK- <i>tatABC</i> im Vergleich. ....	81
Abb. 45: Die TatA-Röhren entstehen auch bei geringerer Überexpression. ....	81
Abb. 46: Vergleich der TatA-Expressionsniveaus mit und ohne gleichzeitige Expression eines Tat-Substrates. ....	82
Abb. 47: Funktionstests der verschiedenen TatA-Mutationen. ....	83
Abb. 48: Vergleich der Expressionslevel der verschiedenen TatA-Varianten. ....	84
Abb. 49: Gebogene Tat-Strukturen in einem Stamm mit mutiertem TatA. ....	85

---

Abb. 50: Optische Lokalisierung der Tat-Strukturen durch gleichzeitige Expression von <i>tatA-gfp</i> und <i>tatABC</i> . .....	86
Abb. 51: Optische Lokalisierung der Tat-Strukturen durch gleichzeitige Expression von verschiedenen Kombinationen der Tat-Komponenten und <i>tatA-gfp</i> . .....	87
Abb. 52: Erscheinungsbild von PspA-GFP im LSM. ....	89
Abb. 53: Schema einer TatA-Röhre. ....	97
Abb. 54: Schema der möglichen Organisation des Tat-Systems in der Zelle. ....	102

## TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Verwendete Einheiten und Abkürzungen .....	V
Tab. 2: Verwendete Protein- bzw. Genbezeichnungen.....	VI
Tab. 3: Ein- und Drei-Buchstabencodes der Aminosäuren .....	VIII
Tab. 4: Verwendete Bakterienstämme .....	17
Tab. 5: Verwendete Plasmide .....	17
Tab. 6: Verwendete Primer .....	19
Tab. 7: Protokoll für LB-Medium .....	21
Tab. 8: Verwendete Antibiotika und ihre Konzentrationen .....	22
Tab. 9: PCR-Ansatz für Fragmentamplifikation .....	27
Tab. 10: PCR-Programm für Fragmentamplifikation .....	28
Tab. 11: PCR-Programm für eine ‚QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis‘ .....	29
Tab. 12: Protokoll der Sequenzierungs-PCR.....	30
Tab. 13: SDS-PAGE-Protokolle für verschiedene Gelkonzentrationen .....	33
Tab. 14: Verwendete Antikörper und ihre Eigenschaften.....	34
Tab. 15: Verwendete Geräte und ihre Hersteller .....	43
Tab. 16: Verwendete Zentrifugen und Rotoren sowie ihre Eigenschaften .....	45
Tab. 17: Verwendete Mikroskope .....	45
Tab. 18: Chemikalienproduzenten und -lieferanten .....	46
Tab. 19: Enzymproduzenten und -lieferanten.....	46
Tab. 20: Dimensionen der TatA-Röhren .....	74
Tab. 21: Lokalisation von transportinkompetenten Substraten .....	107

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 PROTEINTRANSLOKATION IN BAKTERIEN

Der Begriff Zelle leitet sich vom lateinischen Wort *cellula* (Kämmerchen) ab und wurde von Robert Hooke (1635-1703) in seinem 1664 veröffentlichten Werk *Micrographia*<sup>1</sup> geprägt. Hooke stand damals eines der ersten doppellinsigen Mikroskope mit Beleuchtungseinrichtung zur Verfügung, das ihm mit seiner 50-fachen Vergrößerung eine neue Welt eröffnete. Die Zellen, die Hooke in einem Schnitt des Flaschenkorks fand, nannte er *cellulae*, weil sie so eng und durch eine Zellwand nach außen hin abgegrenzt waren und ihn daher an die Zellen von Mönchen erinnerten. Mit dieser zellulären Barriere hatte Hooke eine der grundlegenden Eigenschaften des Lebens, wie wir es kennen, entdeckt: die Abgrenzung gegenüber der Umwelt. Ohne die Zellmembran, ohne die Möglichkeit, innen und außen zu unterscheiden sowie Kompartimente zu schaffen, sind Stoffwechsel und Ladungstrennung und damit Leben undenkbar. Erst die Barriere zwischen „innen“ und „außen“ erlaubt es einem Organismus, seine innere Entropie zu verringern, indem er die Entropie der Umwelt erhöht. Der Physik-Nobelpreisträger Erwin Schrödinger formulierte seine Definition des Lebens so: „*What an organism feeds upon is negative entropy*“ (SCHRÖDINGER, 1967).

Doch Abgrenzung allein reicht nicht. Biologische Systeme sind unter anderem auch durch Stoff- und Energieaustausch mit der Umwelt charakterisiert. Die Membranen müssen also semipermeabel sein und selektive Transportprozesse zwischen dem Zellinnern und dem externen Milieu erlauben. So passieren z. B. Proteine die Membranen. Denn da bakterielle Proteine ausschließlich an cytoplasmatisch lokalisierten Ribosomen synthetisiert werden können, aber oft außerhalb des Cytoplasmas gebraucht werden, müssen sie durch mindestens eine Membran hindurch transportiert werden. Anthony Pugsley schätzte die Zahl der extracytoplasmatischen Proteine 1993 in allen Bakterien auf 20% (PUGSLEY, 1993). Und 2001 berichteten Krogh *et al.*, dass von den zu diesem Zeitpunkt 4289 annotierten *Escherichia coli*-Genen allein 898 (also fast 21%) für Proteine mit transmembranen Helices codieren (KROGH *et al.*, 2001). Die Zahl der Proteine, die ihre Bestimmungsorte außerhalb des Cytoplasmas haben, ist also aller Wahrscheinlichkeit nach noch höher. Viele dieser Proteine sind essentiell und ihr Transport über oder in die Membranen ebenso.

---

<sup>1</sup> Volltext zugänglich im Rahmen des Gutenberg-Projektes unter <http://www.gutenberg.org/etext/15491> (Stand: 13.07.2009).



### 1.1.1 DIE PROTEINSEKRETIONSSYSTEME DER GRAMNEGATIVEN BAKTERIEN

Im Laufe der Evolution haben sich in den Bakterien – ebenso wie in den beiden anderen Domänen des Lebens, den Eukaryoten und den Archaeen – eine Vielzahl von spezialisierten Protein-Translokationsmechanismen entwickelt, die ihrerseits ebenfalls aus Proteinen bestehen (WICKNER und SCHEKMAN, 2005) und für die Organismen jeweils unterschiedliche Vor- und Nachteile mit sich bringen.

Grundlegende Unterschiede in den Anforderungen an die Protein-Translokationssysteme liegen in der Physiologie der Bakterien begründet. So haben grampositive Bakterien in der Regel nur eine Cytoplasmamembran, während gramnegative Bakterien darüber hinaus noch eine äußere Membran besitzen, die eine zusätzliche Barriere für Proteine darstellt und dazu führt, dass gramnegative Organismen insgesamt fünf verschiedene Zielorte für Proteine besitzen (innere und äußere Membran, Cyto- bzw. Periplasma und das umgebende Medium)<sup>2</sup>. Das Vorhandensein dieser zusätzlichen Barriere erhöht natürlich die Komplexität der Transportmechanismen. Die folgenden Ausführungen werden sich auf die gramnegativen Bakterien beschränken.

Wie in Abb. 1 übersichtsartig dargestellt, wurden bisher insgesamt je nach Publikation bis zu acht Typen von spezialisierten Sekretionssystemen beschrieben, die Proteine über die äußere bzw. über beide Membranen transportieren. Darin involviert sein können die generellen Transportwege Sec und Tat. Alle Sekretionswege werden sehr grob eingeteilt in die Ein-Schritt-Prozesse (zu diesen gehören die Typen I, III, IV und VI) sowie die Zwei-Schritt-Prozesse (dazu zählen die Typen II, V, VII und VIII), wobei man sich bei dieser Einteilung auf die Fähigkeit bezieht, Proteine in jeweils ein oder zwei Schritten über beide Membranen zu transportieren.

Das Typ I-Sekretionssystem (T1SS) ist ein Beispiel für ein Ein-Schritt-System. Obwohl es sehr einfach aufgebaut ist – es besteht nur aus einem ABC-Transporter, einem *membrane fusion protein* (MFP) und einem *outer membrane protein* (OMP) wie TolC – kann das T1SS Proteine ATP-abhängig gleichzeitig sowohl über die innere als auch über die äußere Membran transportieren (DELEPELAIRE, 2004).

---

<sup>2</sup> Je nach Anwendungszweck lassen sich noch eine ganze Reihe weiterer subzellulärer Lokalisationen definieren. So unterscheiden z. B. eine Reihe von Vorhersageprogrammen zwischen frei vorkommenden und membranassoziierten Cytoplasmaproteinen. Auch membranintegrale Proteine lassen sich noch weiter klassifizieren je nachdem, wo der N-Terminus liegt (HORLER *et al.*, 2009).

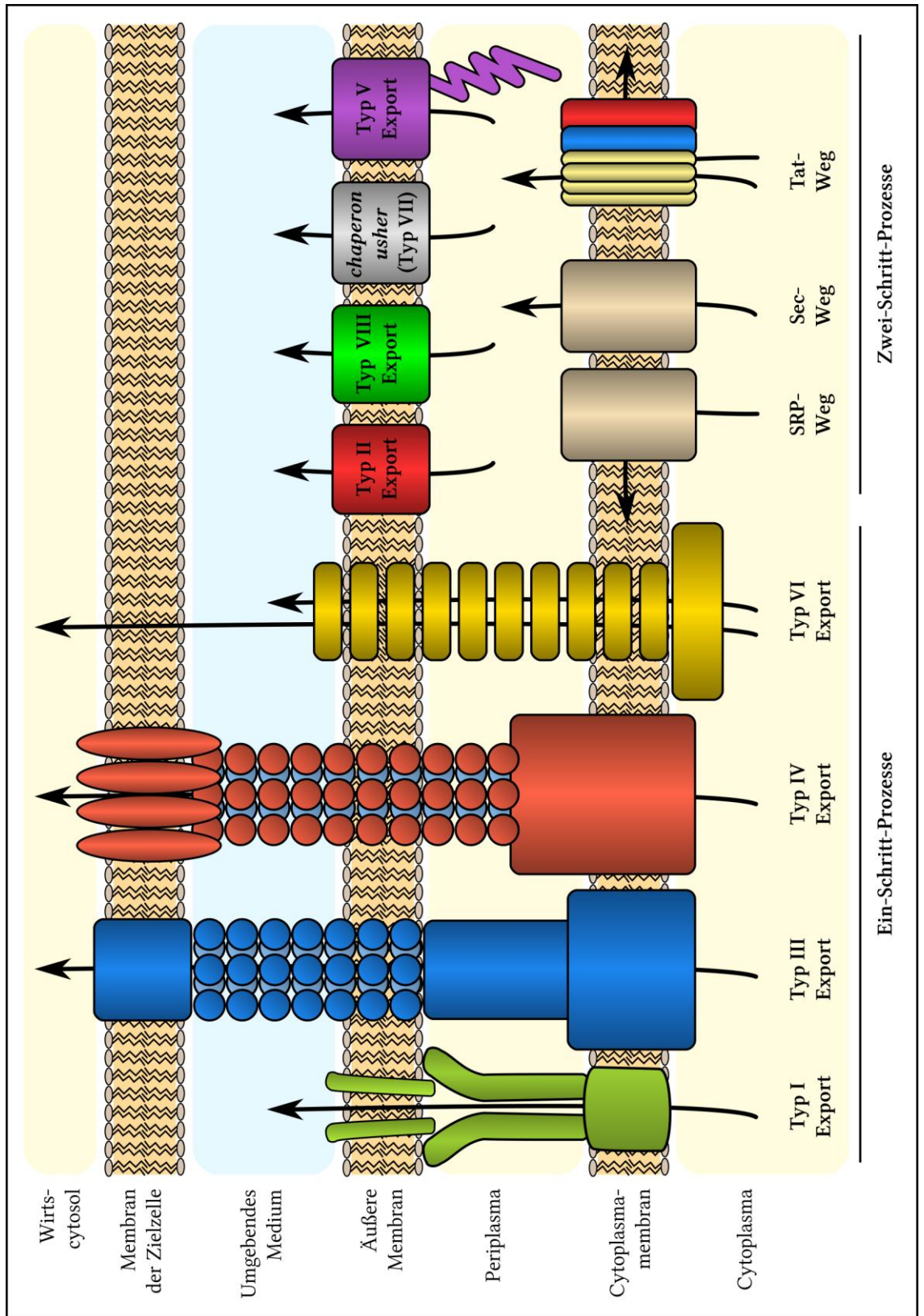


Abb. 1: Übersichtsschema zum Proteintransport in gramnegativen Bakterien. Gezeigt sind die Typen I bis VIII der bekannten Proteinsekretionssysteme in gramnegativen Bakterien sowie der generelle sekretorische (Sec), der SRP- und der Tat-Weg.

Im Gegensatz dazu kann das Typ II-Sekretionssystem (T2SS) Proteine nur über die äußere Membran translozieren und ist deshalb für den Transport über die Cytoplasmamembran auf weitere Transportmechanismen – den generellen sekretorischen Weg (Sec) bzw. das Tat-System – angewiesen. Der *main terminal branch* (MTB), wie das T2SS auch genannt wird, besteht aus bis zu 16 Proteinen, die teilweise auch Teil der Typ IV Pili bzw. an deren Biogenese beteiligt sind.

Das mit dem Geißelapparat verwandte Typ III-Sekretionssystem (T3SS) hat große medizinische Bedeutung, weil viele Pathogene wie *Yersinia* und *Shigella* diesen Weg nutzen, um Effektorproteine, wie z. B. Cytotoxine, nicht nur ins umgebende Medium zu exportieren, sondern diese sogar direkt in Wirtszellen hinein zu sekretieren (BLOCK *et al.*, 2008). Dabei durchspannt der sogenannte Nadelkomplex (auch Injektisom genannt) sowohl die Cytoplasma- als auch die äußere Membran und sogar die der Zielzelle. Mit etwa 30 beteiligten Proteinen ist das Typ III-Sekretionssystem einer der komplexesten bekannten Translokationsmechanismen in Bakterien.

Die Komponenten des Typ IV-Sekretionssystems (T4SS) ähneln sowohl in der Sequenz als auch in der Struktur den Komponenten des bakteriellen Konjugationssystems. Einige Bakterien – vor allem Pathogene wie *Helicobacter pylori*, *Agrobacterium tumefaciens* oder *Legionella pneumophila* – haben das System angepasst, um ATP-abhängig auch DNA-Protein-Komplexe bzw. nur Proteine direkt in Wirtszellen injizieren zu können (BACKERT und SELBACH, 2008).

Das Typ V-Sekretionssystem (T5SS) ist wie das T2SS auf die äußere Membran beschränkt und deshalb ebenfalls abhängig vom Sec-Weg. Mehrere Sekretionsmechanismen, die alle auf der Bildung von  $\beta$ -barrel Poren in der äußeren Membran beruhen, werden zum T5SS zusammengefasst. Proteine, die das Typ Va-Sekretionssystem (Autotransporter) nutzen, sind meist in zwei Domänen unterteilt, wobei eine Domäne eine membranintegrale  $\beta$ -barrel Struktur bildet, was der anderen Domäne – der *passenger domain* – den Transport erlaubt, woraufhin die  $\beta$ -Domäne normalerweise abgespalten wird. Weitere Varianten des Typ V-Sekretionssystems sind die „Zwei-Partner-Systeme“ (Typ Vb) und die Oca-Familie (*oligomeric coiled coils adhesin*) (Typ Vc) (HENDERSON *et al.*, 2004).

Erst seit einigen Jahren bekannt ist das Sekretionssystem des Typs VI (T6SS). Obwohl es zuerst nur in *Vibrio cholerae* und dann auch in *Pseudomonas aeruginosa* gefunden wurde, entdeckte man später schnell, dass es unter den gramnegativen Bakterien recht weit verbreitet ist (BINGLE *et al.*, 2008 bzw. FILLOUX *et al.*, 2008). Transportiert werden vor allem Cytotoxine, ähnlich dem T3SS wahrscheinlich sogar direkt in die Zielzelle. Zwei der Substrate (Hcp und VgrG) sind vermutlich auch gleichzeitig Teil des Transportmechanismus (zusammen mit insgesamt etwa 15 weiteren Proteinen). Während Hcp

(*Haemolysin A co-regulated protein*) eine Art Spitze formt, die eventuell die Membran penetriert, bildet VgrG (*valine-glycine repeats*) Ringe, die sich zu einer Art Röhre verlängern, die dann Periplasma, äußere Membran und auch den Raum zwischen Membran und Zielzelle durchspannt.

Über diese sechs Sekretionswege hinaus wurden in letzter Zeit noch zwei weitere, das Typ VII-Sekretionssystem (T7SS) bzw. das Typ VIII-Sekretionssystem (T8SS), vorgeschlagen (DESVAUX *et al.*, 2009). Das jetzt als T7SS klassifizierte System ist besser bekannt als der *chaperone/usher*-Weg. Dieser ist maßgeblich an der Bildung vieler Pili und Fimbrien beteiligt. Dabei falten die Pili-Untereinheiten im Periplasma durch Bindung an ein Chaperon, um dann, geleitet von einer spezifischen Pore (*usher*), durch die Membran hindurch zu polymerisieren (THANASSI *et al.*, 2005). Andere Veröffentlichungen fassen unter der Bezeichnung T7SS das ESX-1-System und paraloge Transporter zusammen, die eine Rolle bei der Pathogenität von *Mycobacterium tuberculosis* und anderen grampositiven Bakterien spielen (SIMEONE *et al.*, 2009).

Der von DESVAUX *et al.*, 2009 als Typ VIII-Sekretionssystem vorgeschlagene *nucleation-precipitation pathway* (ENP) transloziert *curli* – an der Adhäsion und der Biofilmbildung beteiligte Amyloidfasern – über die äußere Membran (WU und FIVES-TAYLOR, 2001 sowie KOSTAKIOTI *et al.*, 2005).

### 1.1.2 DER GENERELLE SEKRETORISCHE WEG

Die oben genannten Wege sekretieren oft nur eine geringe Anzahl von Proteinen und sind als spezialisierte Mechanismen anzusehen. Im Gegensatz dazu stehen die beiden generellen Transportwege: der Sec- und der Tat-Weg.

Der generelle sekretorische Weg (GSP bzw. Sec für *general secretory pathway*) transloziert einen Großteil der Proteine in gramnegativen Bakterien und findet sich darüber hinaus in allen Domänen des Lebens, so z. B. im endoplasmatischen Retikulum (ER) der Eukaryoten (SAIER *et al.*, 2008). Es werden ungefaltete Proteine, die N-terminal ein spezifisches Signalpeptid tragen (s. Abb. 2), ATP-abhängig mit Hilfe des SecYEG-Translokons über die Cytoplasmamembran transportiert. Dabei wird zwischen der SecB-abhängigen posttranslationalen Sekretion und der durch das *signal recognition particle* (SRP) vermittelten co-translationalen Sekretion unterschieden. SecB hält in den Proteobakterien als Chaperon eine Reihe von Substraten wie das Maltosebindeprotein (MBP) bei der posttranslationalen Sekretion bis zum Transport ungefaltet. Bei dem co-translationalen SRP-Weg vermittelt das SRP eine Interaktion zwischen Substrat, Ribosom und Translokon. Dies führt häufig zur Integration von Proteinen in die Cytoplasmamembran

(DE GIER *et al.*, 1997) – bei der die Insertase YidC hilft – und seltener zum Export ins Periplasma (LUIRINK *et al.*, 2005). Sowohl der SRP-abhängige als auch der SecB-abhängige Transport benötigen Energie vor allem in Form von ATP oder GTP (NATALE *et al.*, 2008). Der co-translationale Transport wird hauptsächlich durch die GTP-abhängige Elongation der Polypeptidkette angetrieben, während der posttranslationale Transport vorwiegend durch ATP energetisiert wird. Die Umsetzung des ATP erfolgt dabei durch die ATPase SecA (WICKNER, 1994).

Zur subzellulären Lokalisation des Sec-Systems gibt es widersprüchliche Meinungen: es wird entweder eine gleichmäßige Verteilung in der Membran (BRANDON *et al.*, 2003 und POP *et al.*, 2003) oder eine helikale Anordnung (SHIOMI *et al.*, 2006 und CAMPO *et al.*, 2004) angenommen.

Ein weiterer genereller Weg ist das *twin-arginine translocation system* – das Tat-System. Da es im Mittelpunkt dieser Arbeit steht, soll es im Folgenden ausführlicher charakterisiert werden.

## 1.2 DER TAT-TRANSPORT IN *ESCHERICHIA COLI*

Viele Bakterien, Archaeen, die Plastiden der Pflanzen (DILKS *et al.*, 2003) und eventuell auch die pflanzlichen Mitochondrien (BOGSCH *et al.*, 1998) besitzen ein zweites generelles Proteinsekretionssystem, das unabhängig vom Sec-Weg funktioniert (BERKS, 1996). Erste Hinweise auf diesen Sekretionsweg gab es schon 1988 bei einer in *E. coli* exprimierten Hydrogenase aus *Desulfovibrio vulgaris* (VAN DONGEN *et al.*, 1988). In den darauf folgenden Jahren entdeckte man auch in Thylakoiden Substrate, die Sec-unabhängig transportiert wurden (CLINE *et al.*, 1992 sowie KLÖSGEN *et al.*, 1992). Im gleichen Jahr wurde auch das Signalpeptid der Hydrogenasen von *D. vulgaris* in *E. coli* näher charakterisiert (NIVIERE *et al.*, 1992), und bald darauf erkannte man die Bedeutung der zwei namengebenden Arginine (CHADDOCK *et al.*, 1995). Kurze Zeit später wurde dann durch Sequenzvergleiche entdeckt, dass das  $\Delta$ pH-abhängige Translokationssystem sowohl in Pflanzen als auch in Bakterien vorkommt (SETTLES *et al.*, 1997), und ein Jahr darauf konnten dann die Komponenten des Tat-Systems auch in *E. coli* identifiziert werden (WEINER *et al.*, 1998). Das Tat-System wurde anfänglich noch Mtt-System (*membrane targeting and translocation*) genannt (*ibid.*), jedoch setzte sich schon einige Monate später der Name *twin-arginine translocation system* (Tat-System) durch (SARGENT *et al.*, 1998). Es unterscheidet sich vom generellen sekretorischen Weg vor allem durch die Fähigkeit, gefaltete Proteine zu translozieren, und durch die Art der Energetisierung. Denn im Gegensatz zum Sec-Weg wird die Translokation beim Tat-System, unabhängig

von ATP oder GTP, hauptsächlich durch die pH-Differenz ( $\Delta\text{pH}$ ) über der Membran angetrieben (MOULD und ROBINSON, 1991 sowie CLINE *et al.*, 1992). Höchstwahrscheinlich spielt auch das Membranpotential ( $\Delta\Psi$ ), das zusammen mit dem  $\Delta\text{pH}$ -Gradienten die protonenmotorische Kraft (PMK)<sup>3</sup> bildet, eine entscheidende Rolle (THEG *et al.*, 2005), da sowohl in *Chlamydomonas reinhardtii* (FINAZZI *et al.*, 2003) als auch in invertierten *E. coli*-Membranvesikeln (BAGESHWAR und MUSSER, 2007) gezeigt werden konnte, dass das Tat-System auch ohne einen pH-Gradienten funktioniert. Da sie sich sehr ähnlich sind, werden die Tat-Wege der Pflanzen und Prokaryoten im Folgenden gemeinsam behandelt.

### 1.2.1 DIE TAT-SUBSTRATE

Proteine, die von Sekretionssystemen transportiert werden, nennt man auch „Substrate“ dieser Transportwege. Zu diesen gehören beim Tat-Weg vor allem Proteine, deren Co-Faktoren nur im Cytoplasma korrekt assemblieren, wie z. B. die TMAO-Reduktase, die DMSO-Reduktase oder auch die Formiat-Dehydrogenase (BERKS *et al.*, 2005). Das Tat-System ist deshalb essentiell für viele Prozesse der Atmungskette in *E. coli*.

Eine weitere Gruppe von Proteinen, die transportiert werden, obwohl sie keine Co-Faktoren enthalten (wie AmiA und AmiC), falten eventuell zu schnell oder zu fest, um mit dem Sec-Weg kompatibel zu sein (BERKS *et al.*, 2000b und WU *et al.*, 2000).

Bei einigen extrem halophilen Archaeen wurde ein Sonderfall beobachtet. Diese Organismen haben auf Grund der hohen Salzkonzentrationen Schwierigkeiten, Proteine ungefaltet zu halten und deren Aggregation zu vermeiden. Sie nutzen deshalb vergleichsweise extensiv das Tat-System zur Sekretion von schon im Cytoplasma gefalteten Proteinen (ROSE *et al.*, 2002).

Obwohl all diese Substrate in gefaltetem Zustand transportiert werden, unterliegen sie dabei anscheinend nur geringen Größenbeschränkungen. Während das *high-potential iron sulfur protein* (HiPIP), das kleinste natürliche Substrat, bei etwa 9 kDa anfängt, erreichen die Heterodimere der Formiatdehydrogenasen eine Größe von bis zu 150 kDa und gehören damit zu den größten sekretierten Proteinen in *E. coli* überhaupt. Die Durchmesser reichen von HiPIP (2 nm x 3 nm laut CARTER *et al.*, 1974) bis hin zu den etwa 7 nm breiten Heterodimeren der Formiatdehydrogenasen.

---

<sup>3</sup> Statt PMK wird oft die englische Abkürzung *pmf* für *proton motive force* verwendet. Sie berechnet sich nach folgender Formel aus dem Membranpotential und dem  $\Delta\text{pH}$ -Gradienten:  $pmf = \Delta\Psi - \frac{2,3RT}{F} \cdot \Delta\text{pH}$ , wobei R für die Gas-, F für die Faradaykonstante und T für die absolute Temperatur steht (nach MITCHELL, 1966).

Der Aufwand für die Zelle ist dabei enorm. Für das Tat-System der Thylakoiden wurde ermittelt, dass der Transport eines einzigen Proteins die Zelle etwa 80000 Protonen „kostet“ (ALDER und THEG, 2003). Dieser hohe Energiebedarf erklärt sicherlich auch die normalerweise, im Verhältnis zur Gesamtzahl an sekretierten Proteinen, relativ geringe Zahl von Tat-Substraten. So wurden bis zu diesem Zeitpunkt in *E. coli* nur 28 Substrate beschrieben<sup>4</sup>, davon knapp die Hälfte mit Fe-S-Cofaktoren. Diese 28 Tat-Substrate machen lediglich etwa 6% der 452 Zellhüllenproteine<sup>5</sup> in *E. coli* aus. Auch sind diese Substrate unter Laborbedingungen nicht essentiell und der *E. coli*-Stamm DADE ( $\Delta tatABCD$ ,  $\Delta tatE$ ) deshalb mit gewissen Einschränkungen lebensfähig (WEXLER *et al.*, 2000).

### 1.2.2 TAT-SPEZIFISCHE SIGNALPEPTIDE

Wie auch die Substrate des Sec-Weges besitzen Substrate, die durch das Tat-System sekretiert werden, N-terminale Signalpeptide. Die allgemeine Struktur ist zusammen mit je zwei Beispielen sowohl für den Sec- als auch für den Tat-Weg in Abb. 2 gezeigt.

<b>Sec-Signalpeptide:</b>			
	n-Region	h-Region	c-Region
	MKKT	AI	AI
	VAL	AG	FAT
	VA	QA	
	n-Region	h-Region	c-Region
	MKQ	ST	IA
	L	L	L
	P	L	L
	F	T	P
	V	T	K
	A		
<b>Tat-Signalpeptide:</b>			
	n-Region	h-Region	c-Region
	MKTK	IP	DA
	V	L	A
	E	V	S
	RR	GL	V
	K	T	T
	A	I	G
	G	L	A
	M	A	S
	S	A	L
	T	L	P
	F	S	R
	I	A	H
	A		
	n-Region	h-Region	c-Region
	MSD	K	P
	I	S	K
	RR	DA	V
	K	V	M
	L	G	T
	A	A	A
	I	P	M
	I	N	L
	V	G	F
	G	T	A
	R	A	

Abb. 2: Die Signalpeptide des Sec- und des Tat-Weges. Es werden exemplarisch je zwei Signalpeptide vorgestellt: das Signalpeptid des *outer membrane protein A* (OmpA) und das der alkalischen Phosphatase (PhoA) für den Sec-Weg sowie das Signalpeptid der katalytischen Untereinheit der Dimethylsulfoxid-Reduktase (DmsA) bzw. das des *high potential iron sulfur protein* (HiPIP) für das Tat-System. Die *consensus*-Tat-Sequenz ist fett markiert, die zwei Arginine rot.

Die Signalpeptide des Tat-Weges zeigen einen stark konservierten Aufbau und ähneln denen des Sec-Weges, auch wenn sie länger und weniger hydrophob sind (CRISTOBAL *et al.*, 1999). Sie besitzen N-terminal eine polare „n-Region“. Diese enthält an ihrem carboxyterminalen Ende ein für den Transport essentielles Sequenzmotiv aus einem hydro-

<sup>4</sup> Nach Tracy Palmer ([http://www.lifesci.dundee.ac.uk/groups/tracy\\_palmer/docs/signals.htm](http://www.lifesci.dundee.ac.uk/groups/tracy_palmer/docs/signals.htm)) (Stand: 13.07.2009).

<sup>5</sup> Quelle ist hierbei "The *E. coli* Cell Envelope Protein Data Collection" (ECCE) von Michael Ehrmann. Zu finden ist diese unter der URL <http://www.cf.ac.uk/biosi/staffinfo/ehrmann/tools/ecce/ecce.htm> (Stand: 13.07.2009).



philen Rest, zwei Argininen, gefolgt von einer beliebigen und zwei hydrophoben Aminosäuren sowie einem weiteren hydrophilen Rest<sup>6</sup> (BERKS, 1996 und STANLEY *et al.*, 2000). Die beiden stark konservierten Arginine waren namensgebend für das Tat-System. Es folgt eine hydrophobe „h-Region“ und fast immer eine kurze hydrophile „c-Region“ am carboxyterminalen Ende. Hier befindet sich die Erkennungsstelle (AxA), wo am Ende des Transportvorganges die Signalpeptidase normalerweise das Signalpeptid vom *precursor* abschneidet und so ein matures Protein entstehen lässt (VON HEIJNE, 1983).

Interessanterweise enthalten eine Reihe von Sec-Substraten zumindest potentielle Tat-Signalpeptide. Es scheint ein Mechanismus zu existieren, der manche überexprimierte Sec-Substrate teilweise zum Tat-Weg umleiten kann (KOUWEN *et al.*, 2009).

### 1.2.3 DIE KOMPONENTEN DES TAT-SYSTEMS

In *E. coli* sind bisher fünf Tat-Gene bekannt: *tatABCD* und *tatE*. Das Tat-System besteht in diesem Organismus jedoch grundsätzlich nur aus den drei essentiellen Hauptkomponenten TatA (10 kDa), TatB (19 kDa) und TatC (29 kDa) (s. Abb. 3). Zu TatD und TatE weiter unten in diesem Abschnitt mehr.

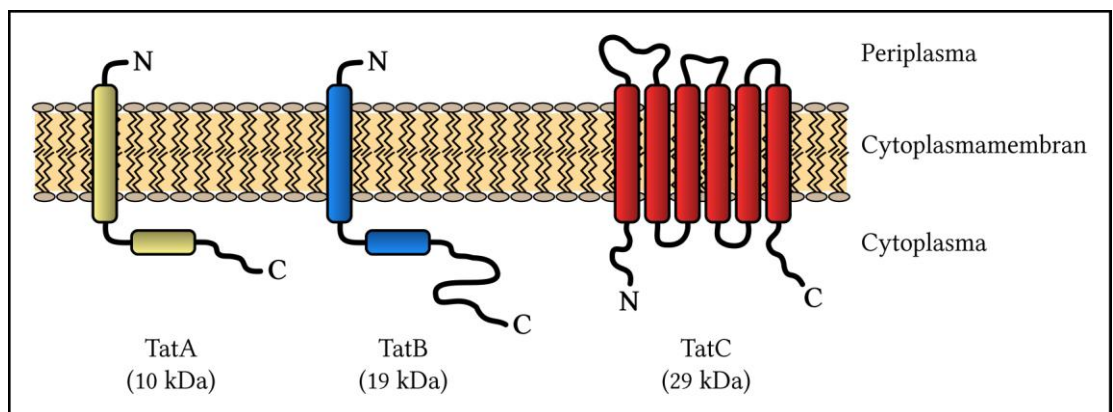


Abb. 3: Die drei Hauptkomponenten des Tat-Systems in *E. coli*. In dieser schematischen Darstellung sind die drei Komponenten TatA (gelb), TatB (blau) und TatC (rot) gezeigt.

Aus anderen Bakterien – wie beispielsweise *Bacillus subtilis* – sind Zweikomponentensysteme bekannt. *B. subtilis* ist auch deshalb ein Sonderfall, weil es sogar zwei verschiedene Tat-Systeme bestehend aus jeweils zwei Komponenten (TatA(y) und TatC(y) bzw. TatA(d) und TatC(d)) besitzt, die beide für unterschiedliche Substrate optimiert sind (JONGBLOED *et al.*, 2004).

<sup>6</sup> Die *consensus*-Tat-Sequenz der Proteobakterien wird meist mit S/T-R-R-x-F-L-K angegeben (wobei ‚x‘ für eine beliebige Aminosäure steht). Es existieren jedoch eine Reihe von Ausnahmen.



TatA und TatB von *E. coli* sind sich strukturell wahrscheinlich sehr ähnlich<sup>7</sup>, auch wenn für keine der Tat-Komponenten bisher Strukturen veröffentlicht wurden, und *tatB* ist, ebenso wie *tatE*, vermutlich Ergebnis einer Genduplikation von *tatA* (YEN *et al.*, 2002). So genügen schon wenige Austausch nahe des Aminoterminus von TatA, um auch in *E. coli* aus dem Drei- ein Zweikomponentensystem ohne TatB zu machen (BLAUDECK *et al.*, 2005). Sogar ohne das Einführen von Mutationen kommt es in *E. coli* bei einigen Substraten auch mit einem TatACE- bzw. einem TatBCE-System zu einem Transport, allerdings auf sehr niedrigem Niveau (IZE *et al.*, 2002). TatA und TatB sind also bis zu einem gewissen Grade austauschbar, und es scheint sich bei dem Dreikomponentensystem in *E. coli* nur um eine Variante des TatAC-Systems zu handeln.

Die Gene für die drei Hauptkomponenten des Tat-Systems in *E. coli*, *tatA*, *tatB* und *tatC*, liegen zusammen mit dem Gen *tatD* auf einem polycistronischen Operon bei 86 Minuten auf dem *E. coli*-Chromosom. Da die Deletion von *tatD* keinen direkten Einfluss auf den Tat-Transport hat und für TatD eine Nukleaseaktivität nachgewiesen wurde, ging man lange davon aus, dass TatD – trotz der auffälligen Lage im *tatABCD*-Operon – keine Rolle im Rahmen des Tat-Systems spielt (WEXLER *et al.*, 2000). Dies änderte sich erst neun Jahre später, als entdeckt wurde, dass TatD den Abbau von fehlgefalteten FeS-Proteinen begünstigt (MATOS *et al.*, 2009). Es fungiert dabei wahrscheinlich als eine Art Qualitätskontrolle für Proteine wie NrfC oder NapG, wobei der Mechanismus im Dunkeln bleibt (*ibid.*). Ohne TatD akkumulieren die fehlgefalteten Proteine.

Bei 14 Minuten existiert auf dem *E. coli*-Genom noch ein weiteres *tat*-Gen, das monocistronische *tatE* (SARGENT *et al.*, 1998 und BERKS *et al.*, 2000a). TatE weist eine etwa 60%ige Aminosäureidentität mit TatA auf, und beide Proteine sind funktionell austauschbar. Bei *tatE* scheint es sich um eine kryptische Genduplikation zu handeln, auch weil das Expressionsniveau um bis zu einem Faktor von 100 niedriger ist als das des *tatA*-Gens (JACK *et al.*, 2001).

Das Verhältnis von *tatA* zu *tatB* zu *tatC* in *E. coli* wird meist mit 50:2:1 angegeben (*ibid.*). Auf Proteinebene wurde durch quantitative Western Blots auf einen etwa 19-fachen Überschuss von TatA gegenüber TatB geschlossen (SARGENT *et al.*, 2001). Für andere Organismen gibt es teilweise sehr stark abweichende Befunde. So wurden kürzlich für *Arabidopsis thaliana* äquimolare Verhältnisse von TatB zu TatC veröffentlicht (JAKOB *et al.*, 2009). TatA kam in diesen Proben in nur sehr geringen Mengen vor (5-10% der Menge an TatB bzw. TatC).

TatA, TatB und TatE sind recht ähnlich aufgebaut. Alle drei Proteine besitzen einen N-terminalen  $\alpha$ -helikalen transmembranen Bereich, dessen N-Terminus wahrscheinlich

---

<sup>7</sup> Die Sequenzidentität auf Aminosäureebene beträgt allerdings nur etwa 25% (BERKS *et al.*, 2000a).

in das Periplasma zeigt. Nach einer kurzen und flexiblen *hinge*-Region (JONGBLOED *et al.*, 2006) schließt sich eine amphipathische Helix und der – bei TatB etwas längere – C-terminale Bereich an (BARRETT und ROBINSON, 2005). Für TatA gibt es auch Untersuchungen, die nahelegen, dass sowohl der N- als auch der C-Terminus im Cytoplasma angesiedelt sind (PORCELLI *et al.*, 2002 und CHAN *et al.*, 2007). Die amphipathische Helix würde dann in der Membran liegen, und periplasmatisch lokalisiert wäre nur die kurze *hinge*-Region.

TatC unterscheidet sich strukturell von den anderen Tat-Komponenten einerseits durch seine Größe und andererseits durch die Tatsache, dass TatC sechs Membrandurchgänge besitzt (BEHRENDT *et al.*, 2004 und KI *et al.*, 2004). Sowohl der N- als auch der C-Terminus von TatC liegen im Cytoplasma.

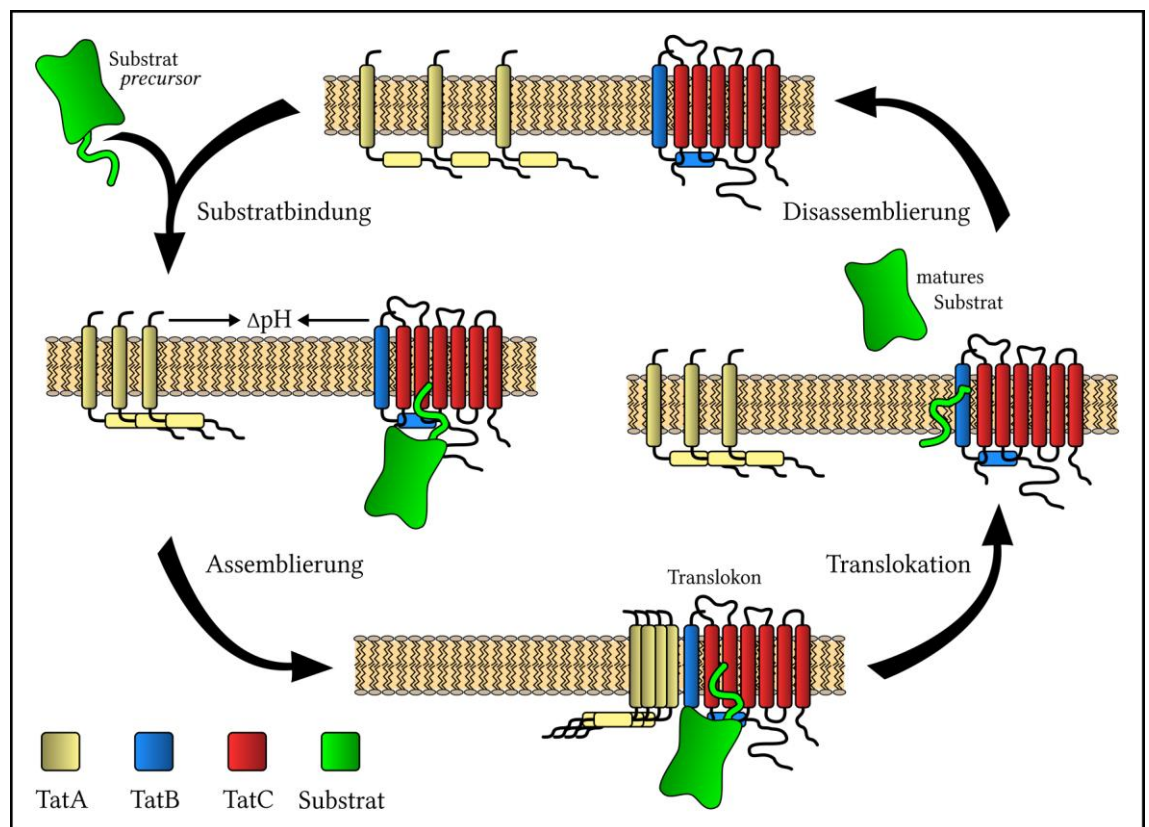
Die zu TatA, TatB und TatC homologen Proteine in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten werden Tha4 (entspricht TatA), Hcf106 (TatB) und cpTatC (TatC) genannt (CLINE und MORI, 2001).

#### 1.2.4 ÜBER DEN MECHANISMUS DES TAT-SYSTEMS

Die einzelnen Rollen der drei Tat-Komponenten bei der Translokation und der genaue Mechanismus dieses Transportvorganges sind im Detail nach wie vor ungeklärt. Es ist bekannt, dass TatA, TatB und TatC sowohl mit sich selbst als auch mit den Substraten interagieren und so das aktive Translokationssystem formen. Das allgemeine Schema des Tat-Mechanismus ist in Abb. 4 gezeigt.

Man geht davon aus, dass in der Membran TatBC-Komplexe existieren (BOLHUIS *et al.*, 2001 sowie MÜLLER und KLÖSGEN, 2005). In diesen je nach Studie 370 kDa bis 700 kDa großen Komplexen liegen TatB und TatC im Verhältnis 1:1 vor (DE LEEUW *et al.*, 2002; RICHTER und BRÜSER, 2005 sowie MCDEVITT *et al.*, 2006). Von diesen Komplexen aus interagiert TatC mit dem RR-Motiv des Signalpeptids (CLINE und MORI, 2001; ALAMI *et al.*, 2003 sowie GERARD und CLINE, 2007), während TatB eher mit dem hydrophoben Bereich des Signalpeptids Kontakt zu haben scheint (GERARD und CLINE, 2006). Im Zuge der Bildung des TatBC-Substrat-Komplexes (**Substratbindung**) kommt es wahrscheinlich zu einer das Membranpotential benötigenden Konformationsänderung, die wiederum zur Rekrutierung von TatA führt (**Assemblierung**) (CLINE und MORI, 2001; MORI und CLINE, 2002 sowie DABNEY-SMITH *et al.*, 2006). TatA liegt in eigenen Komplexen sehr unterschiedlicher Größe vor (OATES *et al.*, 2005), die den Substraten den Membrandurchtritt erlauben, eventuell indem sie eine Art flexible, wassergefüllte Pore bilden (SARGENT *et al.*, 2006). Sowohl TatA als auch TatB bilden Leitern von

Komplexen unterschiedlicher Größe in *blue native*-Gelen (BEHRENDT *et al.*, 2007). Anschließend beginnt die **Translokation**, wobei höchstwahrscheinlich TatC der eigentliche Motor ist (GERARD und CLINE, 2006). Sobald der Transport stattgefunden hat, wird das Signalpeptid von der Signalpeptidase LepB an der spezifischen Erkennungsstelle<sup>8</sup> abgeschnitten (VON HEIJNE, 1990 und YAHR und WICKNER, 2001). Das jetzt mature Substrat wird ins Periplasma bzw. in die Membran hinein entlassen (FRIELINGSDORF und KLÖSGEN, 2007). Abschließend erfolgt die **Disassemblierung** von TatA. Der Zyklus kann von Neuem beginnen (MORI und CLINE, 2002).



**Abb. 4: Modell des Tat-Systems in *E. coli*.** In diesem stark vereinfachten Modell ist der grundsätzliche Ablauf einer Translokation in einem Dreikomponentensystem skizziert. In diesem Modell (nach MORI und CLINE, 2002) wird der Zyklus in vier Schritte unterteilt: die **Substratbindung**, die **Assemblierung** des Translokons, die eigentliche **Translokation** und die darauf folgende **Disassemblierung**. In der Darstellung oben ist die Situation in *E. coli* gezeigt: das Periplasma befindet sich für den Betrachter oben und das Cytoplasma unten<sup>9</sup>.

Zum Schritt der Membrandurchquerung gibt es wiederum eine Reihe von Modellen. Bei dem von uns (BRÜSER und SANDERS, 2003) favorisierten *membrane weakening and*

<sup>8</sup> s. a. Abschnitt 1.2.2.

<sup>9</sup> Bei schematischen Darstellungen des thylakoidalen Tat-Systems ist die gezeigte Transportrichtung meist umgekehrt: der Transport findet dort oft von oben nach unten statt. Dies geschieht vielleicht, um den Transport in das Thylakoidlumen hinein vom Transport aus dem Cytoplasma heraus zu unterscheiden (obwohl beide Translokationen *per definitionem* Exportvorgänge sind (SCHATZ und DOBBERSTEIN, 1996)).

*pulling*-Mechanismus existiert keine wassergefüllte definierte Pore, sondern TatA schwächt die Membran lokal um das Translokon, sodass TatC das Substrat ins Periplasma ziehen kann.

### 1.3 SUBZELLULÄRE LOKALISATIONEN IN BAKTERIEN

Als einer der Hauptunterschiede von pro- und eukaryotischen Zellen wurde lange Zeit die höhere intrazelluläre Differenzierung der Eukaryoten (vor allem basierend auf der Existenz von intrazellulären Organellen in den Eukaryotenzellen) angesehen. Es stimmt zwar natürlich nach wie vor, dass die Prokaryoten einfacher aufgebaut sind, aber es setzt sich immer mehr die Erkenntnis durch, dass auch diese Zellen extrem komplexe Systeme sind, die ein hohes Maß an subzellulärer räumlicher und zeitlicher Organisation und Differenzierung aufweisen.

Wichtige subzelluläre Lokalisationen sind die Zellpole, der Bereich um das Septum sowie die Membran. Auch gibt es eine Reihe von Proteinen, die, wie das Zytoskelettprotein MreB, in Form einer Helix vorliegen. Andere Proteine wiederum ändern stetig ihre Position, wie die oszillierenden Proteine des MinCDE-Systems.

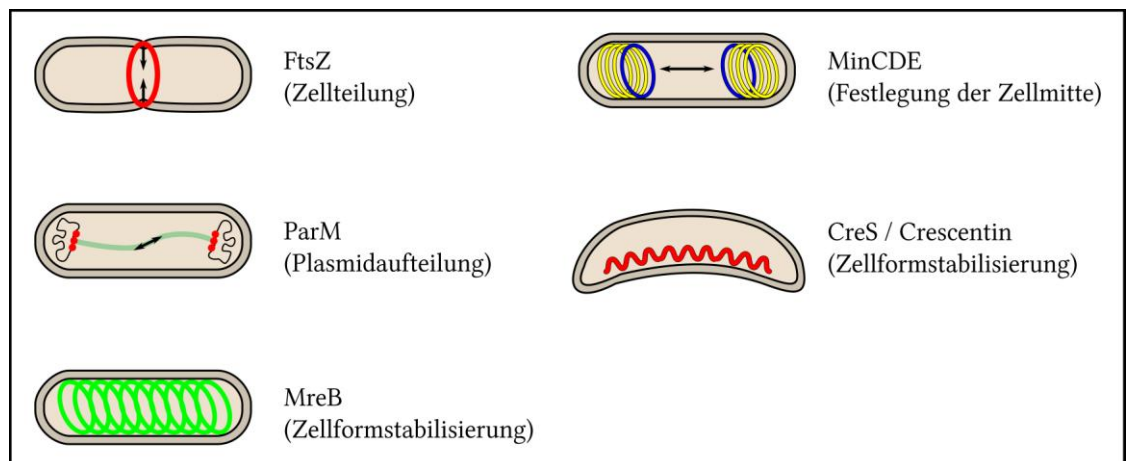
Aber nicht nur Proteine sind asymmetrisch in den Zellen verteilt. So variiert auch die Zusammensetzung der Cytoplasmamembran zwischen den Zellpolen und lateralen Bereichen. Cardiolipin beispielsweise kommt fast ausschließlich an den Zellpolen und im Bereich des Septums vor (MILEYKOVSKAYA und DOWHAN, 2000). Und es gibt Proteine (wie z. B. den osmoregulatorischen Transporter ProP), die auf Grund genau dieser unterschiedlichen Membranzusammensetzung nur an den Polen in die Membran inserieren (ROMANTSOV *et al.*, 2007).

Dieser direkte Mechanismus gehört zu einer von vier grundsätzlichen Möglichkeiten, Proteine an die Pole zu bringen (BARDY und MADDOCK, 2007). Neben der eben beschriebenen Integration auf Grund von spezieller Lipidzusammensetzung kann z. B. auch die polare Lokalisation der Ribosomen, wie in *B. subtilis* (MASCARENHAS *et al.*, 2001), aber auch in *E. coli* (ROMANTSOV *et al.*, 2008) beschrieben, zu einer Membranintegration von Proteinen direkt in den polaren Bereichen führen. Zwei weitere Möglichkeiten sind die laterale Integration in die Membran und anschließende gerichtete Migration an die Pole bzw. die Integration in der Nähe der aktuellen oder zukünftigen Teilungsebenen (den sogenannten  $\frac{1}{4}$ - bzw.  $\frac{3}{4}$ -Positionen). Diese Bereiche werden dann nach einer oder mehreren Teilungen zu Zellpolen.

Weitere wichtige Determinanten für die Lokalisation von Proteinen gehören zum bakteriellen Zytoskelett, von dem ich deshalb einige Komponenten im folgenden Abschnitt kurz vorstellen möchte.

### 1.3.1 DAS BAKTERIELLE ZYTOSKELETT

In den letzten Jahrzehnten wurden eine Reihe von Komponenten des bakteriellen Zytoskeletts entdeckt (s. Abb. 5 für eine schematische Übersicht). Am längsten bekannt ist das Tubulin-homologe **FtsZ**, das in einer Ringstruktur (dem Z-Ring) am Septum organisiert ist und zusammen mit FtsA (homolog zum eukaryotischen Aktin) die Zelle während der Teilung einschnürt (BEALL und LUTKENHAUS, 1991). Weitere Komponenten des Einschnürapparates sind unter anderen ZipA (HALE *et al.*, 2000) und ZapA (LOW *et al.*, 2004) sowie Sula in Cyanobakterien und Plastiden (MAPLE *et al.*, 2004).



**Abb. 5: Wichtige Zytoskelettbestandteile in Bakterien.** Es sind schematisch fünf verschiedene Komponenten des bakteriellen Zytoskeletts gezeigt. FtsZ (rot) ist maßgeblich am Abschnüren des Septums bei der Zellteilung beteiligt. ParM (mintgrün) ist zusammen mit ParR (rot) die treibende Kraft beim Verteilen von Tochterplasmiden vor der Zellteilung. MreB (hellgrün) liegt spiralförmig in der Zelle vor und hat sowohl strukturelle als auch organisierende Aufgaben (Zellpolarität). Sowohl der MinCD-Komplex (gelb), der die Zellmitte festlegt, an der sich während der Zellteilung der Z-Ring bildet, als auch MinE (blau) oszillieren zwischen den Zellpolen. CreS (rot) ist zusammen mit MreB, besonders bei gebogenen Bakterien, verantwortlich für die Zellform.

Eine vor allem strukturelle Aufgabe hat **MreB** (DEN BLAAUWEN *et al.*, 2008). Es ist ein Homolog des eukaryotischen Aktins und bewegt sich – durch Polymerisation an einem Ende und gleichzeitige Depolymerisation am anderen Ende – in helikalen Bahnen an der Innenseite der Membran entlang. Stäbchenförmige Bakterien nehmen bei einer MreB-Inhibition (z. B. mit dem antibiotischen Inhibitor A22 (IWAI *et al.*, 2002)) oder bei einer MreB-Mutation eine charakteristische Kugelform an. Für einer Reihe von Proteinen ist

MreB auch eine polare Determinante. Beispiele dafür sind das Chemotaxis-Protein Tar<sup>10</sup> (SHIH *et al.*, 2005), der Virulenzfaktor IcsA in *Shigella flexneri* (*ibid.*) sowie die membranintegralen Proteine PleC, DivJ und CckA in *Caulobacter crescentus* (GITAI *et al.*, 2004).

Ebenfalls in *C. crescentus* wurde das nach diesem Organismus benannte **Crescentin** (CreS) entdeckt (AUSMEES *et al.*, 2003). Es entspricht eher den eukaryotischen Intermediärfilamenten und sorgt zusammen mit MreB für die eponymische, gebogene Zellform des Bakteriums. Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass Crescentin bzw. ähnliche Proteine weiter verbreitet sind, als man bisher glaubte (BAGCHI *et al.*, 2008).

Ein weiteres Zytoskelettelement ist die ATPase **ParM** (SALJE *et al.*, 2009). Sie kann in beide Richtungen zu einem doppelhelikalen Filament polymerisieren und erfüllt zusammen mit ParR und *parC* die sehr spezielle Aufgabe der Aufteilung von R1-Plasmiden in die Tochterzellen bei einer Zellteilung. Die eukaryotische Entsprechung ist der Spindelapparat. ParR ist dabei ein DNA-Bindeprotein und übernimmt eine Funktion ähnlich dem eukaryotischen Kinetochor. Es bindet sowohl an das Tubulin-ähnliche ParM als auch an die *parC*-Region (entspricht dem Zentromer) des Plasmids. Durch Polymerisation werden die beiden Plasmide dann auseinander und in Richtung der Zellpole gedrückt. Bei F-Plasmiden erfüllen SopA, SopB und *sopC* sehr ähnliche Funktionen (GITAI, 2006).

Ein fundamental wichtiges System ist auch das **MinCDE**-System (MinCD und DivIVA in *Bacillus*). Es ermöglicht der Zelle, die eigene Mitte zu bestimmen, und spielt deshalb eine wichtige Rolle bei der Festlegung des Septums. Dabei bilden MinC und MinD einen Komplex, der von einem Pol zum anderen oszilliert (nur in *E. coli*)<sup>11</sup>. Der topologische Regulator des MinCDE-Systems – MinE – liegt dabei als Ring vor, der dem MinCD-Komplex gleichsam hinterherwandert und ihn dabei auflöst (GRAUMANN, 2007). Es entsteht ein Gradient von MinCD mit einer hohen Dichte an den Polen und einem Minimum in der Zellmitte. Da MinC die FtsZ-inhibierende Komponente ist, ist die Wahrscheinlichkeit, einen Z-Ring bilden zu können, deshalb in der Zellmitte am größten.

---

<sup>10</sup> Spätere Studien widersprechen dem jedoch und berichten, dass Tar in *E. coli* mit dem angeblich helikal organisierten Sec-System interagiert und nicht mit MreB (SHIOMI *et al.*, 2006). Ähnliche Ergebnisse gibt es auch aus *Bacillus* (CAMPO *et al.*, 2004). Da es jedoch auch Veröffentlichungen gibt, die das Sec-System gleichmäßig verteilt in der Membran lokalisieren (BRANDON *et al.*, 2003), muss man bei Schlussfolgerungen vorsichtig sein. Es gibt sogar noch eine dritte Theorie, nach der Tar ganz unabhängig vom Sec-System oder von MreB mit den ¼- und ¾-Positionen interagiert und deswegen nach zwei Teilungen an den Polen endet (THIEM *et al.*, 2007).

<sup>11</sup> In *Bacillus subtilis* z. B. wird der MinCD-Komplex von DivIVA an den Polen fixiert. Der Unterschied liegt eventuell in der Notwendigkeit begründet, auch asymmetrische Teilungen im Zuge der Sporulation durchführen können zu müssen (CHA und STEWART, 1997).

## 1.4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Das Hauptinteresse dieser Arbeit galt der Frage, wo die Translokation von gefalteten Proteinen mit Hilfe des Tat-Systems aus dem Cytoplasma in die Membran bzw. in den periplasmatischen Raum erfolgt bzw. ob die Translokons überhaupt an bestimmten Orten konzentriert sind. Zu diesem Zweck wurden sowohl die Tat-Substrate als auch die Tat-Komponenten bzw. indirekt auch die aktiven Translokons mit verschiedenen molekularbiologischen und mikroskopischen Techniken markiert, verfolgt und beobachtet. Gleichzeitig sollten dabei die Hintergründe und die zellulären Mechanismen der Polarität der Proteine untersucht werden.

Genauere Informationen über die Lokalisation der Tat-Komponenten und ihr strukturelles Zusammenwirken sollten Auskunft geben über die Art und Weise, wie das Tat-System derart spezifisch und effizient so große gefaltete Proteine über die Cytoplasmamembran transportieren kann.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 BAKTERIENSTÄMME, PLASMIDE UND PRIMER

Die unten stehende Tab. 4 führt alle verwendeten *E. coli*-Stämme auf. Die Zeilen aller folgenden Tabellen sind nur der Übersichtlichkeit halber alternierend weiß und grau hinterlegt.

Tab. 4: Verwendete Bakterienstämme

<i>E. coli</i> -Stamm	Eigenschaften	Referenz
BØD	MC4100, $\Delta tatB$	SARGENT <i>et al.</i> , 1999
BØD $ara^R$	BØD, $ara^R$	BERTHELMANN, 2004
BW25113	$\Delta(araD-araB)567$ , $\Delta lacZ4787(::rrnB-3)$ , $\lambda$ - $da^-$ , $rph-1$ , $\Delta(rhaD-rhaB)568$ , $hsdR514$ , Wildtypstamm	DATSENKO und WANNER, 2000
DADE	MC4100, $\Delta tatABCD$ , $\Delta tatE$	WEXLER <i>et al.</i> , 2000
DADE $ara^R$	DADE, $ara^R$	BERTHELMANN, 2004
JW1165 ( $\Delta minC$ )	BW25113, $\Delta minC$	BABA <i>et al.</i> , 2006
JW1297 ( $\Delta pspA$ )	BW25113, $\Delta pspA::Kan$	BABA <i>et al.</i> , 2006
MC1000	$araD139$ $\Delta(ara, leu)7697$ $\Delta lacX74$ $galU$ $galK$ $atrA$ , Wildtypstamm	CASADABAN <i>et al.</i> , 1980
MC1000 $\Delta mreB$	MC1000, $\Delta mreB$	KRUSE <i>et al.</i> , 2003
MC4100	$F^+$ $araD139$ $lacU169$ $relA1$ $rpsL150$ $thi$ $mot$ $flb5301$ $deoC7ptsF25$ $rbsR$ , Wildtypstamm	CASADABAN, 1976
MC4100 $ara^R$	MC4100, $ara^R$	BERTHELMANN, 2004
PB114 ( $\lambda$ DB173)	$dadR1$ $trpE61$ $trpA62$ $tna-5$ $purB^+$ $\lambda^-$ , $\Delta minCDE::aph$	DE BOER <i>et al.</i> , 1989
XL1 Blue MRF' $Kan^R$	$\Delta(mcrA)183$ $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ $endA1$ $supE44$ $thi-1$ $recA1$ $gyrA96$ $relA1$ $lac$ [ $F'$ $proAB$ $lacI^q$ $\Delta M15$ Tn5 ( $Kan^R$ )]	Stratagene (La Jolla, Kalifornien, USA)

In der nachfolgenden Tab. 5 sind alle verwendeten Plasmide erwähnt.

Tab. 5: Verwendete Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pABS $Cam^R$	Derivat des pACYC184 (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)	BERTHELMANN und BRÜSER, 2004
pABS- $tatA$ -D31G-BC $Cam^R$	pABS- $tatABC$ mit einem Austausch D31G in $tatA$	BERTHELMANN <i>et al.</i> , 2008
pABS- $Cam^R$	pABS- $tatABC$ mit einem Austausch	BERTHELMANN <i>et</i>



Plasmid		Eigenschaften	Referenz
<i>tatA</i> -F39A-BC		F39A in <i>tatA</i>	<i>al.</i> , 2008
pABS- <i>tatA</i> -F39K-BC	Cam <sup>R</sup>	pABS- <i>tatABC</i> mit einem Austausch F39K in <i>tatA</i>	BERTHELMANN <i>et al.</i> , 2008
pABS- <i>tatA</i> -G33S-BC	Cam <sup>R</sup>	pABS- <i>tatABC</i> mit einem Austausch G33S in <i>tatA</i>	BERTHELMANN <i>et al.</i> , 2008
pABS- <i>tatA</i>	Cam <sup>R</sup>	pABS- <i>tatABC</i> -Derivat mit <i>tatA</i> -Fragment	BEHRENDT <i>et al.</i> , 2007
pABS- <i>tatA</i> (+Gly28)BC	Cam <sup>R</sup>	pABS- <i>tatABC</i> mit einem zusätzlichen Glycin an Position 28	MEHNER, 2006
pABS- <i>tatAB</i>	Cam <sup>R</sup>	pABS- <i>tatABC</i> -Derivat mit <i>tatAB</i> -Fragment	BEHRENDT <i>et al.</i> , 2007
pABS- <i>tatABC</i>	Cam <sup>R</sup>	pACYC184 mit <i>tatABC</i> -Fragment; p15A Replikon	BERTHELMANN und BRÜSER, 2004
pABS- <i>tatABC-gfp</i>	Cam <sup>R</sup>	pABS- <i>tatABC</i> ; <i>gfp</i> vor dem Stoppcodon von <i>tatC</i>	BERTHELMANN und BRÜSER, 2004
pABS- <i>tatABC-minCDE</i>	Cam <sup>R</sup>	pABS- <i>tatABC</i> mit zusätzlichem <i>minCDE</i> -Fragment (SphI / SpeI-kloniert)	diese Arbeit (Ute Lindenstrauß)
pABS- <i>tatABC-mreBCD</i>	Cam <sup>R</sup>	pABS- <i>tatABC</i> mit zusätzlichem <i>mreBCD</i> -Fragment (SphI / SpeI-kloniert)	diese Arbeit (Ute Lindenstrauß)
pABS- <i>tatAB-gfp-C</i>	Cam <sup>R</sup>	pABS- <i>tatABC</i> ; <i>gfp</i> vor dem Stoppcodon von <i>tatB</i>	BERTHELMANN und BRÜSER, 2004
pABS- <i>tatAC</i>	Cam <sup>R</sup>	pABS- <i>tatABC</i> -Derivat mit <i>tatAC</i> -Fragment	BEHRENDT <i>et al.</i> , 2007
pABS- <i>tatA-gfp-BC</i>	Cam <sup>R</sup>	pABS- <i>tatABC</i> ; <i>gfp</i> vor dem Stoppcodon von <i>tatA</i>	BERTHELMANN und BRÜSER, 2004
pABS- <i>tatA</i> -TAA-BC	Cam <sup>R</sup>	pABS- <i>tatABC</i> mit einem zusätzlichen Stoppcodon in <i>tatA</i> (K <sub>52</sub> >TAA)	diese Arbeit
pBAD22	Amp <sup>R</sup>	Arabinose-induzierbarer Expressionsvektor; <i>araC</i> ; <i>araBAD</i> -Promotor; <i>rrnB</i> -Terminator; pBR Origin	GUZMAN <i>et al.</i> , 1995
pBAD- <i>pspA-gfp</i> -H6	Amp <sup>R</sup>	pBAD22; <i>pspA-gfp</i> -H6 unter Kontrolle des P <sub>BAD</sub>	STANDAR, 2005
pBAD- <i>tatA-gfp</i>	Amp <sup>R</sup>	pBAD22; <i>tatA-gfp</i> unter Kontrolle des P <sub>BAD</sub>	BERTHELMANN und BRÜSER, 2004
pBAD- <i>tatA-yfp</i>	Amp <sup>R</sup>	pBAD- <i>tatA-gfp</i> ; Austausch des <i>gfp</i> durch <i>yfp</i> aus dem pPhi-Yellow-B	diese Arbeit
pBAD- <i>tatB-gfp</i>	Amp <sup>R</sup>	pBAD22; <i>tatB-gfp</i> unter Kontrolle des P <sub>BAD</sub>	BERTHELMANN und BRÜSER, 2004
pBAD- <i>tatC-gfp</i>	Amp <sup>R</sup>	pBAD22; <i>tatC-gfp</i> unter Kontrolle des P <sub>BAD</sub>	BERTHELMANN und BRÜSER, 2004

Plasmid		Eigenschaften	Referenz
pBW22	Amp <sup>R</sup>	Expressionsvektor für L-Rhamnose-regulierbare Expression (P <sub>RhaBAD</sub> )	WILMS <i>et al.</i> , 2001
pBW- <i>hip</i> <sup>SP</sup> - <i>nspR5-gfp</i>	Amp <sup>R</sup>	pBW22; <i>hip</i> <sup>SP</sup> - <i>nspR5-gfp</i> -Fragment unter Kontrolle des P <sub>RhaBAD</sub> ; das Genprodukt ist HipSP-FG5-GFP-RR	RICHTER <i>et al.</i> , 2007
pBW- <i>hip</i> <sup>SP</sup> - <i>nspR5-gfp</i> -KK	Amp <sup>R</sup>	pBW- <i>hip</i> <sup>SP</sup> - <i>nspR5-gfp</i> -RR mit RR>KK Austausch im <i>hip</i> -Signalpeptid; das Genprodukt ist HipSP-FG5-GFP-KK	RICHTER <i>et al.</i> , 2007
pBW- <i>tatA</i> -H6	Amp <sup>R</sup>	pBW22 mit <i>tatA-H6</i> -Fragment unter Kontrolle des P <sub>RhaBAD</sub>	MEHNER, 2006
pPhi-Yellow-B	Amp <sup>R</sup>	Quelle des <i>yfp</i>	Evrogen (Moskau, Russland)
pRK- <i>tatABC</i>	Tet <sup>R</sup>	pRK415 mit <i>tatABC</i> -Fragment	BRÜSER <i>et al.</i> , 2003
pTB-DG	Amp <sup>R</sup>	Expression von <i>dmsA</i> (Signalsequenz)- <i>Strep</i> -Tag II- <i>gfp</i> unter Kontrolle des <i>Ptac</i>	BERTHELMANN und BRÜSER, 2004
pTB-DG-KK	Amp <sup>R</sup>	pTB-DG-KK; RR>KK Austausch im <i>dmsA</i> -Signalpeptid	BERTHELMANN <i>et al.</i> , 2008

Tab. 6 listet alle verwendeten Primer für die verschiedenen PCR-Methoden auf (s. Abschnitt 2.3.6). Restriktionsschnittstellen (RSS) sind unterstrichen.

Tab. 6: Verwendete Primer

Primernamen	Primersequenz (5' → 3')	Verwendungszweck
<i>gfp</i> -XhoI-F	GCTAGCTGGAGCCAC <u>CTCGAG</u> TTCGAAAAAATCG	Amplifikation von <i>gfp</i> mit XhoI-RSS vom pTB-DG
<i>gfp</i> -XhoI-R	GTCTGGCGCATTATTT <u>CTCGAGT</u> TCATCCATGCCATG	s. „GFP-XhoI-F“
<i>minCDE</i> -SpeI-F	ATATA <u>ACTAGT</u> CGACGGCAATGG GTTGATTGAC	genomische Amplifikation von <i>minCDE</i> bei gleichzeitiger Einführung einer SpeI-RSS und einer SphI-RSS zur Klonierung in den pABS- <i>tatABC</i>
<i>minCDE</i> -SphI-R	TATATGCATGCTTATTT <u>CAGCTCT</u> TCTGCTTCCGG	s. „ <i>minCDE</i> -SpeI-F“
<i>mreBCD</i> -SpeI-F	ATATA <u>ACTAG</u> - <u>TGAGTGTGCTTGTCTGCTCGCC</u>	genomische Amplifikation von <i>mreBCD</i> bei gleichzeitiger Einführung einer SpeI-RSS und einer SphI-RSS zur Klonierung in den pABS- <i>tatABC</i>
<i>mreBCD</i> -SphI-R	TATATGCATGCTTATTT <u>GCACTGC</u>	s. „ <i>mreBCD</i> -SpeI-F“

Primername	Primersequenz (5'→3')	Verwendungszweck
	AAACTGCTGACGG	
NcoI- <i>tatA-gfp</i> -F	GGAACATCCATGGGTGGTAT-CAGTATTTGG	Amplifikation von <i>gfp</i> mit NcoI-RSS vom pABS- <i>tatA-gfp-BC</i> zur Klonierung in den pBAD22
NcoI- <i>tatB-gfp</i> -F	TGTAATCCATGGTTGATATCGGT TTTAGCGAAC	Amplifikation von <i>gfp</i> mit NcoI-RSS vom pABS- <i>tatAB-gfp-C</i> zur Klonierung in den pBAD22
NcoI- <i>tatC-gfp</i> -F	CCGTAACCATGGCTGTAGAAGA-TACTCAACCG	Amplifikation von <i>gfp</i> mit NcoI-RSS vom pABS- <i>tatABC-gfp</i> zur Klonierung in den pBAD22
phiYFP-NheI-F	TTAGCTAGCAGAGGATCGGGAT-CCAGCG	Amplifikation von <i>yfp</i> vom Vektor pPhi-Yellow-B und Einfügen einer NheI-RSS hinter das Startcodon
phiYFP-XhoI-R	AAGCTCGAGTAATTAAGCTTCA-CAGGTAGG	Amplifikation von <i>yfp</i> vom Vektor pPhi-Yellow-B bei Einfügung einer XhoI-RSS
pTB-DG- <i>gfp</i> -KK-F	GGCTGCTGAGGTGAGTAAGAAG GGTTTGGTAAAAACGACAGC	RR>KK-Austausch im <i>dmsA</i> -Signalpeptid des <i>gfp</i> auf dem pTB-DG
pTB-DG- <i>gfp</i> -KK-R	GCTGTCGTTTTTACCAAACCTTC TTACTCACCTCAGCAGCC	s. „pTB-DG- <i>gfp</i> -KK-F“
<i>tatA</i> -D31G-F	GCTCCATCGG-TTCCGGCCTTGGTGCGTCGATC	D31G-Austausch in <i>tatA</i>
<i>tatA</i> -D31G-R	GATCGACGCACCAAGG-CCGGAACCGATGGAGC	s. „ <i>tatA</i> - D31G-F“
<i>tatA</i> -F39K-F	GGTGCCTCGATCAAAGGCAAAA AAAAAGCAATGAGCGATGATG	F39K-Austausch in <i>tatA</i>
<i>tatA</i> -F39K-R	CATCATCGCTCATTGCTTTTTTTT TGCCTTTGATCGACGCACC	s. „ <i>tatA</i> - F39K-F“
<i>tatA</i> -G33S-F	CCATCGGTTCCGATCTTAGTGCG TCGATCAAAGG	G33S-Austausch in <i>tatA</i>
<i>tatA</i> -G33S-R	CCTTTGATCGACGCACTAAGATC GGAACCGATGG	s. „ <i>tatA</i> - G33S-F“
<i>tatA</i> -F39A-F	GTGCGTCGACAAAGGCGCTAAA AAAGCAATGAGCGATG	F39A-Austausch in <i>tatA</i>
<i>tatA</i> -F39A-R	CATCGCTCATTGCTTTTTTAGCGC CTTTGATCGACGCAC	s. „ <i>tatA</i> -F39A-F“
<i>tatA</i> -kurz-F	GATGAACCAAAGCAGGATTA AAA CCAGTCAGGATGC	Einführung eines zusätzlichen Stoppcodons in <i>tatA</i> im pABS- <i>tatABC</i> (K <sub>52</sub> >TAA)
<i>tatA</i> -kurz-R	GCATCCTGACTGGTTTAATCCTG CTTTGGTTCATC	s. „ <i>tatA</i> -kurz-F“

Primername	Primersequenz (5'→3')	Verwendungszweck
<i>tatA</i> -XhoI-F	GCGCCACGATAAAGAGCTCGAG TAATCCGTGTTTG	Einführung einer XhoI-RSS in <i>tatA</i>
<i>tatA</i> -XhoI-R	CAAACACGGATTACTCGAGCTCT TTATCGTGGCGC	s. „ <i>tatA</i> -XhoI-F“
<i>tatB</i> -XhoI-F	CACCTTCCCCTTCGTCGCTCGAG AAACCGTAAACATG	Einführung einer XhoI-RSS in <i>tatB</i>
<i>tatB</i> -XhoI-R	CATGTTTACGGTTTCTCGAGCGA CGAAGGGGAAGGTG	s. „ <i>tatB</i> -XhoI-F“
XbaI- <i>tatA</i> - <i>gfp</i> -R	AGCAGTTCTAGAAAACCGATAT- CAAACACGG	s. „NcoI- <i>tatA</i> - <i>gfp</i> -F“
XbaI- <i>tatB</i> - <i>gfp</i> -R	GTATCTTCTAGAGACATGTT- TACGGTTTCTCG	s. „NcoI- <i>tatB</i> - <i>gfp</i> -F“
XbaI- <i>tatC</i> - <i>gfp</i> -R	GCAGACTCTAGAAATGTCGCA- CAATGTGCGC	s. „NcoI- <i>tatC</i> - <i>gfp</i> -F“

## 2.2 ZELLKULTIVIERUNG

### 2.2.1 NÄHRMEDIEN

Die aerobe Kultivierung von *E. coli* erfolgte im komplexen Nährmedium *lysogeny broth* (LB-Medium), welches oft fälschlicherweise auch als Luria-Bertani-Medium bezeichnet wird (BERTANI, 1951). Das Protokoll ist in Tab. 7 wiedergegeben. Zur Herstellung von Platten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 1,5% (w/v) Agar zugesetzt.

Tab. 7: Protokoll für LB-Medium

Inhaltsstoff	Menge
Trypton	1% (w/v)
Hefeextrakt	0,5% (w/v)
NaCl	1% (w/v)
H <sub>2</sub> O bidest.	-

Die Nährmedien wurden durch Autoklavieren (121°C, 20 min) sterilisiert. Hitzelabile Lösungen – wie z. B. Antibiotika – wurden sterilfiltriert (PVDF-Membranfilter, Porengröße 0,22 µm, Roth, Karlsruhe, Deutschland) und erst nach dem Abkühlen zugegeben.

### 2.2.2 ZUSÄTZE

Die verwendeten Antibiotika wurden den Medien in Form von sterilfiltrierten Stammlösungen (Tab. 8) zugegeben. Diese Stammlösungen wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Tab. 8: Verwendete Antibiotika und ihre Konzentrationen

Antibiotikum	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin (Amp)	100 mg/ml in $\text{H}_2\text{O}$ <small>bidest.</small> (1:1000)	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Chloramphenicol (Cam)	20 mg/ml in MeOH (1:1000)	20 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Kanamycin (Kan)	25 mg/ml in $\text{H}_2\text{O}$ <small>bidest.</small> (1:1000)	25 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Tetrazyklin (Tet)	12,5 mg/ml in 70% (v/v) EtOH (1:1000)	12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Zur Induktion des L-Arabinose-abhängigen *araBAD*-Promotors des pBAD-Plasmids wurde L-Arabinose in Endkonzentrationen zwischen 0,0001% (w/v) und 0,5% (w/v) eingesetzt. Der  $P_{\text{RhaBAD}}$ -Promotor des pBW22 wurde mit Rhamnose induziert. Zur Repression kam Glukose zum Einsatz. Wie die Antibiotika auch, wurden L-Arabinose, Rhamnose und Glukose als sterilfiltrierte Stammlösungen zugegeben, aber im Gegensatz zu den Antibiotika bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.2.3 KULTIVIERUNG

Bakterien wurden, sofern nicht anders im Text angegeben, aerob bei  $37^{\circ}\text{C}$  und mit 200 rpm schüttelnd in sterilen Zentrifugenröhrchen bzw. in Erlenmeyerkolben mit oder ohne Schikane kultiviert.

Beimpfte Agar-Platten wurden aerob bei  $37^{\circ}\text{C}$  über Nacht inkubiert, wobei Platten mit Tetrazyklin locker, aber möglichst lichtdicht mit Aluminiumfolie umhüllt waren, um ein Zerfallen des Antibiotikums zu vermeiden.

Das An- oder Überimpfen von Kulturen, Vereinzeln sowie das Anlegen von Dauerkulturen wurden ausschließlich unter einer Sterilbox durchgeführt.

Dauerkulturen wurden von allen relevanten Plasmid-Stamm-Kombinationen angelegt. Dabei wurden Kulturen in der spätexponentiellen Wachstumsphase 1:1 mit LB-Medium / 30% (v/v) Glycerin versetzt und dann bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 2.2.4 ZELLERNTE

Die Ernte von Zellen erfolgte je nach Größenmaßstab entweder in einer Tischzentrifuge (13000 rpm für 30 s), in der ‚Hettich Universal 30 RF‘-Zentrifuge (3800 x g / 10 min / 4°C) oder in der ‚Sorvall RC-5C PLUS‘ (6800 x g / 10 min / 4°C). Für genaue Daten zu den Zentrifugen s. a. Abschnitt 2.6.2.

### 2.3 MOLEKULARGENETISCHE METHODEN

Zu den in dieser Arbeit verwendeten molekulargenetischen Methoden gehören vor allem Methoden der DNA-Reinigung, der Klonierung, der gerichteten Mutation und der Identifizierung von korrekten Klonen.

#### 2.3.1 VORBEHANDLUNG VON GERÄTEN UND LÖSUNGEN

Um vorhandene DNasen zu inaktivieren, wurden alle hitzebeständigen Geräte und Lösungen 20 min bei 121°C autoklaviert. Alle hitzelablen Lösungen wurden sterilfiltriert (PVDF-Membranfilter, Porengröße 0,22 µm, Roth, Karlsruhe, Deutschland).

#### 2.3.2 DNA-REINIGUNG

##### 2.3.2.1 REINIGUNG GENOMISCHER DNA

Zum Zweck der Gewinnung genomischer DNA wurde folgendes Protokoll genutzt:

- Es wurden 2-3 ml einer ÜNK geerntet und das Pellet erst in 250 µl Puffer 1 des ‚QIAprep Spin Miniprep Kits‘ (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) resuspendiert und anschließend mit 250 µl des Puffers 2 gemischt.
- Danach wurden 500 µl Phenol/Isoamylalkohol zugegeben und kräftig geschüttelt.
- Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 14000 rpm in einer Tischzentrifuge.
- Der Überstand wurde abgenommen und mit 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol versetzt, nochmals geschüttelt und wieder für 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert.
- Der Überstand dieser Zentrifugation wurde dann mit 1/10 Vol 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 2 Vol EtOH versetzt.
- Die Lösung wurde dann mindestens 30 min bei -80°C inkubiert.
- Es schloss sich eine weitere Zentrifugation von 10-20 min mit 14000 rpm an.

- Der Überstand wurde abgegossen, das Pellet mit der gefällten DNA noch einmal mit 500 µl 70% (v/v) EtOH gewaschen und erneut für 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert.
- Das EtOH wurde abschließend abgegossen und das erhaltene Pellet entweder an der Luft oder in einer ‚Speed Vac SVC 100E‘ (Savant Instruments, Farmingdale, New York, USA) getrocknet und in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> aufgenommen.

Wie jede andere DNA auch wurde genomische DNA bei -20°C gelagert.

#### 2.3.2.2 MINIPRÄPARATION VON PLASMID-DNA

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA wurden entweder ein ‚QIAprep Spin Miniprep Kit‘ (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) oder ein ‚peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I‘ (peq-lab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) verwendet. Bis zu 4 ml einer ÜNK wurden bei 13000 rpm pelletiert (Hermle-Tischzentrifuge, s. Tab. 16). Die anschließende Plasmidpräparation erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde am Ende mit 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> von der Silicagel-Membran der Säule eluiert und entweder direkt weiterverwendet oder bei -20°C aufbewahrt.

#### 2.3.2.3 MIKRODIALYSE

PCR-Produkte wurden gelegentlich einer Mikrodialyse unterzogen, um die Effizienz anschließender Transformationen zu erhöhen. Dazu wurde die zu reinigende DNA-Lösung für eine Stunde auf einen auf H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> schwimmenden Membranfilter der Porengröße 0,025 µm (Millipore GmbH, Eschborn, Deutschland) aufpipettiert, nach einer Stunde wieder abgenommen und weiterverwendet.

#### 2.3.2.4 DNA-FRAGMENTREINIGUNG

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten wie z. B. PCR-Produkten wurden ebenfalls das ‚QIAprep Spin Miniprep Kit‘ (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) bzw. das ‚peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I‘ (peq-lab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) genutzt. Es wurde nach dem mitgelieferten Protokoll vorgegangen und die DNA mit dem gewünschten Volumen an sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> eluiert.

#### 2.3.2.5 GELEXTRAKTION

Oft war es darüber hinaus nötig, DNA – z. B. zur Ligation bestimmter Fragmente – über ein Agarose-Gel zu reinigen. Dazu wurde ein besonders dickes Agarose-Gel eingesetzt, um 100-125 µl des Restriktionsansatzes (inklusive Ladepuffer) auf das Gel auftragen zu

können. Auch das Verbinden von mehreren Laufbahnen (durch Zusammenkleben von zwei oder drei Zähnen des Kammes) führte zu einer Erhöhung des auftragbaren Volumens und hatte gleichzeitig – im Gegensatz zu einem noch dickeren Gel – den Vorteil des besseren Laufverhaltens. Nach der Gelelektrophorese wurden die entsprechenden Banden auf einem ‚UV-Transilluminator TFX-20.M‘ (AGS, Heidelberg, Deutschland) aus dem Gel geschnitten. Dabei wurde eine transparente Gelschaufel untergelegt und zügig gearbeitet, um die UV-Belastung der DNA möglichst gering zu halten. Das Gelstück wurde anschließend gewogen und die DNA dann nach Protokoll mit dem ‚QIAquick Gel Extraction Kit‘ der Firma Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland) durch Resuspension, Wäsche und abschließende Elution gewonnen. Es schloss sich, auch wegen der oft geringen Ausbeute, vor einer Weiterverarbeitung immer eine Kontrolle im Agarose-Gel an.

### 2.3.3 GELELEKTROPHORESE

Die Auftrennung der DNA erfolgte in horizontalen Flachbett-Elektrophoresekammern (‚Easy Cast™ Electrophoresis System‘, Owl Scientific, jetzt Thermo Fisher Scientific, Rochester, New York, USA).

Für die Trennung von DNA wurde meist eine Agarosekonzentration von 1% (w/v) eingesetzt. Nur für besonders kleine Fragmente betrug die Agarosekonzentration 1,5% (w/v). Zur Auftrennung von Primern wurden sogar 2%ige Gele verwendet.

Die Agarose wurde in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat pH 8,0 / 1 mM EDTA) aufgekocht, bis sie schlierenfrei gelöst war, und anschließend in eine Gelkammer mit eingesetztem Kamm gegossen. Als Elektrophorese-Puffer diente ebenfalls TAE-Puffer.

Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 0,2 Vol eines 5-fach Ladepuffers (50% (v/v) Glycerin / 0,2 M EDTA / 0,2% (w/v) Bromphenolblau) oder 0,17 Vol des ‚6x Sample Buffer’s‘ (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) versetzt. Die Probenmenge pro Bahn betrug im Allgemeinen 4-5 µl Probe plus 1 µl Ladepuffer (je nach Konzentration des Ladepuffers), bei analytischen Gelen und bei präparativen Gelen meist erheblich mehr (s. Abschnitt 2.3.2.5).

Die Elektrophorese erfolgte bei 100-120 V ohne Stromlimitierung (‚PHERO-stab. 300‘, Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen, Deutschland).

Nach dem Lauf des Gels wurde es für etwa 20-30 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml Ethidiumbromid in TAE-Puffer) geschwenkt und anschließend mit H<sub>2</sub>O abgespült. Das Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und ermöglicht infolge seiner fluoreszierenden Eigenschaften eine Detektion der DNA.



Die Dokumentation der Gele erfolgte auf einem ‚UV-Transilluminator TFX-20.M‘ (AGS, Heidelberg, Deutschland). Zur Bestimmung der Größe der DNA-Fragmente dienten hauptsächlich die Marker ‚1 kb-DNA-Ladder‘ und ‚DNA-Ladder-Mix‘ (beide MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland).

#### 2.3.4 RESTRIKTIONSVERDAUE

Es wurden je nach Zielstellung zwei verschiedene Protokolle für Restriktionsverdaue eingesetzt: ein schneller, analytischer Verdau in einem kleinen Volumen und ein präparativer Verdau in einem größeren Volumen. Beide Protokolle sind in den folgenden Abschnitten wiedergegeben.

##### 2.3.4.1 ANALYTISCHER VERDAU

Die Restriktion von DNA erfolgte meist in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu\text{l}$ . Als Inkubationspuffer dienten die vom Hersteller (s. Tab. 19) mitgelieferten Puffer, die 10-fach konzentriert sind. Pro  $\mu\text{g}$  DNA wurden 10 U Restriktionsendonuklease zugegeben und der Ansatz in der Regel 1–3 h bei der für das Enzym spezifischen Temperatur (meist 37°C) inkubiert.

##### 2.3.4.2 PRÄPARATIVER VERDAU

Präparative Verdaue unterschieden sich von analytischen Verdauen nur durch das größere Gesamtvolumen und die meist längere Zeit, die für den Verdau aufgewandt wurde. Es wurden Ansätze von bis zu 125  $\mu\text{l}$  hergestellt (wobei bis zu maximal ein Drittel des Gesamtvolumens DNA war) und maximal 5 h lang verdaut. Die Dauer war jedoch recht variabel und wurde nur bei besonders schlecht schneidenden Enzymen nach oben korrigiert. Nach dem Verdau wurden 5  $\mu\text{l}$  abgenommen und es wurde mittels Gelelektrophorese überprüft, ob der Verdau bereits vollständig abgelaufen war. Das Wissen um die zu erwartenden Fragmentgrößen trug dazu bei, die eigentliche Gelextraktion (s. Abschnitt 2.3.5) möglichst kurz und damit eventuelle UV-Schäden an der DNA möglichst klein zu halten.

### 2.3.5 LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN

Ligationsansätze hatten meist ein Gesamtvolumen von 20  $\mu\text{l}$ . Vektor- und Fragment-DNA wurde in unterschiedlichen Verhältnissen (1:3 bis 1:10 oder mehr – je nach vorher im Agarose-Gel bestimmten Fragment- und Vektorkonzentrationen), jedoch immer im Fragmentüberschuss eingesetzt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C mit 1 U T4-DNA Ligase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) im mitgelieferten Ligationspuffer des Herstellers. Meist wurden 5  $\mu\text{l}$  des Ansatzes in Zellen des Stammes XL1 Blue transformiert und später auf Korrektheit hin überprüft.

### 2.3.6 POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) hatte verschiedene Einsatzmöglichkeiten. Einerseits wurde sie zur normalen Amplifikation von Fragmenten, z. B. vor einem Restriktionsverdau, genutzt. Andererseits wurden teilweise für die PCR Primer mit Restriktionschnittstellen an den äußeren Enden eingesetzt, sodass diese Schnittstellen während der Reaktion eingeführt wurden (Abschnitt 2.3.6.2). Auch wurden Punktmutationen mit einer abgewandelten PCR nach dem Quikchange™-Protokoll durchgeführt (Abschnitt 2.3.6.3). Die Ansätze wurden in der Regel in Zellen des Stammes XL1 Blue transformiert und die eingeführten Änderungen gegebenenfalls anschließend mittels DNA-Sequenzierungen (Abschnitt 2.3.6.4) überprüft.

#### 2.3.6.1 NORMALE FRAGMENTAMPLIFIKATION

Im Allgemeinen sah ein PCR-Protokoll so aus, wie in Tab. 9 wiedergegeben. Die Reaktionen wurden in einem ‚Trio-Thermoblock™‘ (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

Tab. 9: PCR-Ansatz für Fragmentamplifikation

Inhaltsstoff	Menge
10x Polymerase-Puffer	5 $\mu\text{l}$
dsDNA als <i>template</i>	1 $\mu\text{l}$
<i>forward</i> und <i>reverse</i> Primer (25 pmol/ $\mu\text{l}$ )	je 2 $\mu\text{l}$
5 mM dNTPs	1 $\mu\text{l}$
DNA-Polymerase (meist <i>Pfu</i> oder <i>Taq</i> )	2,5 U / 1 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O <i>bideest.</i>	ad 50 $\mu\text{l}$

Ein typisches PCR-Programm ist in Tab. 10 gezeigt. Die Angaben sind aber nur beispielhaft und wurden jeweils den erwarteten Fragmentlängen und den Schmelztemperaturen der Primer angepasst.

Tab. 10: PCR-Programm für Fragmentamplifikation

Schritt	Beschreibung	Dauer	Temperatur
1	Denaturierung	1 min	96°C
2	Denaturierung	30 s	96°C
3	Annealing	1 min	55°C
4	Polymerisation	2 min	72°C
(5)	optionale Polymerisation	2 min	72°C
6	Pause	$\infty$	4°C

Die Schritte 2 bis 4 wurden zyklisch insgesamt 32x wiederholt, bevor der optionale Schritt 5 die PCR mit einem abschließenden Polymerisationsschritt beendete.

#### 2.3.6.2 FRAGMENTAMPLIFIKATION ZUR SCHNITTSTELLENEINFÜHRUNG

Für die Einführung von Fragmenten in ein Plasmid war es oft wünschenswert, an beiden Enden des Fragmentes eine Schnittstelle zu haben, wobei zwei verschiedene Restriktionsschnittstellen sogar eine gerichtete Klonierung erlaubten. Dazu wurden Primer entworfen, die etwa 20 Basen lang waren und den „normalen“ Amplifikationsprimern entsprachen, aber zusätzlich die Sequenz für eine Restriktionsschnittstelle sowie einen Überhang von etwa 5 Basen enthielten. Der Überhang gewährleistete ein optimales Schneiden des Enzyms. Die PCR ist schematisch in Abb. 6 wiedergegeben.

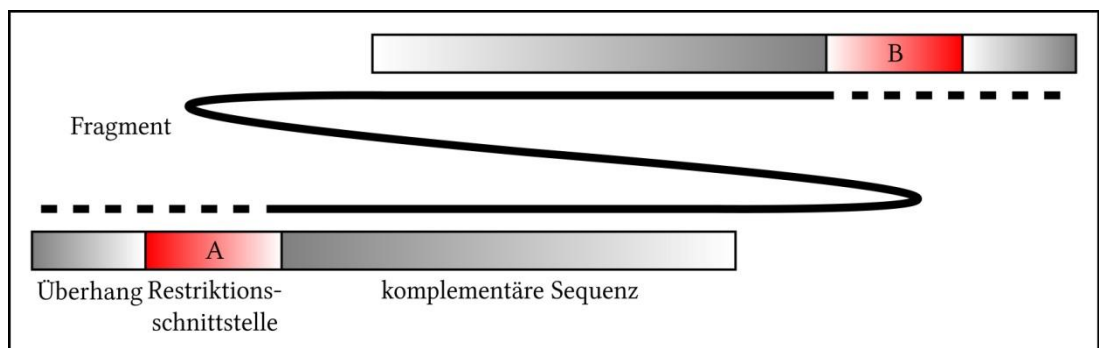


Abb. 6: Schema zum Einführen einer Restriktionsschnittstelle im Zuge einer PCR. Gezeigt sind zwei Primer, die jeweils eine Schnittstelle enthalten (A und B) sowie einen Überhang. An das *template* bindet im ersten Schritt nur die komplementäre Sequenz. In späteren PCR-Zyklen vergrößert sich das Fragment um die Schnittstelle und um den Überhang.

### 2.3.6.3 GEZIELTE MUTAGENESEN NACH DEM QUIKCHANGE™-PROTOKOLL

Eine elegante Klonierungsstrategie zum Einführen oder Ändern einzelner Aminosäuren bzw. von Restriktionsschnittstellen ist die ‚QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis‘ (Stratagene, La Jolla, Kalifornien, USA). Sie erlaubt, einzelne Basen auszutauschen – in der Praxis maximal drei bis vier pro Primerpaar.

Die zu mutierende Sequenz muss in einem doppelsträngigen, *supercoiled* Vektor vorliegen, der aus einem *dam*<sup>+</sup>-*E. coli*-Stamm isoliert wurde. Zur Einführung einer Mutation dienen zwei zueinander komplementäre Mutagenese-Primer, die im Vergleich zu normalen PCR-Primern relativ lang sind und – neben der zum Vektor komplementären Sequenz – in der Mitte die gewünschten Austausche enthalten. Die Mutagenese erfolgte während dieser Arbeit in einer PCR-Reaktion mit Hilfe der *Pfu*-DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*. Die *Pfu*-DNA-Polymerase besitzt dank ihrer 3′-5′-Exonukleaseaktivität (*proof reading*) eine Fehlerrate, die um den Faktor 10 geringer ist als die der *Taq*-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*. Die synthetisierten DNA-Stränge sind nicht methyliert und enthalten die gewünschten Austausche.

Das Protokoll ähnelt dem in Tab. 10, wurde jedoch den hohen Primer- und Fragmentlängen angepasst und ist deshalb noch einmal gesondert in Tab. 11 wiedergegeben. Die Schritte 2 bis 4 wurden zyklisch insgesamt 17x wiederholt.

Tab. 11: PCR-Programm für eine ‚QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis‘

Schritt	Beschreibung	Dauer	Temperatur
1	Denaturierung	30 s	96°C
2	Denaturierung	30 s	96°C
3	Annealing	1 min	50-65°C
4	Polymerisation	15 min	68°C
5	Pause	∞	4°C

Vor einer Transformation in möglichst hoch- oder superkompetente Zellen wurde der Ansatz bei 37°C für 1-2 h mit 20 U des Restriktionsenzym DpnI inkubiert. Dabei verdaute DpnI spezifisch die parentale methylierte und hemimethylierte DNA, sodass nur die DNA mit dem Austausch übrig blieb. Dieser Ansatz konnte ohne Ligation zur Transformation eingesetzt werden, da der lineare Vektor in *E. coli* rezirkularisiert wird. Die Effizienz dieser Methode lag in der Praxis oft weit unter 100%. Dies machte es nötig, die potentiell richtigen Klone durch Verdaue bzw. durch Sequenzierungen genau zu charakterisieren.

## 2.3.6.4 SEQUENZIERUNG

Es wurden zwei verschiedene Arten der Sequenzierung eingesetzt. Beide beruhen auf dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger (SANGER *et al.*, 1977). Die Sequenzierungsreaktion wurde entweder selbst durchgeführt oder der Firma Seqlab - Sequence Laboratories (Göttingen, Deutschland) überlassen.

Die laborinterne Sequenzierung erfolgte durch Mischung von 6 µl DNA mit 2 µl eines zur Verfügung stehenden ‚ABI-Sequencing-Mix‘ (Amersham Biosciences, jetzt GE Healthcare, München, Deutschland) und 2 µl eines Sequenzierprimers, der in einer Konzentration von 20 pmol/µl vorlag. Es schloss sich die eigentliche Sequenzierungsreaktion in 32 Zyklen in einem ‚Trio-Thermoblock™‘ der Firma Biometra GmbH (Göttingen, Deutschland) an (s. Tab. 12).

Tab. 12: Protokoll der Sequenzierungs-PCR

Schritt	Schritt	Dauer	Temperatur
1	Denaturierung	30 s	95°C
2	Annealing	15 s	52°C
3	Polymerisation	2 min	60°C
4	Pause	∞	4°C

Nach Beendigung der PCR wurde die DNA wie folgt gereinigt:

- Die 10 µl des PCR-Ansatzes wurden mit 2 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 60 µl 99% (v/v) EtOH vermischt.
- Die dadurch gefällte DNA wurde in einem 20-minütigen Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm und RT sedimentiert.
- Der Überstand wurde abgegossen und das DNA-Pellet mit 500 µl 70% (v/v) EtOH gewaschen.
- Es schloss sich ein erneuter Zentrifugationsschritt an (diesmal nur für 10 min / wieder 13000 rpm / wieder RT).
- Zum Schluss wurde erneut der Überstand abgegossen und das Pellet gut getrocknet (entweder an der Luft oder mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge).

Direkt vor dem Auftragen auf das Sequenziergel wurden die Proben in 4 µl Gelpuffer (5 Vol Formamid / 1 Vol 25 mM EDTA pH 8,0) aufgenommen und 2 min bei 90°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte mit Hilfe des automatisierten Laser-Fluoreszenz-Sequenzierers ‚ABI 377‘ (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland). Zur weiteren Verarbeitung der Daten s. Abschnitt 2.7.3.

Das Wegschicken der Proben zur Sequenzierung an die Firma Seqlab - Sequence Laboratories war im Gegensatz dazu sehr einfach. Es wurde nur ein Mix aus 6 µl DNA und

1  $\mu$ l Primer (20 pmol/ $\mu$ l) benötigt. Für die Auswertung der Sequenzdaten, die jeweils nach einigen Tagen eintrafen, s. Abschnitt 2.7.3.

### 2.3.7 HERSTELLUNG KOMPETENTER ZELLEN

Die Herstellung kompetenter Zellen nach der  $\text{CaCl}_2$ -Methode wurde meist in einem 50 ml-Maßstab durchgeführt. Das erlaubte die technisch einfache und gleichzeitige Durchführung für vier verschiedene Stämme. Das Protokoll war folgendes:

- 50 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotikazusätzen wurden mit 0,5 ml einer ÜNK beimpft.
- Die Kultur wurde bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,5 wachsen gelassen und dann auf Eis abgekühlt.
- Anschließend wurde die Kultur in einem 50 ml Greiner-Röhrchen geerntet (3 600 x g / 10 min / 4°C).
- Das Pellet wurde in 15 ml sterilem Puffer (70 mM  $\text{CaCl}_2$  / 20 mM  $\text{MgSO}_4$ ) resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert.
- Dann wurde eine erneute Zentrifugation durchgeführt (3 600 x g / 10 min / 4°C).
- Anschließend wurde das Pellet wieder in 5 ml sterilem Puffer (s. o.) resuspendiert und erneut 30 min auf Eis inkubiert.
- Zum Schluss wurden 350  $\mu$ l Dimethylsulfoxid (DMSO) (Endkonzentration etwa 5% (v/v)) zugegeben und schonend gemischt (alternativ wurden auch 2 ml 86% (v/v) Glycerin (Endkonzentration etwa 25% (v/v)) verwendet, wobei aber mit DMSO leicht bessere Ergebnisse erzielt wurden).
- Dann wurden die kompetenten Zellen zu je 50-200  $\mu$ l aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die Lagerung der Zellen erfolgte bis zur Verwendung (s. Abschnitt 2.3.9) bei -80°C.

### 2.3.8 HERSTELLUNG HOCHKOMPETENTER ZELLEN

Sehr kompetente Zellen erhielt man, wenn in Anlehnung an das Protokoll von SAMBROOK und RUSSELL, 2001 an Stelle des in Abschnitt 2.3.7 angegebenen  $\text{CaCl}_2$ -Puffers ein Puffer aus 10 mM PIPES pH 6,7 / 55 mM  $\text{MnCl}_2$  / 15 mM  $\text{CaCl}_2$  / 250 mM KCl benutzt wurde. Das Protokoll an sich wurde dabei nicht verändert und auch die Verwendung der Zellen blieb gleich.

### 2.3.9 TRANSFORMATION KOMPETENTER ZELLEN

Zur Transformation kompetenter Zellen wurden die vorher eingefrorenen Aliquots der Zellen auf Eis aufgetaut oder, wenn gerade hergestellt, direkt verwendet. Es wurden je nach erwarteter Ausbeute 50 µl der Zellen mit 0,5 µl Plasmid-DNA, oder auch bis zu 5 µl Plasmid-DNA ad 100 µl Zellen, 30 min lang auf Eis inkubiert. Es folgten ein 60 s langer Hitzeschock bei 42°C und anschließend eine sofortige Abkühlung auf Eis für 2 min. Danach wurden 500 µl auf 42°C vorgewärmtes LB-Medium zugegeben. Die Zellen wurden dann unter leichtem Schütteln 60 min lang in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 50-100 µl der Kulturen auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotikazusätzen ausplattiert. Um die Ausbeute an Klonen zu erhöhen, wurden die Kulturen teilweise komplett durch schonende Zentrifugation geerntet (3000 rpm für 2 min in einer Tischzentrifuge bei RT), in 100 µl LB-Medium resuspendiert und dann komplett ausplattiert.

## 2.4 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

Zu den in den folgenden Abschnitten wiedergegebenen proteinbiochemischen Methoden gehören vor allem Protokolle, die den Aufschluss von Zellen und die anschließende Weiterverarbeitung der in den Proben enthaltenen Proteine beschreiben. Dazu gehören unter anderem die Fraktionierung in die verschiedenen Zellkompartimente, die Reinigung von Proteinen über Affinitätssäulen oder mittels Dichtegradientenzentrifugation und abschließend die Detektion der Proteine über SDS-PAGE, Coomassie-Färbung, Western-Blot und Fluoreszenzdetektion.

### 2.4.1 SDS-PAGE

Für die Auftrennung der Proteine wurden lineare diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gele (LAEMMLI, 1970) genutzt. Es kamen dabei meist Trenngele mit einer Konzentration von 15% T<sup>12</sup> (teilweise auch 12,5% T) zum Einsatz, die zur besseren Auftrennung der Proteinproben mit einem etwa 1 cm langen Sammelgel (4,5% T) überschichtet waren. Die verschiedenen Protokolle sind beispielhaft in Tab. 13 wiedergegeben.

---

<sup>12</sup> Die Prozentangabe % T bezieht sich hierbei auf die Gesamtmonomerkonzentration im Gegensatz zur Konzentration an Quervernetzern (% C), die nicht geändert wurde.

Tab. 13: SDS-PAGE-Protokolle für verschiedene Gelkonzentrationen

Inhaltsstoff	Menge für ein Sammelgel 4,5% T	Menge für ein Trenngel 12,5% T	Menge für ein Trenngel 15% T
Lösung I: 30% (w/v) Acrylamid / 0,8% (w/v) Bis-Acrylamid	0,75 ml	6 ml	5 ml
Lösung II: 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 / 0,3% (w/v) SDS	-	3 ml	3 ml
Lösung III: 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 / 0,4% (w/v) SDS	1,25 ml	-	-
H <sub>2</sub> O bidest.	3 ml	3 ml	4 ml
10% (w/v) APS	50 µl	100 µl	100 µl
TEMED	5 µl	10 µl	10 µl

Nach Zugabe der Polymerisations-Starter APS (Ammoniumperoxodisulfat) und TEMED (Tetramethylethylendiamin) wurde die Lösung kurz geschwenkt und zügig zwischen zwei vorbereitete Glasplatten gegossen. Dabei wurde erst das Trenngel gegossen und mit H<sub>2</sub>O bidest. überschichtet. Sobald das Trenngel polymerisiert war (nach etwa 30 min), wurde das H<sub>2</sub>O bidest. abgegossen und mit einem Filterpapier abgesaugt. Dann wurde ein etwa 1 cm hohes Sammelgel auf das Trenngel gegossen, ein Gel-Kamm (für 10 oder 15 Bahnen) eingesetzt und erneut die Polymerisation abgewartet (wieder etwa 30 min).

Die auf das Gel aufzutragenden Proteinproben wurden mindestens im Verhältnis 1:1 mit SDS-Probenpuffer (8 ml 0,5 M Tris-HCl pH 8,8 / 10 ml Glycerin / 1,54 mg DTT / 2 g SDS / 12 mg Bromphenolblau / ad 50 ml H<sub>2</sub>O bidest.) versetzt und 10 min bei 90°C denaturiert. Nach Abkühlung der Proben auf Eis erfolgte die Auftragung auf das Gel mit Hilfe einer Mikroliterspritze der Firma Hamilton (Bonaduz, Kanton Graubünden, Schweiz).

Die eigentliche Polyacrylamid-Elektrophorese wurde dann in einem ‚Mini-Protean<sup>®</sup> 3 Elektrophoresis-System‘ der Firma Bio-Rad Laboratories (Hercules, Kalifornien, USA) durchgeführt. Der SDS-Laufpuffer enthielt 25 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,2 M Glycin und 0,1% (w/v) SDS. Als Protein-Marker wurde die ‚Prestained Protein Ladder‘ (10 – 180 kDa) von MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) eingesetzt. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 120 V ohne Stromlimitierung mit dem Netzteil ‚PHERO-stab. 300‘ (Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen, Deutschland) durchgeführt.

#### 2.4.2 SEMI-DRY WESTERN-BLOT

Der Transfer der Proteine aus SDS-Polyacrylamidgelen erfolgte in einer ‚Trans-Blot Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell‘ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien,



USA) auf eine Nitrozellulosemembran ‚BioTrace NT‘ mit einer Porengröße von 0,45  $\mu\text{m}$  und einer Proteinbindekazapazität von 209  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Gelman Sciences, jetzt Pall GmbH, Dreireich, Deutschland).

Das gelaufene SDS-Polyacrylamidgel wurde für 10 min in Towbin-Puffer (25 mM Tris / 170 mM Glycin / 20% (v/v) Methanol) äquilibriert (TOWBIN *et al.*, 1979). Sechs Lagen ‚Whatman-3MM-Filterpapier‘ (GE Healthcare, München, Deutschland) und die Nitrozellulosemembran wurden auf Gelgröße zugeschnitten und mit Towbin-Puffer getränkt. Anschließend wurden zuerst drei Filterpapiere, dann die Nitrozellulosemembran, danach das Gel und abschließend wieder drei Filterpapiere übereinander auf die Anode der Blot-Apparatur gestapelt. Der Transfer der Proteine erfolgte bei maximal 15 V und 250 mA und dauerte 60 min.

#### 2.4.3 PROTEINNACHWEIS DURCH IMMUNODETEKTION

Der Proteinnachweis erfolgte nach dem Western Blot (s. Abschnitt 2.4.2) durch Immundetektion. Diese beruht auf der Bindung eines spezifischen, primären Antikörpers (AK) an das Zielprotein und der Bindung eines sekundären AK an den primären AK (für die verwendeten AK s. Tab. 14). Eine an den sekundären AK gekoppelte Peroxidase ermöglichte den Nachweis der gebildeten Immunokomplexe durch eine Farb- (Abschnitt 2.4.3.1) oder Lichtreaktion (Abschnitt 2.4.3.2).

Die Nitrozellulosemembran mit den transferierten Proteinen wurde zur Absättigung unspezifischer Bindestellen über Nacht in PBS-Puffer (137 mM NaCl / 3 mM KCl / 4 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  / 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) mit 5% (w/v) Magermilchpulver bei RT geschwenkt.

Die Membran wurde dann 3x 5 min in PBS-Tween (0,5% (v/v) Tween 20 in PBS) gewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation mit dem primären AK in PBS-BSA (0,5% (w/v) BSA in PBS). Zur besseren Haltbarkeit wurden den AK-Lösungen noch 0,02% (w/v)  $\text{NaN}_3$  zugesetzt. Anschließend wurde die Membran wieder 3x 5 min in PBS-Tween gewaschen, um ungebundene AK zu entfernen. Dann wurde die Membran 1 h mit dem sekundären AK Anti-IgG-HRP-Konjugat ebenfalls in PBS-BSA inkubiert. Den folgenden Waschsritten (2x 5 min in PBS-Tween, 1x 5 min in PBS) schloss sich der Nachweis der gebildeten Immunokomplexe an.

Tab. 14: Verwendete Antikörper und ihre Eigenschaften

AK-Name	AK-Typ	Antigen	Verdünnung	Referenz
Anti-GFP-AK	Kaninchen-IgG (primärer AK)	GFP	1:2000	ABR (Golden, Colorado, USA)
Anti-HiPIP-AK	Kaninchen-IgG	<i>precursor-</i>	1:1000	Laborbestand

AK-Name	AK-Typ	Antigen	Verdünnung	Referenz
	(primärer AK)	HiPIP		
Anti-PspA-AK	Kaninchen-IgG (primärer AK)	PspA	1:2000	diese Arbeit
Anti-TatA-AK	Kaninchen-IgG (primärer AK)	TatA / TatE	1:2000	Tim Yahr (Iowa City, Iowa, USA)
Anti-TatB-AK	Kaninchen-IgG (primärer AK)	TatB	1:2000	Tim Yahr (Iowa City, Iowa, USA)
Anti-TatC-AK	Kaninchen-IgG (primärer AK)	TatC	1:2000	Matthias Müller (Frei- burg, Deutschland)
Goat Anti- Rabbit IgG- HRP-Konjugat	Ziegen-IgG (se- kundärer AK)	Kaninchen- IgG	1:10000	Bio-Rad Laboratories, (Hercules, Kalifornien, USA)
<i>Strep</i> -Tactin HRP-Konjugat	primärer und se- kundärer AK zu- gleich	, <i>Strep</i> - Tag II'	1:5000	IBA BioTAGnology (Göttingen, Deutschland)

#### 2.4.3.1 FÄRBEREAKTION MIT 4-CHLORO-1-NAPHTHOL

Dieser Nachweis besteht in der Zugabe des Chromogens 4-Chloro-1-Naphthol, das in Gegenwart von  $H_2O_2$  durch die an den sekundären AK konjugierte Peroxidase zu einem unlöslichen Farbstoff oxidiert wird. So entstehen sichtbare Banden an den Stellen, an denen der sekundäre AK gebunden hat. Zur Herstellung der Färbelösung wurden 30 mg 4-Chloro-1-Naphthol in 5 ml eiskaltem EtOH gelöst und mit 45 ml PBS-Puffer (137 mM NaCl / 3 mM KCl / 4 mM  $Na_2HPO_4$  / 2 mM  $KH_2PO_4$ ) gemischt. Nach der Zugabe von 20  $\mu$ l 30% (v/v)  $H_2O_2$  wurde die Lösung auf den Blot gegeben. Die Färbereaktion wurde nach 5-20 min – je nach Färbegrad – durch Waschen in  $H_2O$  gestoppt und die Membran anschließend luftgetrocknet.

#### 2.4.3.2 LICHTREAKTION (ECL-SYSTEM)

Alternativ zur eben beschriebenen Färbereaktion mit 4-Chloro-1-naphthol wurde das *enhanced chemiluminescence*-System (ECL) zur Detektion von Proteinen eingesetzt. Es ist sehr viel sensitiver, aber auch technisch etwas aufwändiger. Zum Nachweis der Immunkomplexe wurden in einer Dunkelkammer gleichzeitig 5 ml frische Detektionslösung A (100 mM Tris-HCl pH 8,0 / 2,5 mM Luminol (aus Stammlösung in DMSO) / 0,4 mM p-Cumarsäure (aus Stammlösung in DMSO)) und 5 ml Detektionslösung B (100 mM Tris-HCl pH 8,0 / 0,018% (v/v)  $H_2O_2$ ) auf die Nitrozellulosemembran gegeben, durch Schwenken gemischt und 1-2 min inkubiert. Anschließend wurde die feuchte Membran in eine aufgeschnittene Klarsichthülle gelegt, luftblasenfrei abgedeckt und ein Detektionsfilm („LUMI Chemiluminescent Detection Film“, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)

aufgelegt. Die Belichtung dauerte je nach Stärke des Signals von 20 s bis zu mehreren Minuten. Es schloss sich die Entwicklung des Filmes im Entwickler ‚T32‘ an. Dann wurde der Film kurz in Wasser gespült, einige Minuten im Fixierer ‚T32-5‘ fixiert und abschließend gründlich mit Wasser gewaschen (Entwickler ‚T32‘ und Fixierer ‚T32-5‘ von Calbe Chemie, Calbe, Deutschland).

#### 2.4.4 COOMASSIE-FÄRBUNG VON PROTEINGELEN

Zur Färbung der im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine wurden die Gele etwa eine Stunde in Coomassie-Färbelösung (0,2% (w/v) ‚Coomassie Brilliant Blue R-250‘ / 0,05% (w/v) ‚Coomassie Brilliant Blue G-250‘ / 40% (v/v) Ethanol / 10% (v/v) Essigsäure) / 5% (v/v) Methanol) geschwenkt. Die Entfärbung des Hintergrunds erfolgte meist über Nacht durch Schwenken in Entfärberlösung (20% (v/v) Methanol / 10% (v/v) Essigsäure). Ein Stück Zellstoff in der Schale optimierte dabei das Entfärben, indem es das Coomassie-Blau aus der Lösung band.

#### 2.4.5 DIREKTE DETEKTION DER GFP-FLUORESZENZ IM PROTEINGEL

Um die Fluoreszenz von Fusionsproteinen mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) zu erhalten und im SDS-Gel sichtbar zu machen, wurde in Abwandlung des herkömmlichen Protokolls für die SDS-PAGE (s. Abschnitt 2.4.1) auf das starke Erhitzen der Proben und die damit verbundene Denaturierung der Proteine verzichtet. Stattdessen wurden die Proben nur mit SDS-Probenpuffer (s. Abschnitt 2.4.1) versetzt und für 5 min auf 40°C erwärmt. Nach dem Laufen des Gels konnte dieses dann sofort ohne weitere Schritte in einem ‚Storm 860 Molecular Imager‘ (GE Healthcare, München, Deutschland) untersucht werden. Der Prozess des Einlegens in den Scanner und das Einscannen selbst dauerte je nach gewünschter Auflösung zwischen 5-10 min und gab sofort und damit sehr viel schneller als ein Western-Blot Auskunft über die Präsenz von GFP in den Proben.

Als einen Nachteil der Methode muss man ansehen, dass sich durch den fehlenden Denaturierungsschritt das Laufverhalten der Proteine im Vergleich zu einer SDS-PAGE ändert und deshalb ein direkter Vergleich mit einem Western-Blot, selbst wenn er mit denselben Proben durchgeführt wurde, nur bedingt möglich ist.

#### 2.4.6 MEMBRANFRAKTIONIERUNG

Zur Fraktionierung von Membranen wurden 50 ml einer Kultur in der exponentiellen Phase erst auf Eis abgekühlt und dann durch Zentrifugation geerntet (3800 x g / 10 min / 4°C). Die Zellen wurden in 5 ml 50 mM Tris-Acetat pH 7,5 resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden sie 5x für 30 s auf Eis mit Ultraschall behandelt (Desintegrator ,UW 60‘ und Netzgerät ,GM 60 HD‘ der Firma UniEquip Gerätebau, Martinsried, Deutschland) und dann 10 min bei 4°C und 13000 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und für 30 min in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert (130000 x g / 30 min / 4°C). In dem zu resuspendierenden Pellet befand sich dann die Membranfraktion.

#### 2.4.7 FRAKTIONIERUNG VON PERIPLASMA, MEMBRANEN UND CYTOPLASMA

Um nicht nur die Membranfraktion, sondern auch Cytoplasma und Periplasma einzeln zu gewinnen, waren im Vergleich zu dem im Abschnitt 2.4.6 beschriebenen Protokoll einige Schritte mehr nötig.

Von einer bis zur mittelspäten exponentiellen Phase gewachsenen Kultur wurden 50 ml geerntet (3800 x g / 10 min / 4°C). Das Pellet wurde in 20 ml TES-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0 / 0,1 mM EDTA / 20% (w/v) Saccharose) resuspendiert und für 10 min bei RT inkubiert. Es folgte eine weitere Sedimentation (erneut bei 3800 x g / 10 min / 4°C), nach der das Pellet in 1 ml eiskalter 5 mM MgSO<sub>4</sub>-Lösung aufgenommen und 20 min lang auf Eis inkubiert wurde.

Die folgende Zentrifugation (23000 x g / 10 min / 4°C) trennte die Periplasmafraktion (Überstand) von der Cytoplasma- bzw. Membranfraktion (Pellet), weil durch den vorangegangenen osmotischen Schock Sphäroplasten entstanden waren, die während der Zentrifugation sedimentierten, während das Periplasma im Überstand blieb. Die Periplasmafraktion wurde vollständig abgenommen und das Pellet erneut in 1 ml 5 mM MgSO<sub>4</sub>-Lösung aufgenommen. Diese Lösung wurde einer 1-minütigen Ultraschallbehandlung auf Eis unterzogen.

Eine erneute Zentrifugation (23000 x g / 10 min / 4°C) trennte Zelltrümmer ab. Vom Überstand (Cytoplasmafraktion und Membranen) wurden 900 µl für eine Ultrazentrifugation (130000 x g / 20 min / 4°C) eingesetzt. Der Überstand nach diesem Schritt enthielt die Cytoplasmafraktion und wurde vollständig abgenommen. Das Pellet wurde in 900 µl 5 mM MgSO<sub>4</sub>-Lösung resuspendiert und enthielt die Membranfraktion.

Die Fraktionen wurden entweder auf Eis aufbewahrt oder 1:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt und bei -20°C gelagert.

#### 2.4.8 ZELLAUFSCHLUSS OHNE FRAKTIONIERUNG

Manchmal war es nicht nötig, bestimmte Kompartimente zu fraktionieren, sondern es war sogar wünschenswert, den gesamten Inhalt einer Zelle zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden 2x 2 ml einer Zellkultur geerntet und das Pellet in 1 ml MgSO<sub>4</sub> aufgenommen sowie einer Ultraschallbehandlung unterzogen (s. Abschnitt 2.4.7). In einem anschließenden Zentrifugationsschritt wurden Zelltrümmer entfernt, der Überstand abgenommen und im Fall einer SDS-PAGE direkt mit SDS-Probenpuffer versetzt, denaturiert (s. Abschnitt 2.4.1) und auf das Gel aufgetragen.

#### 2.4.9 PROTEINREINIGUNG MITTELS ‚HIS-TAG‘

Um ein bestimmtes Protein zu reinigen, ist es sehr hilfreich, wenn man das Protein spezifisch anreichern kann. Dazu werden z. B. amino- oder carboxy-terminal lokalisierte Histidin-Motive – sogenannte Histidin-*tags* (His-*tags*) – genutzt. Diese besitzen eine hohe Affinität zu Ni<sup>2+</sup>-Ionen, was eine chromatografische Reinigung über Säulen aus entsprechendem Material möglich macht. Das Motiv selbst besteht aus sechs aufeinander folgenden Histidinen.

Es wurden 100 ml einer entsprechenden Kultur geerntet (10 min / 4 000 rpm / 4°C) und das Pellet in 10 ml Equilibrierungspuffer (20 mM Tris-HCl pH 8,0 / 50 mM NaCl / 5 mM Imidazol) aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte mittels French Press (2 Durchgänge / 20 000 psi). Dann schloss sich ein Abtrennen der Zelltrümmer durch Zentrifugation (23 000 x g / 10 min / 4°C) an. Je nach Anwendung wurde der Überstand nun entweder nochmals einer Zentrifugation (30 min / 56 000 rpm / 4°C) unterzogen und das entstandene Membranpellet wieder in Puffer aufgenommen, oder aber der Überstand wurde insgesamt direkt auf eine vorher mit 20 ml Equilibrierungspuffer (s. o.) equilibrierte His-*tag*-Säule (‚Poly-Prep Chromatography Columns‘ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA)) aufgetragen. Das Säulenvolumen betrug 2 ml Ni-NTA-Agarose (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland). Die Säule wurde sofort mit 40 ml Waschpuffer (20 mM Tris-HCl pH 8,0 / 50 mM NaCl / 20 mM Imidazol / 10% (v/v) Glycerin) gewaschen und danach mit Elutionspuffer (20 mM Tris-HCl pH 8,0 / 50 mM NaCl / 250 mM Imidazol)

eluiert. Normalerweise wurden Fraktionen zu je 0,5-1 ml aufgefangen und über eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert.

#### 2.4.10 PROTEINREINIGUNG MITTELS ‚STREP-TAG‘

Die Reinigung von Proteinen über ‚*Strep-tag*‘-Säulen ähnelt in ihrer technischen Durchführung der Reinigung über His-*tag*-Säulen (s. Abschnitt 2.4.9).

Unterschiedlich waren zum einen die Pufferzusammensetzungen, da die Puffer weder Imidazol noch Glycerin enthielten, und zum anderen die eigentliche *tag*-Sequenz, die anstatt der sechs Histidine beim His-*tag* aus acht Aminosäuren bestand (‚*Strep-Tag II*‘-Sequenz = WSHPQFEK). Eluiert wurde mit Desthiobiotin (Biotin), das den ‚*Strep-Tag II*‘ durch kompetitive Elution von der Bindestelle auf dem Streptavidin verdrängt.

Die ‚*Strep-Tag II*‘-Sequenz stammte wie auch das Säulenmaterial ‚*Strep-Tactin*<sup>®</sup> Superflow<sup>®</sup>‘ (50% (w/v) Suspension) von der Firma IBA BioTAGnology (Göttingen, Deutschland).

#### 2.4.11 SACCHAROSE-DICHTEGRADIENTEN-ZENTRIFUGATION (SDZ)

Bei der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation (SDZ) trennen sich die aufgetragenen Proteine ihrer Dichte nach auf und bilden distinkte Banden, die man dann einzeln abnehmen kann. Es wurden kontinuierliche Dichtegradienten von 10-50% (w/v) Saccharose in Puffer (20 mM MOPS pH 7,2 / 50 mM NaCl) genutzt.

Zur Herstellung wurde ein Gradientenmischer verwendet, dessen zwei Kammern mit je 2,3 ml Puffer gefüllt wurden: die vordere Kammer mit Puffer, der 10% (w/v) Saccharose enthielt, und die hintere mit Puffer mit 50% (w/v) Saccharose. Der Gradient wurde in ein Zentrifugenröhrchen mit einem Volumen von 5,5 ml gegossen. Das fehlende Volumen wurde dann mit der Probe aufgefüllt und das Röhrchen in einem *swing-out* Rotor (SW 40 Ti) in einer Beckmann Coulter ‚L8-60M Ultrazentrifuge‘ (Krefeld, Deutschland) über Nacht zentrifugiert (15 000 rpm / 4°C).

Abschließend wurden vorsichtig und von oben nach unten Aliquots mit einem Volumen von 450 µl abgenommen und auch das Pellet resuspendiert.

## 2.5 ELEKTRONEN- UND LICHTMIKROSKOPISCHE METHODEN

### 2.5.1 DURCHLICHTMIKROSKOPIE

Die Durchlichtmikroskopie wurde auf Grund der eingeschränkten Möglichkeit zum Sichern der Daten durch Digitalisierung eher selten verwendet. Nur zur schnellen Klärung von auffälligen Phänotypen wie dem Kettenphänotyp wurde ein ‚Axiolab E‘ (Carl Zeiss, Jena) mit einem 63x oder einem 100x Ölimmersionsobjektiv benutzt. Dabei wurde auf eine Fixierung der Zellen mittels *agar slides* (s. Abschnitt 2.5.2) meist verzichtet.

### 2.5.2 KONFOKALE LASER-SCANNING-MIKROSKOPIE (LSM)

Bedingt durch die vergleichsweise langsame Scangeschwindigkeit, die zwischen 30 s und mehreren Minuten pro Bild liegt, ist im Gegensatz zur Durchlichtmikroskopie bei der Benutzung eines LSM die Fixierung von Zellen unabdingbar. Diese wurde durch einen dünnen Agarosefilm zwischen Objektträger und Deckglas realisiert. Dazu wurden 100-150 µl erhitzter 2% (w/v) Agarose in LB-Medium auf einen Objektträger pipettiert und durch Andrücken eines zweiten Objektträgers platt gedrückt. Nach dem Verfestigen kann einer der Objektträger entfernt und die Probe aufgetragen werden. Dabei ist zu beachten, dass der dünne Agarosefilm sehr schnell austrocknet und damit unbrauchbar wird.

Um auch am LSM ein Durchlichtäquivalent nutzen zu können, wurde der *differential interference contrast* (Nomarsky DIC) eingesetzt. Dabei werden durch das Aufspalten des Beleuchtungsstrahlbündels in zwei parallele – aber leicht versetzte – Strahlen und die anschließende Interferenz dieser beiden Strahlen nach dem Probendurchtritt die Unterschiede in der optischen Dichte der beobachteten Probe als Kontrastunterschiede sichtbar gemacht. Es entstehen pseudo-plastische Bilder, die nur ungefähr der echten räumlichen Verteilung entsprechen. Deshalb eignet sich DIC vor allem, um Vergleiche mit einer parallel entstandenen Fluoreszenzaufnahme anstellen zu können, aber weniger, um sehr detaillierte Strukturen sichtbar zu machen.

Fluoreszenzaufnahmen erfolgten im Fall von GFP bei Anregungen von 488 nm. Die Emission wurde zwischen 505 nm und 530 nm gemessen. Gängige Auflösungen waren 1024x1024 Pixel. Teilweise wurden jedoch auch schnellere Aufnahmen mit 512x512 Pixeln oder in seltenen Fällen hochauflösende Bilder mit 2048x2048 Pixeln erstellt.

### 2.5.3 TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPIE (TEM)

Die Elektronenmikroskopie unterscheidet sich von der Lichtmikroskopie einerseits hinsichtlich der sehr viel höheren Auflösung, andererseits ist der Aufwand der Probenpräparation deutlich größer.

Es wurde ein ‚EM 900‘ Transmissionselektronenmikroskop (Carl Zeiss SMT, Oberkochen, Deutschland) mit einer ‚Variospeed SSCCD SM-1k-120‘ Kamera der Firma TRS (Moorenweis, Deutschland) zum Einsatz gebracht. Die maximale Auflösung dieses ‚Slow-scan CCD‘-Chips beträgt 1024x1024 Pixel.

#### 2.5.3.1 HIGH PRESSURE FREEZE FIXATION (HPF)

Eine sehr schonende Methode, Zellen zu fixieren, bietet die *high pressure freeze fixation* (HPF). Dabei werden die Zellen in einem kleinen Probenhalter (*planchet*) wie eine Art Sandwich gehalten und bei sehr hohem Druck sehr schnell eingefroren (cryofixiert). Der hohe Druck verhindert dabei die Bildung von Eiskristallen, die feine Strukturen zerstören würden. Anschließend wird in mehreren Schritten das Wasser langsam und schonend verdrängt und ersetzt.

Die zu untersuchenden Proben wurden jeweils 1:10 ad 50 ml aus einer ÜNK angeimpft, für drei Stunden unter Standardbedingungen in Schikanekolben kultiviert und anschließend nach folgendem Protokoll verarbeitet:

- ◉ Zuerst wurden die Bakterien über eine *bottle top* Filterapparatur mit einem 0,22 µm Membranfilter angereichert.
- ◉ Die Zellsuspension wurde in ein aus Aluminium bestehendes *planchet* (2 mm Durchmesser, 0,3 mm Tiefe) transferiert.
- ◉ Dann erfolgte sofort der Einfriervorgang in einer ‚HPM 010‘ Hochdruck-Gefriermaschine (BAL-TEC, Liechtenstein) durch Einschießen von flüssigem Stickstoff bei 2150 bar (Druckhaltezeit 0,5 s). Das Einkühlen auf -196°C erfolgte nach 0,2 s.
- ◉ Anschließend wurde die Probe bis zum Beginn der Cryosubstitution in flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagert.
- ◉ Die Cryosubstitution erfolgte über vier Tagen hinweg in einem speziellen Gefrier-substitutionsgerät (FSU 010‘, BAL-TEC, Liechtenstein) in Aceton. Dabei wurde das Wasser in den Zellen langsam durch 0,25% (w/v) Glutaraldehyd (SIGMA, Taufkirchen, Deutschland) und 0,1% (w/v) Uranylacetat (UA) (Chemapol, Tschechische Republik) ersetzt.
- ◉ Anschließend erfolgte eine 12 h dauernde schrittweise Erwärmung auf -20°C.



- Bei ebenfalls  $-20^{\circ}\text{C}$  erfolgte dann die Infiltration mit dem Polyacrylharz „Lowicryl HM20“ (Polysciences Europe, Eppelheim, Deutschland) und die anschließende Polymerisierung mittels UV-Licht (24 h bei  $-20^{\circ}\text{C}$  und nochmals 24 h ungekühlt). Die Lagerung konnte ab diesem Schritt bei RT erfolgen.
- Später wurde die Probe in einem Ultramikrotom in etwa 80 nm dicke „Scheiben“ geschnitten. Die Schnitte wurden auf Nickel-*grids* transferiert und anschließend kontrastiert.
- Die Kontrastierung selbst wurde in einem EM-Färbeapparat (Leica, Bensheim, Deutschland) mit UA und Bleicitrat durchgeführt.

Nach der Kontrastierung waren die *grids* fertig und konnten nahezu unbegrenzt gelagert und jederzeit elektronenmikroskopisch untersucht werden.

#### 2.5.3.2 NEGATIVE STAINING

Eine gänzlich andere Methode der Fixierung von Zellen bot das *negative staining* genannte Verfahren der Fixierung mittels Uranylacetat (UA) oder Phosphorwolframsäure (PWS). Das Verfahren beruht auf der Kontrastierung der Probe durch die Adsorption und anschließende Eintrocknung von Schwermetallsalzen. Das Protokoll dauerte etwa 15-20 Minuten (exklusive Trocknungsvorgang) und ist im Folgenden wiedergegeben:

- Zuerst wurde ein handtellergroßes Stück Parafilm auf der Arbeitsfläche fixiert.
- Es wurden etwa 20  $\mu\text{l}$  1% (w/v) UA oder 4% (w/v) PWS auf den Parafilm aufgetropft.
- Anschließend wurde das Kupfer-*grid* mit Formvar<sup>®</sup>-Film<sup>13</sup> nach oben zeigend auf den Parafilm gelegt (dazu war eine besondere, sehr spitz zulaufende Pinzette nötig) und mit etwa 10  $\mu\text{l}$  Probe benetzt.
- Das *grid* wurde für 1-2 min zur Adsorption auf der Probe gelassen, dann mit der Pinzette abgenommen und vorsichtig mit einem kleinen Stück Filterpapier von unten abgesaugt.
- Das *grid* wurde kurz in der Luft geschwenkt und auf den Tropfen mit dem Schwermetallsalz (UA bzw. PWS) gelegt.
- Wieder wurde 1-2 min gewartet und anschließend das *grid* erneut aufgenommen, abgesaugt und getrocknet.

Der abschließende Trocknungsschritt kann entweder bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 1-2 h in einem Trockenschrank erfolgen oder bei Raumtemperatur über Nacht.

---

<sup>13</sup> Der Formvar<sup>®</sup>-Film ist ein extrem dünner Polymerfilm, mit dem die *grids* überzogen werden. Auf diesem trocknen die Proben ein und bleiben so in den *grid*-Öffnungen „frei“ und elektronentransparent liegen.

Die Vorteile des *negative stainings* sind die schnelle Probenpräparation, die relative Einfachheit, die geringen Ansprüche an die Ausrüstung (im Vergleich zur HPF) sowie die einfache Möglichkeit, auch Lösungen – wie z. B. gereinigtes Protein – zu fixieren. Nachteile sind einerseits die schwierigere Reproduzierbarkeit und die wechselnde Auflösung, aber auch eventuelle Deformationen von empfindlichen Strukturen durch das Eintrocknen.

### 2.5.3.3 IMMUNO-GOLD-MARKIERUNG

Eine sehr elegante und spezifische Methode, um die Lokalisation von Proteinen zu identifizieren, ist die Immuno-Gold-Markierung. Dabei werden auf eine elektronenmikroskopische Probe vor dem Kontrastieren zwei verschiedene Antikörper gegeben: zuerst ein Primärantikörper, dessen Epitop dem zu findenden Protein entspricht, nach einem Waschschrift dann ein zweiter Antikörper, der den ersten Antikörper erkennt und gleichzeitig konjugiert ist an ein etwa 10 nm großes Goldpartikel (Clontech Takara Bio Europe, St. Germain, Frankreich). Das Goldpartikel erscheint wegen seiner Elektronendichtigkeit als distinkter schwarzer Punkt in der späteren elektronenmikroskopischen Aufnahme und kann deshalb zur Lokalisierung des Zielproteins genutzt werden.

## 2.6 GERÄTE UND CHEMIKALIEN

### 2.6.1 GERÄTE

Die während dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tab. 15 zusammengefasst. Extra aufgeführt sind Zentrifugen und Rotoren (s. Abschnitt 2.6.2) sowie Mikroskope (s. Abschnitt 2.6.3).

Tab. 15: Verwendete Geräte und ihre Hersteller

Gerätetyp	Gerätename und Hersteller
<b>Fluoreszenz-Imager</b>	„Storm™ 840“ (GE Healthcare, München, Deutschland)
<b>French Press</b>	„French® Pressure Cell Press“ (SLM Aminco, Urbana, Illinois, USA)
<b>Geldokumentation</b>	„Gel iX Imager“ (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland)
<b>Gelelektrophoresekammer</b>	„Easy Cast™ Electrophoresis System“ (Owl Scientific, jetzt Thermo Fisher Scientific, Rochester, New York, USA)

Gerätetyp	Gerätename und Hersteller
Photometer	UV/Vis-Spektrophotometer ,Uvikon 941‘ (Kontron Instruments, Mailand, Italien)
Proteinelektrophorese-kammer	,Mini-Protean <sup>®</sup> 3 Electrophoresis System‘ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA)
Schüttler	‘Celloshaker Variospeed‘ (Chemetron, Mailand, Italien)
Stromversorgung	,Power Supply PHERO-stab.300‘ (Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen, Deutschland)
	,Power Supply E452‘ (CONSORT, Turnhout, Belgien)
	,Power Supply EV243‘ (CONSORT, Turnhout, Belgien)
Thermoblock	,Dri-Block <sup>®</sup> DB-3‘ (Techne, Jahnsdorf, Deutschland)
Thermocycler	,Trio-Thermoblock <sup>™</sup> ‘ (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland)
Thermomixer	,KTMR-133‘ (HLC BioTech, Bovenden, Deutschland)
	,Thermomixer 5436‘ (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
Ultraschallgerät	Desintegrator ,UW 60‘ und Netzgerät ,GM 60 HD‘ (UniEquip Gerätebau, Martinsried, Deutschland)
Vakuumentrifuge	,Speed Vac SVC 100E‘ (Savant Instruments, Farmingdale, New York, USA)
Western Blot-Apparatur	,Trans-Blot <sup>®</sup> Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell‘ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA)

### 2.6.2 ZENTRIFUGEN UND ROTOREN

Die folgende Tab. 16 listet alle verwendeten Zentrifugen und Rotoren (mit Ausnahme der Vakuumentrifuge (siehe Tab. 15)) sowie deren Fassungsvermögen, Maximalgeschwindigkeit und die relative Zentrifugalbeschleunigung (RZB) auf.

Tab. 16: Verwendete Zentrifugen und Rotoren sowie ihre Eigenschaften

Zentrifuge (Hersteller / Name)	Rotortyp	max. Volumen in ml	mittlerer Radius in mm	max. rpm	RZB in x g (für $r_{\text{mittel}}$ bei $r_{\text{pm}_{\text{max}}}$ )
Beckman / L8-60M	SW 40 Ti	6 x 14	112,7	40 000	202 000
	SW 28	6 x 39	118,2	28 000	104 000
	TY 65	8 x 8	85,1	65 000	402 000
Hermle / Z 216 MK	220.87 V08	24 x 2	8,5	15 000	21 380
Hermle / Z 160 M	220.95 V04	18 x 2	7,3	14 000	15 996
Hettich / Universal 30-RF	1424A	4 x 50	137,0	5 000	3 800
	1412	24 x 2	92,0	15 000	23 000
Sorvall / Discovery M120 SE	S100-AT4	6 x 3	37,1	316 000	414 000
Sorvall / RC-5C Plus	SLA-3000	6 x 500	95,4	11 000	13 000
	SS-34	8 x 35	69,9	20 000	31 000

### 2.6.3 MIKROSKOPE

Es wurden drei verschiedene Mikroskoptypen verwendet: Durchlicht-, konfokale Laser-Scanning- und Transmissionselektronenmikroskope (s. Tab. 17).

Tab. 17: Verwendete Mikroskope

Mikroskoptyp	Modell	Hersteller
Durchlichtmikroskop	Axiolab E	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Laser-Scanning-Mikroskop	LSM510 META	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Laser-Scanning-Mikroskop	LSM510	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Elektronenmikroskop	EM 900	Carl Zeiss SMT, Oberkochen, Deutschland

Die Arbeiten an den Laser-Scanning-Mikroskopen wurden mit einem ‚Axiovert 100M‘ mit einem C-Apochromat 63x/1,20 W Korr. Wasserimmersionsobjektiv durchgeführt.

### 2.6.4 CHEMIKALIEN UND ENZYME

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien von den in Tab. 18 und alle Restriktionsendonukleasen und andere Enzyme von den in Tab. 19 angegebenen Firmen bezogen.

Tab. 18: Chemikalienproduzenten und -lieferanten

Firma	Herkunft
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen bei München, Deutschland
Serva GmbH	Heidelberg, Deutschland
Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Merck KG	Darmstadt, Deutschland

Tab. 19: Enzymproduzenten und -lieferanten

Firma	Herkunft
Fermentas	St. Leon-Rot, Deutschland
New England BioLabs	Frankfurt am Main, Deutschland

## 2.7 DATENAUSWERTUNG

### 2.7.1 SOFTWARE

Gerade bei mikroskopischem Arbeiten fallen große Datenmengen an. Die meisten Bilddaten liegen dabei in proprietären Formaten (wie dem mdb-Datenbank-Format von Carl Zeiss) vor und müssen deshalb mit herstellerspezifischen Programmen geöffnet werden, so z. B. mit dem ‚Zeiss Image Browser für LSM‘ von Carl Zeiss (Jena, Deutschland).

Für die Aufnahme und Auswertung der elektronenmikroskopischen Bilder wurde die Software ‚iTEM‘ von Olympus Soft Imaging Solutions (Münster, Deutschland) genutzt. Neben dem Export in das gängige und verlustfreie *tagged image file format* (TIF) kann die Software – wie auch die entsprechende Software von Carl Zeiss – z. B. Größenstandards in die Bilder einbrennen sowie beim Zählen von Objekten im Bild oder beim Messen von Abständen helfen.

Alle Bilder wurden mit den entsprechenden Programmen gesichtet, vorbereitet und zur Endbearbeitung in die Grafikbearbeitungsprogramme ‚Jasc Paint Shop Pro 9‘ (Jasc Software, Eden Prairie, Minnesota, USA) bzw. ‚Adobe Photoshop CS4‘ (Adobe Systems Inc., San Jose, Kalifornien, USA) exportiert.

Statistische Auswertungen erfolgten fast ausschließlich in Excel 2007 von Microsoft (Redmond, Washington, USA).

### 2.7.2 BILDVERARBEITUNG

Sowohl die TEM-Bilder als auch die Bilder vom LSM enthalten Informationen nur in Form von Graustufen. Nachträgliche Einfärbungen (z. B. in grün für GFP) sind zwar aus ästhetischen Gründen möglich, aber nicht sinnvoll, da die Bilder hierdurch nicht mehr Informationen enthalten und spätestens im Ausdruck sogar an Kontrast verlieren. Um das Betrachten der LSM-Bilder zu vereinfachen, wurden alle Aufnahmen von fluoreszierenden Zellen farblich invertiert, damit Schwarz einem Fluoreszenzsignal entspricht. Teilweise wurden auch die Helligkeit und der Kontrast direkt im ‚Zeiss Image Browser für LSM‘ verändert, um bestimmte Merkmale deutlicher hervorzuheben. Außerdem wurde ein Größenstandard von der Software eingebrannt, der nachträglich in dem Open Source Desktop-Publishing-Programm ‚Scribus‘ (Scribus Development Team) durch einen optisch einheitlichen Standard ersetzt wurde. Bis auf diese Änderungen sind die Bilder, wenn nicht anders angegeben, unbearbeitet.

### 2.7.3 SEQUENZDATEN

Sequenzierungsdaten wurden in dem frei verfügbaren Programm ‚Chromas Lite‘ der Griffith University (Southport, Australia) ausgewertet. Die extrahierte Sequenz wurde dann meist direkt für Sequenzvergleiche eingesetzt. Diese wurden fast immer online mit Hilfe von ‚Clustal W‘<sup>14</sup> vom European Biotechnology Institut (EBI) durchgeführt.

Allgemeine Klonierungen wie Restriktionsverdauung und Ligationen wurden in dem Programm ‚Clone Manager‘ in der Version 5.03 (Scientific & Educational Software, Cary, North Carolina, USA) *in silico* geplant und auch in Form von komplett annotierten Plasmidkarten als Referenz aufbewahrt. Auch das Designen von neuen Primern wurde durch dieses Programm erheblich vereinfacht.

---

<sup>14</sup> URL: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html> (Stand: 15.07.2009)

### 3 ERGEBNISSE

Die Ergebnisse dieser Arbeit gliedern sich in drei Hauptbereiche:

Zuerst wurden die Lokalisationen der Tat-Komponenten untersucht (Abschnitt 3.1). Einige wenige der Untersuchungen wurden schon vor dieser Arbeit angefangen und bereits in meiner Diplomarbeit (BERTHELMANN, 2004) veröffentlicht. Diese Ergebnisse werden hier zum leichteren Verständnis des Gesamtzusammenhangs noch einmal kurz erwähnt.

Da das Fusionieren von fluoreszierenden Proteinen an die Tat-Komponenten anfällig für Artefakte war, wurden zweitens die fluoreszierenden Proteine auch als funktionierende Tat-Substrate eingesetzt (Abschnitt 3.2.1). Ihre Lokalisierung konnte natürlich auch potentiell Auskunft geben über den Ort der Translokation. Noch interessanter waren die Experimente mit transportinkompetenten Substraten, die, da sie nicht transloziert wurden, zumindest zeitweise am Translokation verblieben. Diese indirekte Methode der Lokalisierung erwies sich als sehr aussagekräftig, da die Wahrscheinlichkeit von Artefakten weitaus geringer war als bei der Fusionierung von großen fluoreszierenden Proteinen an die Tat-Komponenten. Die Ergebnisse dieser Experimente werden im Abschnitt 3.2.2 vorgestellt.

Ein dritter und letzter Teil der Ergebnisse (Abschnitt 3.3) beschäftigt sich eingehend mit ungewöhnlichen Röhrenstrukturen, die von TatA – der häufigsten Tat-Komponente in *E. coli* – gebildet wurden. Diese Strukturen zeigten in den durchgeführten Experimenten einige erstaunliche Eigenschaften, die vielleicht ein Schlüssel zum Verständnis der Tat-Translokation sein könnten.

### 3.1 LOKALISATION VON TAT-KOMPONENTEN

#### 3.1.1 IST TATA POLAR?

Während meiner Diplomarbeit (BERTHELMANN, 2004) wurden die Tat-Komponenten – unter ihnen auch TatA – C-terminal an GFP fusioniert. Zuerst wurde dazu das Plasmid pABS-*tatABC* genutzt, das ein pACYC184-Derivat ist, und *tatABC* unter Kontrolle des konstitutiven *tatA*-Promotors exprimiert. Zellen, die neben *tatBC* auch *tatA-gfp* konstitutiv exprimierten, wiesen deutliche Fluoreszenz in oder aus der Nähe der Membran (Halo), aber häufig auch hell leuchtende, polare Flecken auf. Das galt sowohl für Zellen mit einem natürlichen Tat-Hintergrund (Abb. 7 A und B) als auch für Tat-Mutanten (Abb. 7 C). Wenn hell fluoreszierende Punkte vorhanden waren, befanden sich diese fast immer an den Zellpolen.

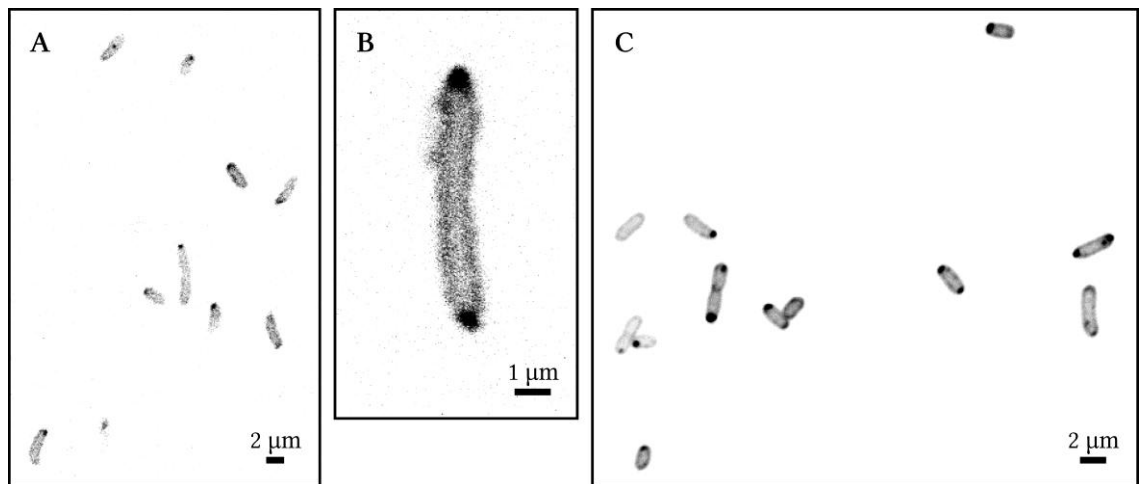
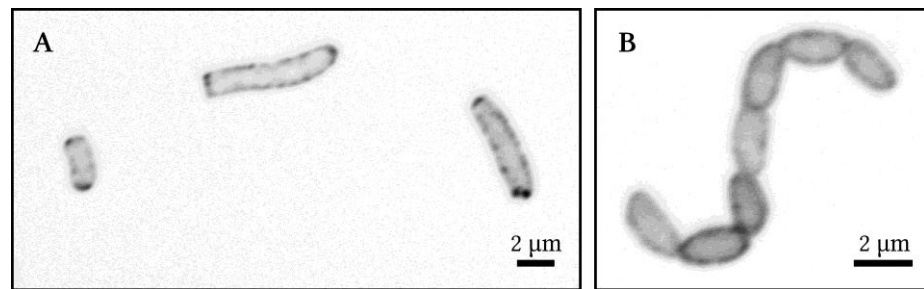


Abb. 7: TatA-GFP (konstitutiv) ist teilweise polar im Wildtypstamm MC4100 und im Mutantenstamm DADE. Die Bilder A und B zeigen den Wildtypstamm MC4100, Bild C den Stamm DADE ( $\Delta$ *tatABCDE*). In beiden Fällen wird *tatA-gfp* vom Plasmid pABS-*tatA-gfp-BC* exprimiert.

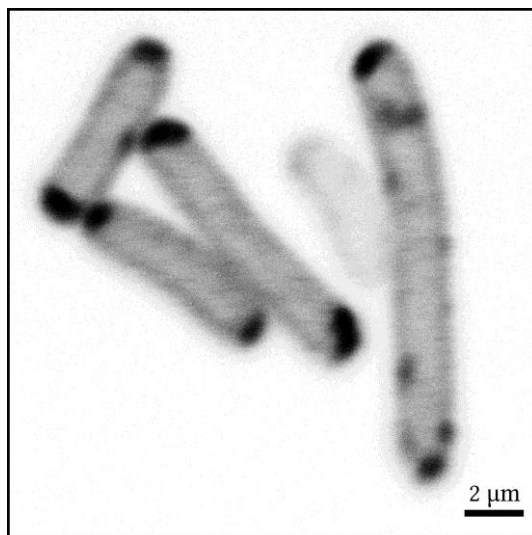
Wenn jedoch ein anderes Plasmid verwendet wurde, um *tatA-gfp* zu exprimieren, und man auf ein induzierbares Vektorsystem zurückgriff, dann änderte sich das Bild. Die Flecken waren viel weniger stark ausgeprägt und die Zellen zeigten durchweg eine gleichmäßige Verteilung in der Zellmembran (Abb. 8). Dabei spielte es für die Lokalisation von TatA-GFP wieder keine Rolle, ob *tatA-gfp* allein in der Zelle vorlag (Abb. 8 B) oder zusätzlich zu den natürlichen Tat-Komponenten exprimiert wurde (Abb. 8 A).





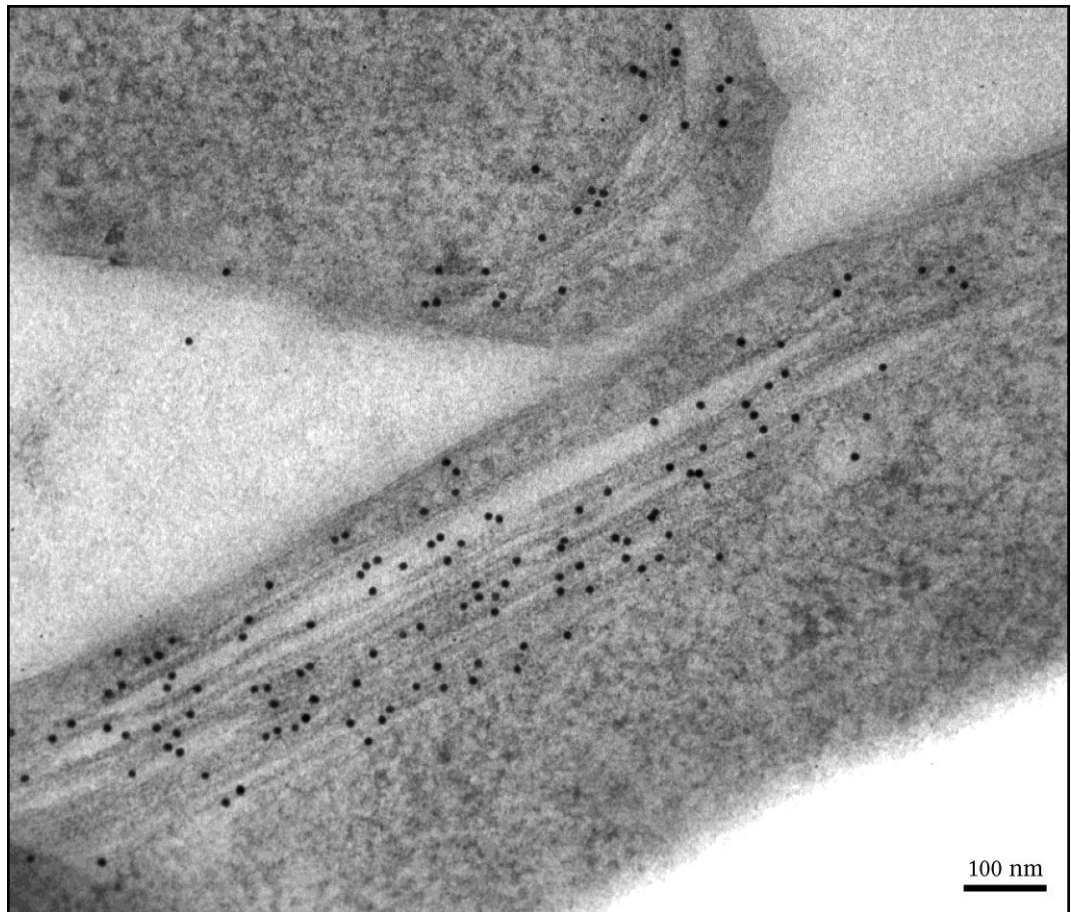
**Abb. 8: TatA-GFP (induziert) ist ausschließlich membranständig im Wildtypstamm MC4100 ara<sup>R</sup> und im Mutantenstamm DADE ara<sup>R</sup>.** Beide oben gezeigten Bilder (A und B) zeigen die Verteilung von TatA-GFP. Der Stamm MC4100 ara<sup>R</sup> pBAD-*tatA-gfp* in Bild A und der  $\Delta$ *tatABCDE*-Stamm DADE ara<sup>R</sup> pBAD-*tatA-gfp* in Bild B wurden jeweils für 3 h mit 0,01% (w/v) L-Arabinose induziert.

Neben GFP gibt es noch eine ganze Reihe von anderen fluoreszierenden Proteinen, die oft von GFP abgeleitet sind, so z. B. das *yellow fluorescent protein* (YFP). Interessanterweise hatte die Wahl des fluoreszierenden Fusionspartners einen gewissen Einfluss auf die Lokalisation. So sieht man in Abb. 9, dass YFP bei identischen Voraussetzungen eher als GFP dazu neigte, polare Flecken zu bilden (vgl. mit Abb. 8). Trotzdem konnten durch eine Senkung der Konzentration an L-Arabinose auch mit YFP sehr ähnliche Bilder wie in Abb. 8 produziert werden (nicht gezeigt).



**Abb. 9: Fluoreszenzverteilung von TatA-YFP im Stamm MC4100 ara<sup>R</sup>.** Die Kultur des Stammes MC4100 ara<sup>R</sup> pBAD-*tatA-yfp* wurde für diese Aufnahme analog zu dem Protokoll für die vorangegangene Abb. 8 für 3 h mit 0,01% (w/v) L-Arabinose induziert.

Der Unterschied in der Fluoreszenzverteilung von TatA-GFP und TatA-YFP bewies die Anfälligkeit des Verfahrens für Artefakte und führte deshalb zu dem Versuch, die Tat-Komponenten und damit auch TatA ohne Überexpression und ganz ohne Marker zu lokalisieren. Dazu wurden Wildtypzellen durch *high pressure freeze fixation* (HPF) möglichst schonend schockgefroren (s. Abschnitt 2.5.3.1) und mit diesen eine Immuno-Gold-Markierung mit entsprechenden Antikörpern durchgeführt (s. Abschnitt 2.5.3.3).



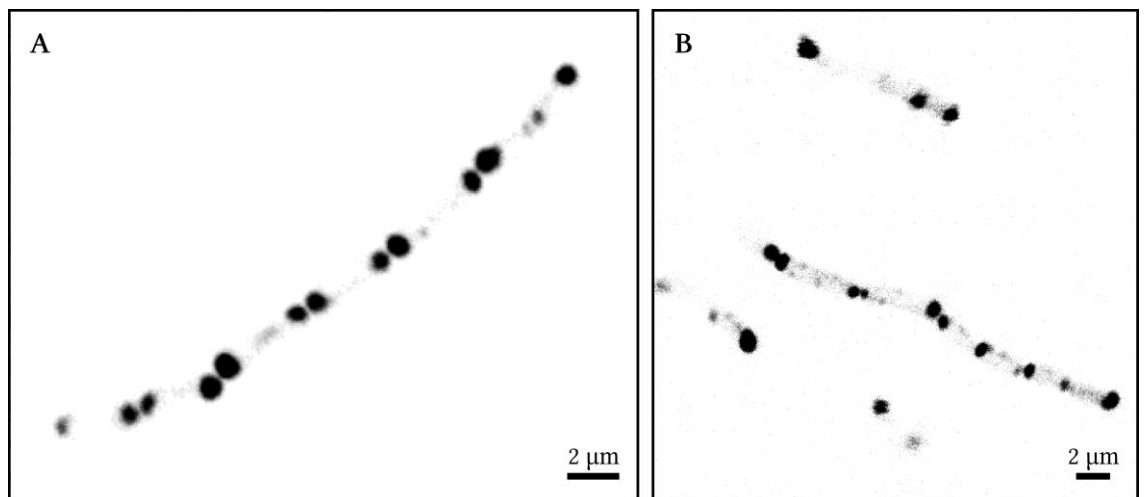
**Abb. 10: Immuno-Gold-Markierung von TatA bei Überexpression von *tatABC*.** Die elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt zwei HPF-fixierte Zellen des Stammes DADE pABS-*tatABC*. Die schwarzen Punkte sind die Goldpartikel der Immuno-Gold-Markierung, die die Anwesenheit von TatA in den länglichen Strukturen anzeigen.

Es stellte sich jedoch heraus, dass selbst der Antikörper gegen die häufigste Tat-Komponente TatA nicht sensitiv genug war, um Wildtypmengen von TatA detektieren zu können. Gleiches galt auch für die beiden anderen Tat-Komponenten TatB und TatC. Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt das *tatABC*-Operon im Stamm DADE überexprimiert und das Experiment wiederholt (s. Abb. 10). Dies erhöhte die Anzahl der Signale erheblich, und es waren deutlich lokalisierte Gold-Partikel zu erkennen (für die Ergebnisse mit den Antikörpern gegen TatB und TatC s. die folgenden Abschnitte 3.1.2 und 3.1.3). Interessanterweise tauchten die schwarzen Punkte der Goldpartikel weder entlang der inneren Membran noch in einzelnen polaren Punkten auf, wie man es auf Grund der Lokalisation der GFP-Fusionsproteine hätte erwarten können. Stattdessen konzentrierten sich die Signale in großen, länglichen Strukturen, die wie Stapel aus Papierblättern aussahen. Wie sich später herausstellte, handelte es sich bei diesen Strukturen um Röhren (s. Abschnitt 3.3 ab S. 70). Mit diesen cytoplasmatischen TatA-Strukturen, die bei Überexpression des Wildtyp-Proteins auftraten, mit der membranständigen Fluoreszenz bei induzierbarer Expression von *tatA-gfp* und mit den polaren

Aggregationen, die bei konstitutiver Expression von *tatA-gfp* zu beobachten waren, gab es so insgesamt drei verschiedene Ergebnisse zur Lokalisation von TatA bzw. TatA-GFP.

### 3.1.2 TATB ERSCHEINT IMMER POLAR

Wie für TatA-GFP wurden auch für TatB-GFP zwei verschiedene Expressionssysteme genutzt: einerseits der konstitutiv exprimierende Vektor pABS-*tatAB-gfp-C* und andererseits der induzierbare Vektor pBAD-*tatB-gfp*. Aber während sich bei TatA-GFP mit dem Vektorsystem auch die Fluoreszenzverteilung änderte, blieb diese bei TatB-GFP sehr ähnlich bis gleich. So erkennt man sowohl in Abb. 11 als auch in Abb. 12, dass TatB-GFP in sehr klar definierten polaren Punkten konzentriert war und fast keine Fluoreszenz in der Membran erschien.



**Abb. 11: Fluoreszenzverteilung von TatB-GFP in den Stämmen BØD und MC4100.** In den oben gezeigten Zellen wird *tatB-gfp* konstitutiv vom Vektor pABS-*tatAB-gfp-C* exprimiert. Bild A zeigt eine Zellkette des Stammes BØD und Bild B den Wildtypstamm MC4100, der auch noch nicht fusioniertes TatB enthält.

Ein großer Unterschied zwischen den beiden Expressionssystemen existierte jedoch: konstitutiv überexprimiertes *tatB-gfp* induzierte eine Art sekundären Kettenphänotyp im Wildtypstamm MC4100 (s. Abb. 11 B). In der TatB-Mutante BØD *ara*<sup>R</sup> pBAD-*tatB-gfp* war dies beim induzierten *tatB-gfp* nicht der Fall (Abb. 12). Im Gegenteil: hier konnte TatB-GFP sogar das natürliche TatB komplementieren und verhinderte den primären Kettenphänotyp, der ohne Komplementation im Stamm BØD *ara*<sup>R</sup> auftrat.

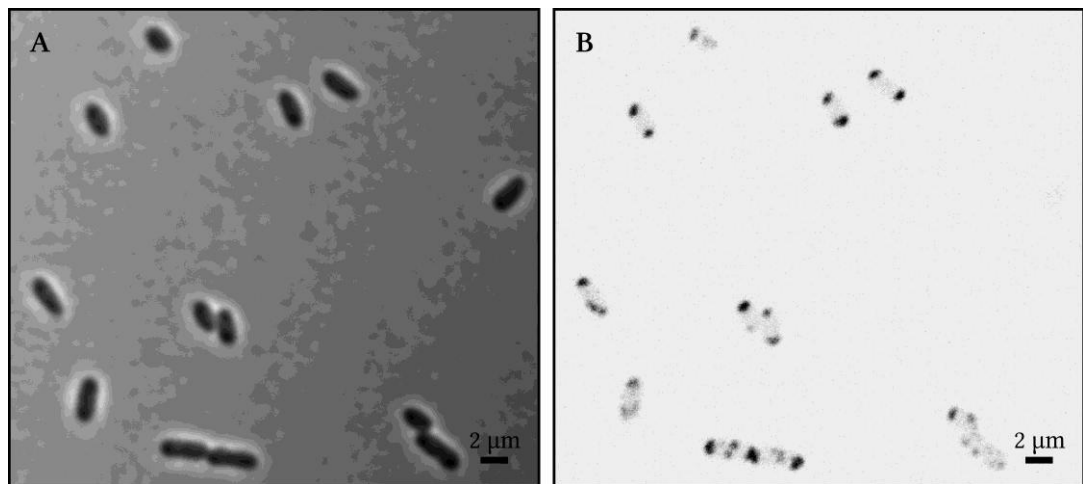


Abb. 12: Fluoreszenzverteilung von TatB-GFP (induziert) im  $\Delta tatB$ -Stamm BØD  $ara^R$ . Gezeigt ist der Stamm BØD  $ara^R$  pBAD-*tatB-gfp*, der 1:10 aus einer ÜNK angeimpft und bei 37°C schüttelnd 3 h in der Anwesenheit von 0,1% (w/v) L-Arabinose inkubiert wurde. Bild A ist eine DIC-Aufnahme, während Bild B eine Fluoreszenzaufnahme derselben Zellen ist.

In nahezu allen verwendeten Stämmen wurden auch immer wieder Zellen gefunden, die neben den meist prominenten polaren Punkten auch zusätzliche laterale Aggregationen aufwiesen. Eine solche Zelle ist exemplarisch in Abb. 13 gezeigt. Beim Betrachten der Abbildung fällt auf, dass die lateralen fluoreszierenden interpolaren Punkte nicht zufällig verteilt zu sein scheinen. Es wirkt, als würden sie einer unsichtbaren Spirale folgen und an deren Scheitelpunkten aggregieren. Der Grund dafür ist jedoch bislang unklar (s. a. Abschnitt 4.3.4 der Diskussion).

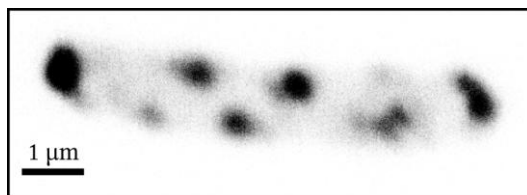
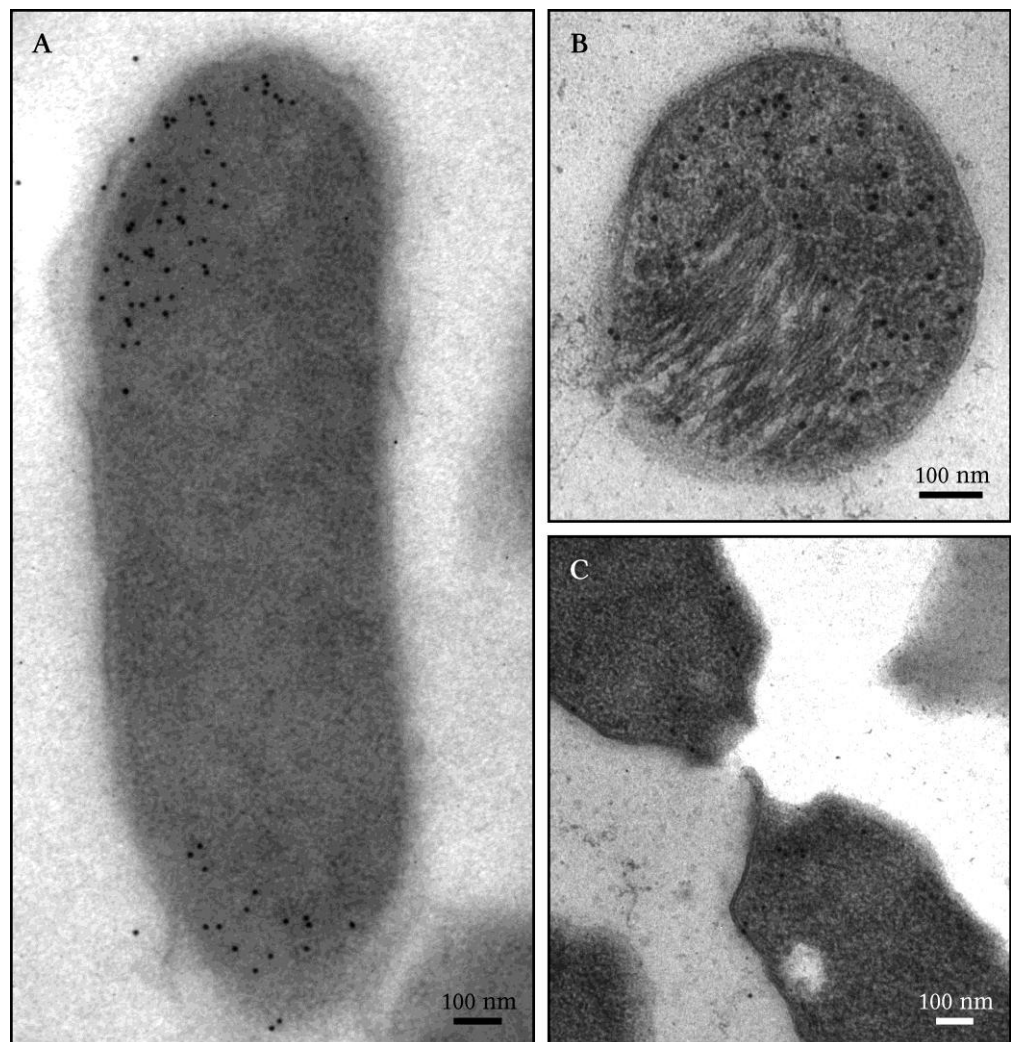


Abb. 13: Periodische Verteilung von TatB-GFP. Gezeigt ist der Wildtypstamm BW25113 pBAD-*tatB-gfp*, doch waren solche Zellen auch im Stamm MC4100 zu finden. Die Zellen wurden 1:10 aus einer ÜNK angeimpft und für 3 h mit 0,01% (w/v) L-Arabinose induziert.

Analog zu den Untersuchungen über die Lokalisation von TatA wurden sowohl für TatB als auch für das Fusionsprotein TatB-GFP Immuno-Gold-Markierungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 14 dargestellt. Sie zeigen drei Dinge: Erstens war TatB – genau wie TatB-GFP – vornehmlich an den Polen lokalisiert (Abb. 14 A und C). Zweitens sieht man, dass die Goldpartikel zu einem großen Teil im Cytoplasma lagen und nicht direkt in oder in der Nähe der Membran. Die Goldpartikel bei Überexpression von *tatABC* ohne die GFP-Fusion an TatB waren zwar hin und wieder an der Membran zu finden, aber auch außerhalb der Zellen, sodass diese Lokalisierung recht unsicher ist. Und drittens erkennt man in Bild B der Abb. 14, dass TatB, im Gegensatz zu TatA, nicht in den länglichen Strukturen lokalisiert war, die nur erkennbar waren, wenn die Tat-Komponenten überexprimiert wurden (s. a. Abschnitt 3.3 ab S. 70).

Da der große Anteil an cytoplasmatischem Signal eher auf eine Aggregation hindeutet, wird es schwieriger, die Aussagekraft der polaren Lokalisation von TatB-GFP zu beurteilen. Auch der oben erwähnte sekundäre Kettenphänotyp deutet auf eine unnatürlich große Aggregation hin, da ein ähnlicher Wachstumsdefekt bei einer ausschließlichen Überexpression von *tatA* bzw. *tatAB* auftrat (s. a. Abschnitt 3.3.10 ab S. 86) und auch dort eine cytoplasmatische Aggregation an den Zellpolen gezeigt werden konnte (s. Abb. 40 und Abb. 41). Der Kettenphänotyp, der durch die Überexpression von *tatAB-gfp-C* induziert wurde, würde dann rein mechanisch durch die Blockierung der polaren Regionen und einer dadurch ausgelösten eingeschränkten Zellteilung erzeugt.



**Abb. 14: Immuno-Gold-Markierung von TatB.** Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen HPF-fixierte Zellen. Bild A wurde mit dem Stamm MC4100 ara<sup>R</sup> pBAD-*tatB-gfp* erstellt, die Bilder B und C beide mit dem Stamm DADE pABS-*tatABC*. Die Zellen wurden 1:10 angeimpft, nach 3 h Wachstum in Anwesenheit von 0,1% (w/v) L-Arabinose (nur Bild A) geerntet, unter Hochdruck eingefroren und anschließend einer Immuno-Gold-Markierung mit einem Antikörper gegen TatB unterzogen.

## 3.1.2.1 MREB BEEINFLUSST DIE LOKALISATION VON TATB

MreB ist ein dem Aktin ähnliches Protein in Prokaryoten, das fähig ist, lange Protofilamente zu bilden (VAN DEN ENT *et al.*, 2001) und sowohl für die Trennung der Chromosomen während der Zellteilung zuständig ist als auch als zellformstabilisierender Faktor dient. Zellen ohne MreB verlieren ihre Stäbchenform und bilden runde Kugeln, während Zellen, die *mreB* überexprimieren, elongiert wachsen (DOI *et al.*, 1988).

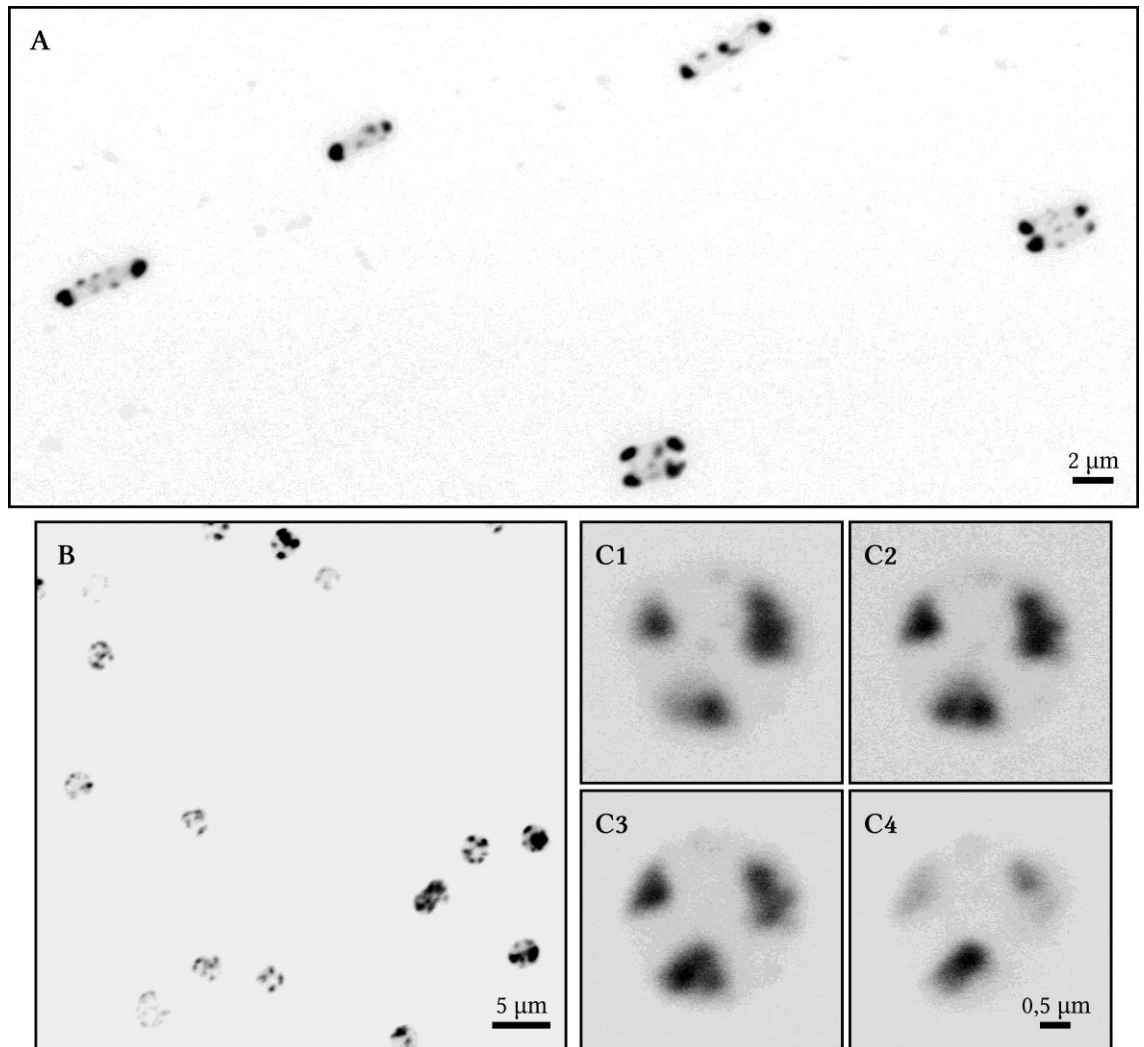


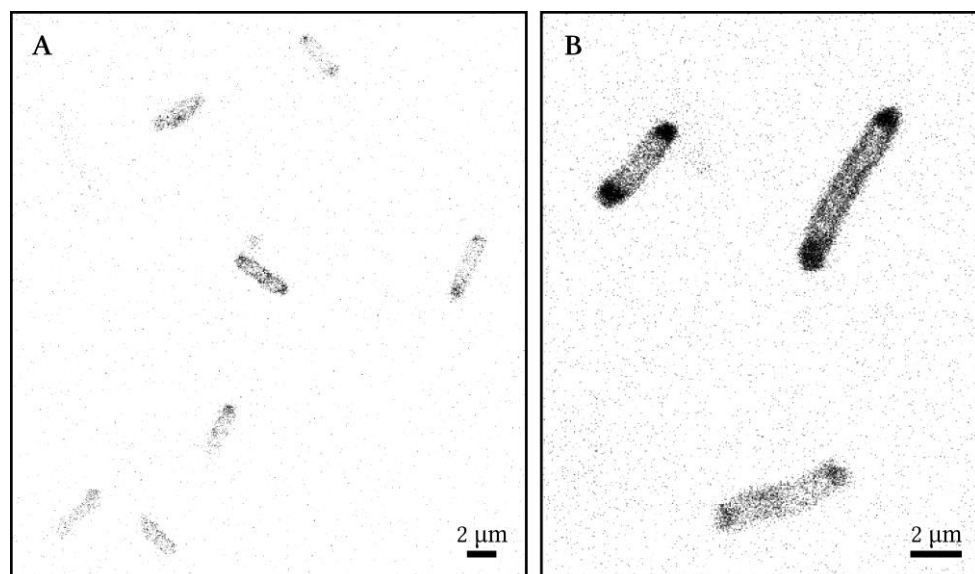
Abb. 15: Fluoreszenz von TatB-GFP (induziert) im Wildtyp-Hintergrund und in einem MreB-Mutantenstamm. Bild A zeigt als Kontrolle den Wildtypstamm MC1000 mit MreB, während die Bilder B und C im Stamm MC1000  $\Delta mreB$  entstanden. Beide Stämme exprimierten *tatB-gfp* vom Plasmid pBAD-*tatB-gfp*. Die Induktion erfolgte 3 h lang mit 0,05% (w/v) L-Arabinose. Gezeigt ist eine Übersichtsaufnahme (Bild B) und vier übereinander liegende optische Schnitte durch eine repräsentative Zelle (Bilder C1 bis C4).

Wenn *tatB-gfp* in einem Stamm exprimiert wurde, in dem MreB deletiert war, dann konnte man einerseits die typische Zellform von MreB-Mutanten beobachten und andererseits wurde offensichtlich, dass TatB-GFP in beiden Stämmen eine leicht veränderte Lokalisation zeigte. Während der Wildtypstamm MC1000 ganz ähnlich wie der Stamm

MC4100 fast ausschließlich polare Fluoreszenz aufwies (Abb. 15 A), war die Situation im Stamm ohne MreB weniger eindeutig. An Stelle von zwei definierten Punkten entstanden mehrere punktuelle, aber auch flächige Bereiche von Fluoreszenz (Bilder B und C in Abb. 15). Viele kleinere und größere Flecken bestimmten das Bild. MreB scheint einen Einfluss auf die Verteilung von TatB-GFP in der Zelle zu haben, wobei schwer zu ermitteln ist, ob dieser Unterschied direkter oder indirekter Natur ist.

### 3.1.3 IST TATC POLAR ODER VERTEILT IN DER MEMBRAN?

Die Lokalisation von TatC war besonders schwierig zu bestimmen: wahrscheinlich, weil TatC die Tat-Komponente mit dem geringsten Expressionsniveau ist (s. a. Abschnitt 1.2.3) und weil TatC – zumindest bei den von uns verwendeten Konstrukten – nicht so gut geeignet scheint für eine Fusion an GFP. Auf jeden Fall waren Zellen wie in Abb. 16 B die Ausnahme. Meist sahen die Zellen aus wie in Bild A der gleichen Abbildung. Die Fluoreszenz war sehr schwach und verwaschen. Trotzdem ließ sich in den Zellen eine duale Lokalisation erkennen: zum einen sah man Signale in der Membran wie bei TatA und zum anderen fand man gleichzeitig häufig polare Punkte wie bei TatB (beides gut erkennbar in der rechten oberen Zelle in Abb. 16 B).



**Abb. 16: Schwache Fluoreszenz von TatC-GFP im Wildtypstamm MC4100.** Die Fluoreszenz von TatC-GFP bewegt sich meist auf einem sehr niedrigen Niveau. Die Aufnahmen entstanden mit dem Stamm MC4100 pABS-*tatABC-gfp*, der 1:10 aus einer ÜNK angeimpft und für 3 h schüttelnd bei 37°C inkubiert wurde.

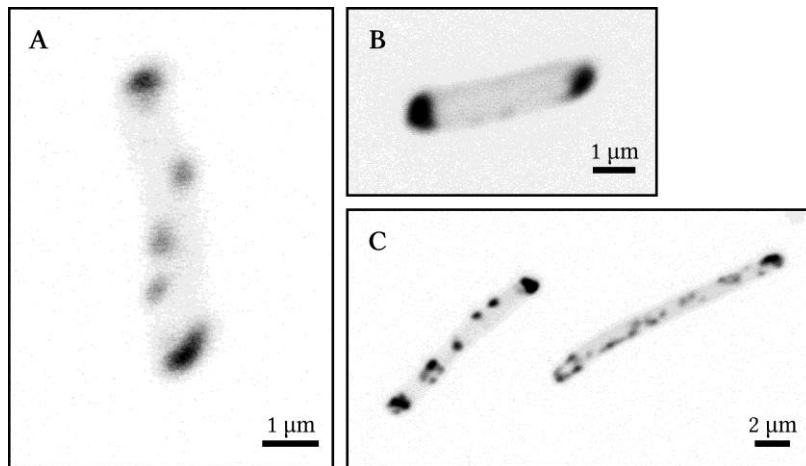


Abb. 17: Fluoreszenz von TatC-GFP im Stamm MC4100 ara<sup>R</sup> bei gleichzeitiger Expression von *tatABC*. Gezeigt ist der Stamm MC4100 ara<sup>R</sup> pABS-*tatABC* pBAD-*tatC-gfp*. Die Kultur wurde 1:10 aus einer ÜNK angeimpft und 3 h schüttelnd bei 37°C in Anwesenheit von 0,01% (w/v) L-Arabinose inkubiert.

Das Fluoreszenzsignal ließ sich verstärken, indem *tatC-gfp* induzierbar und *tatABC* zusätzlich von einem anderen Vektor exprimiert wurde (Abb. 17). Dann sah man häufiger Zellen mit fluoreszierenden Punkten. Diese waren meist an den Zellpolen, aber oft auch in den lateralen Bereichen der Zelle lokalisiert. Dies erinnerte an die Lokalisation von TatB-GFP. Jedoch leuchteten nicht alle Zellen, und auch die Fluoreszenzintensität schwankte. Die Lokalisation war deshalb bei weitem nicht so eindeutig wie bei TatA-GFP bzw. TatB-GFP, wo alle Zellen eines Stammes mehr oder weniger uniform in ihrem Fluoreszenzmuster waren (s. a. die Abschnitte 3.1.1 und 3.1.2).

## 3.2 LOKALISATION VON TAT-SUBSTRATEN

### 3.2.1 TRANSPORTIERTES GFP BILDET POLARE AGGREGATIONEN

Wenn man die Lokalisation eines Transporters eruieren will, der fähig ist, gefaltete Proteine zu transportieren, dann bietet es sich geradezu an, fluoreszierende Proteine wie z. B. GFP als Substrate zu verwenden. So konnte schon bald nach der Entdeckung des Tat-Systems gezeigt werden, dass es möglich ist, GFP mit einem Tat-Signalpeptid zu versehen und transportieren zu lassen (SANTINI *et al.*, 2001; THOMAS *et al.*, 2001). Im Verlaufe früherer Arbeiten (BERTHELMANN und BRÜSER, 2004) wurde von uns dazu das Plasmid pTB-DG genutzt, dessen Expressionsprodukt (im Folgenden DmsA-SP-GFP genannt) ein Fusionsprotein aus GFP und dem Signalpeptid der katalytischen Untereinheit DmsA der DMSO-Reduktase, einem natürlichen Tat-Substrat in *E. coli*, ist.



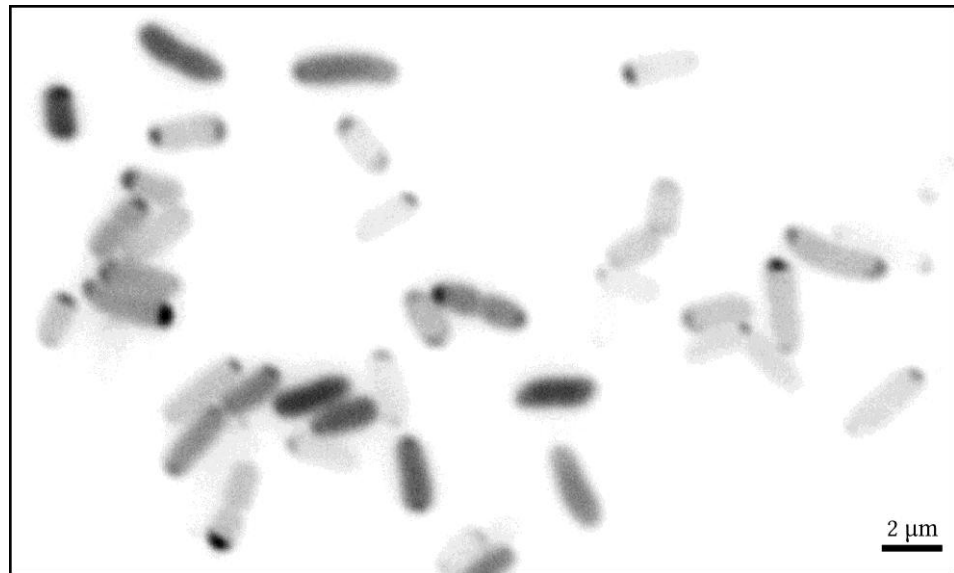


Abb. 18: Fluoreszenzverteilung des Tat-Substrates DmsA-SP-GFP im Stamm MC4100. Gezeigt ist die Fluoreszenz von GFP, das mit einem *DmsA*-Signalpeptid fusioniert wurde. Es handelt sich um eine ÜNK des Wildtypstammes MC4100 mit dem Plasmid pTB-DG.

Wie in Abb. 18 erkennbar, war DmsA-SP-GFP in einem Großteil der Zellen vor allem an den Zellpolen lokalisiert. Dies galt vor allem für Zellen, die schon länger wuchsen und eine größere Menge des Proteins angesammelt hatten.

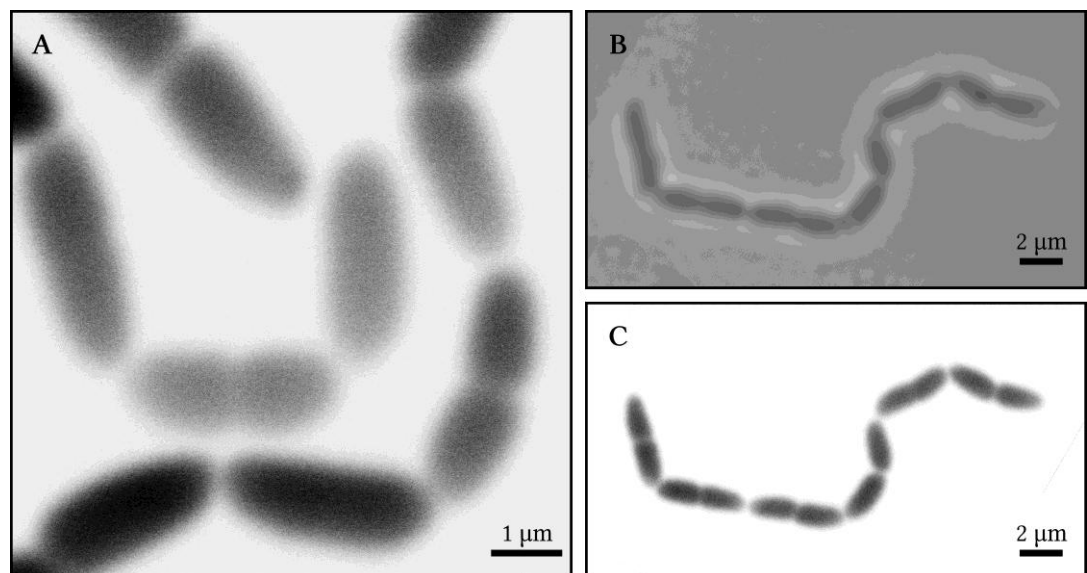
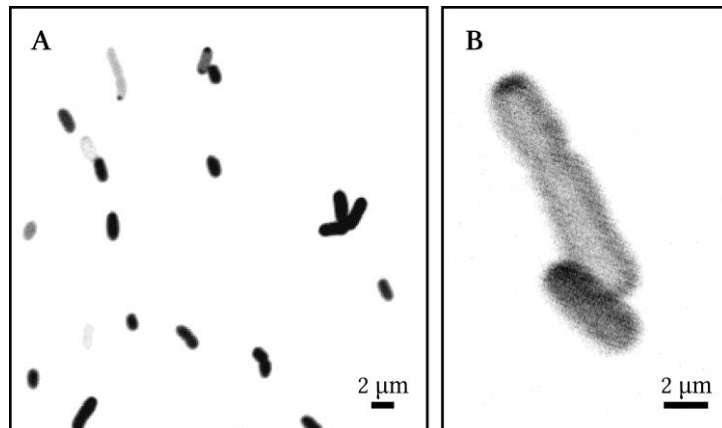


Abb. 19: Die Verteilung von DmsA-SP-GFP in einer Tat-Mutante. Die Fluoreszenzverteilung von GFP, das mit einem *DmsA*-Signalpeptid fusioniert wurde, änderte sich drastisch, wenn man anstatt des Wildtyps einen Stamm verwendete, dem mindestens eine oder in diesem Fall alle Tat-Komponenten fehlten. Gezeigt ist der Stamm DADE pTB-DG. Bild B ist eine DIC-Aufnahme der Zellkette in Bild C.

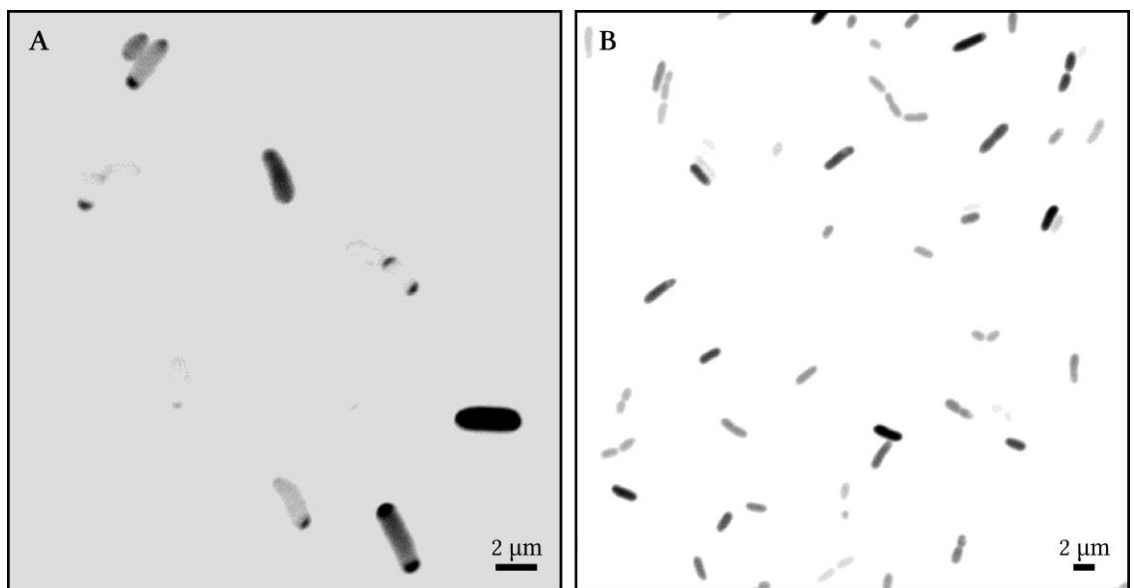
Wenn man das Experiment in Stämmen wiederholte, denen eine oder alle Tat-Komponenten fehlten, dann änderte sich das Bild völlig (s. Abb. 19). Es waren trotz vergleichbarer Fluoreszenzintensität keine Konzentrationen der Fluoreszenz, keine *spots*, in

den langen Zellketten auffindbar. Die Tat-Komponenten sind anscheinend essentiell für diese auffällige, polare Lokalisierung.



**Abb. 20: Fluoreszenz von DmsA-SP-GFP in einer 3 h-Kultur.** Der verwendete Stamm war ein MC4100 pTB-DG. Es handelt sich hierbei im Unterschied zu Abb. 18 um eine Kultur, die 1:10 aus einer ÜNK angeimpft und dann nur 3 h schüttelnd bei 37°C inkubiert wurde.

Weniger eindeutig war der Unterschied, wenn man Zellen verglich, die nur wenige Stunden gewachsen waren (Abb. 20). Hier war die Anzahl der Zellen mit eindeutig polaren Ansammlungen sehr viel geringer. Viele Zellen sahen eher aus wie Zellen ohne Tat-System (wie in Abb. 19). Das kann aber auch daran liegen, dass rein membranständige Fluoreszenz schwerer zu detektieren ist, weil die Dicke des optischen „Schnittes“ im LSM dazu sehr gering sein muss. Es kann also sein, dass nach 3 h ein großer Teil der Zellen neben cytoplasmatischer Fluoreszenz auch membranständige Fluoreszenz zeigte.



**Abb. 21: Vergleich von DmsA-SP-GFP mit und ohne Tat-Signalpeptid.** Das linke Bild A zeigt eine ÜNK des Stammes MC4100 pTB-DG, während das rechte Bild B mit einer ÜNK des Stammes MC4100 pTB-DG-KK entstand. Einziger Unterschied ist das mutierte Tat-Signalpeptid in Bild B.

Wenn man anstatt des Tat-Systems das Tat-Signalpeptid so änderte, dass es nicht mehr vom Translokton erkannt wurde, dann zeigten selbst die Zellen des Wildtypstammes MC4100 keinerlei fluoreszierende Punkte (s. Abb. 21). Es wurde das Substrat DmsA-SP-GFP-KK mit zwei Lysinen an Stelle der Arginine im Signalpeptid verwendet. Das entsprechende Plasmid wurde pTB-DG-KK genannt. Die Mutation im Signalpeptid führte, wie auch die Tat-Deletionsmutante, zu einer gleichmäßigen Verteilung der Fluoreszenz unter allen Bedingungen, also selbst in einer ÜNK (Abb. 21 B).

Um so gut wie möglich ausschließen zu können, dass die polaren Punkte von DmsA-SP-GFP durch unspezifische Aggregationen ausgelöst worden waren, wurde versucht, die eventuellen Aggregationen elektronenmikroskopisch sichtbar zu machen. Dazu wurde der Stamm MC4100 pABS-*tatABC* pTB-DG HPF-cryofixiert und untersucht. Es waren aber keinerlei auffällige Bereiche an den Polen zu finden, die den polaren Signalen hätten entsprechen können (nicht gezeigt).

### 3.2.1.1 EINFLUSS DES MIN-SYSTEMS AUF DIE LOKALISATION VON TAT-SUBSTRATEN

Um mehr über die Gründe für die signalpeptid- und Tat-abhängigen Konzentrationen an den Zellpolen zu erfahren, wurde die Lokalisation des Fusionsproteins DmsA-SP-GFP auch im Stamm JW1165:: $\Delta$ *minC* getestet, dem ein funktionierendes Min-System fehlt (s. a. Abschnitt 1.3.1 ab S. 14). Interessanterweise hatte das Fehlen von MinC keinerlei Einfluss auf die polaren Flecken (Abb. 22). Hin und wieder fand man auch die namengebenden Minizellen, die bei fehlendem Min-System auftreten.

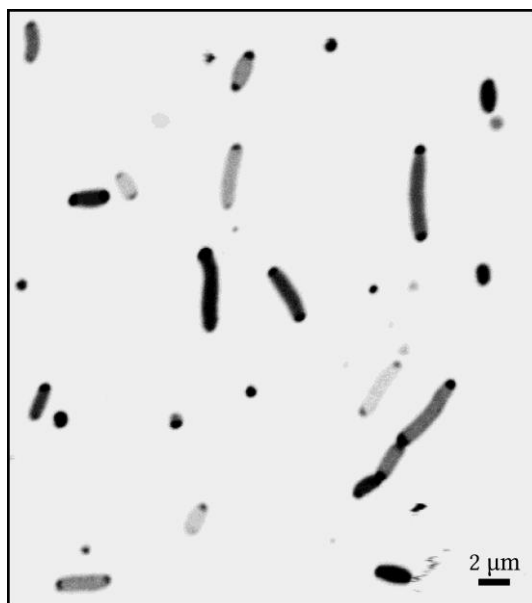
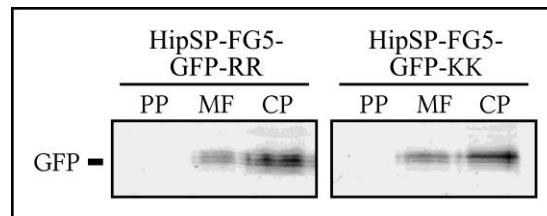


Abb. 22: Polare Flecken in einer *minC*-Deletionsmutante. Auch eine Deletionsmutante, der MinC fehlte (JW1165), zeigte die gleichen polaren Flecken von DmsA-SP-GFP-Fluoreszenz wie die Zellen mit MinC (s. Abb. 18). Es handelte sich hier ebenfalls um eine ÜNK.



Das Protein HipSP-FG5-GFP-RR hat die Eigenschaft, zwar vom Tat-Translokation erkannt, aber nicht transportiert zu werden (RICHTER, 2009). Das ist umso verwunderlicher, als sowohl ein GFP mit Signalpeptid ohne die fünf FG-repeats (s. Abschnitt 3.2.1) als auch ein Fusionsprotein aus Amidase AmiA und GFP (BERNHARDT und DE BOER, 2003), das fast 150 Aminosäuren länger ist als HipSP-FG5-GFP-RR, transportiert wurden. Die fünf ungefalteten FG-repeats in Kombination mit dem GFP verhinderten jedoch jeden Transport ins Periplasma (s. Abb. 24).



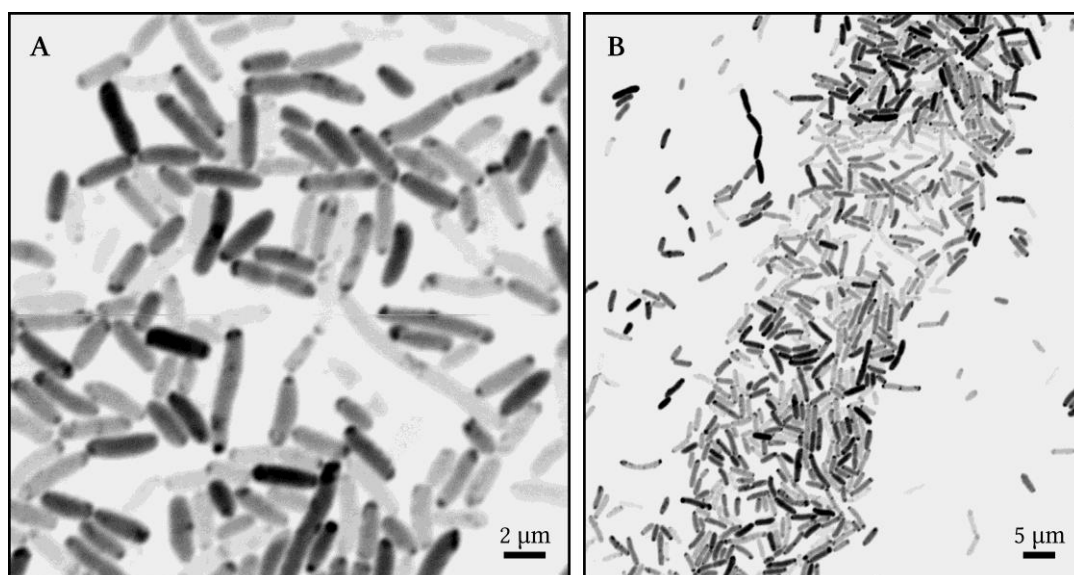
**Abb. 24:** Das Fusionsprotein HipSP-FG5-GFP wird nicht ins Periplasma transloziert. Die Abbildung zeigt ein SDS-Gel, auf das jeweils die Periplasma- (PP), Membran- (MF) und Cytoplasmafraktionen (CP) der Stämme MC4100 pABS-*tatABC* pBW-*hip*<sup>SP</sup>-*nspR5-gfp*-RR und der KK-Variante MC4100 pABS-*tatABC* pBW-*hip*<sup>SP</sup>-*nspR5-gfp*-KK aufgetragen wurden. Die Fluoreszenz des GFP wurde direkt im nicht durch Hitze denaturierten SDS-Gel mit Hilfe eines ‚Storm™ 840‘ Fluoreszenz-Imagers detektiert. Deutlich zu erkennen sind Signale im Cytoplasma und in der Membranfraktion, aber nicht im Periplasma.

### 3.2.2.2 DIE LOKALISATION VON HIPSP-FG5-GFP-RR

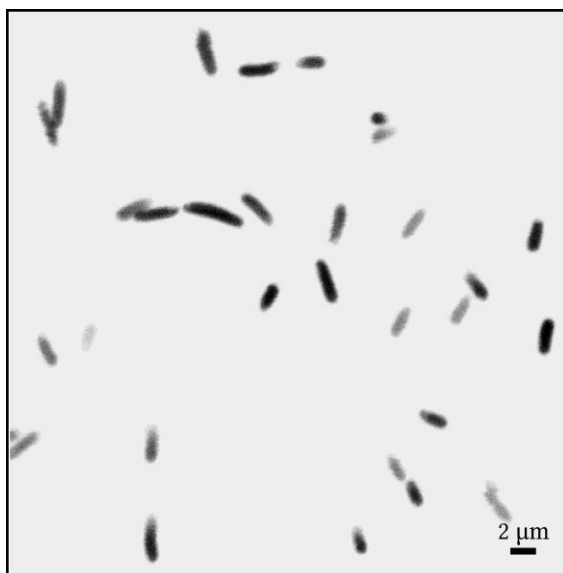
Die Tatsache, dass HipSP-FG5-GFP-RR zwar an das Translokation bindet, aber nicht transportiert wird, macht es ideal zur Lokalisation aktiver Translokation. Und tatsächlich: wenn *hip*<sup>SP</sup>-*nspR5-gfp* und *tatABC* im Stamm MC4100 exprimiert wurden, sah man in einer Vielzahl von Zellen klar definierte Punkte, die sich nahezu immer an den Polen befanden (s. Abb. 25).

Diese polaren Punkte waren sehr deutlich erkennbar, auch wenn die Zellen insgesamt leuchteten. Letzteres ist ein Hinweis darauf, dass noch ein Anteil von ungebundenem und frei im Cytoplasma diffundierendem Protein vorlag.

Um zu kontrollieren, ob die punktförmigen Aggregationen vielleicht durch die Überexpression des Fusionsproteins oder allein schon durch die Anwesenheit des GFP hervorgerufen wurden, führten wir einen identischen Versuch mit einem leicht modifizierten Fusionsprotein durch. In diesem Fall waren die zwei Arginine des HiPIP-Signalpeptids durch zwei Lysine ersetzt worden (RICHTER *et al.*, 2007). Nur diese beiden Austausche bewirkten, dass mit dem HipSP-FG5-GFP-KK keinerlei polare Punkte oder überhaupt irgendwelche Foci innerhalb der Zelle erkennbar waren (s. Abb. 26).



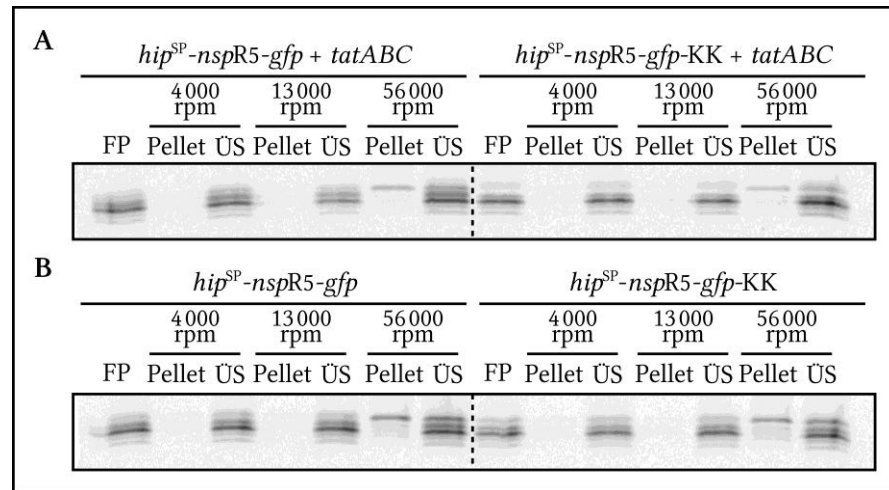
**Abb. 25: Fluoreszenz von HipSP-FG5-GFP-RR.** Der Stamm ist der MC4100 pABS-*tatABC* pBW-*hip<sup>SP</sup>-nspR5-gfp*. In Zellen, die die drei Tat-Komponenten *tatA*, *tatB* und *tatC* überexprimieren, konzentriert sich ein beträchtlicher Teil der Fluoreszenz des transportinkompetenten Fusionsproteins an den Zellpolen. Die Zellen entstammen einer Kultur, die 1:10 aus einer ÜNK angeimpft und dann 3 h in Gegenwart von 0,01% (w/v) Rhamnose inkubiert wurde.



**Abb. 26: Fluoreszenz von HipSP-FG5-GFP-KK.** Der Stamm ist der MC4100 pABS-*tatABC* pBW-*hip<sup>SP</sup>-nspR5-gfp-KK*. Der einzige Unterschied zu den Zellen in Abb. 25 besteht darin, dass das Signalpeptid durch Austausch der beiden Arginine so verändert wurde, dass es nicht mehr vom Tat-System akzeptiert wurde. Auch diese Zellen entstammen einer Kultur, die 1:10 aus einer ÜNK angeimpft und dann 3 h in Gegenwart von 0,01% (w/v) Rhamnose inkubiert wurde.

Das war umso verwunderlicher, weil sich die Unterschiede zwischen HipSP-FG5-GFP-KK und HipSP-FG5-GFP-RR trotz einiger Anläufe nicht biochemisch fassen ließen. Wenn man Zellen, die eines der beiden Proteine bildeten, aufschloss, stärker werdenden Zentrifugationsschritten unterwarf und schließlich die zur Erhaltung der Fluoreszenz nur leicht erwärmten Proben auf ein SDS-Gel auftrug (s. Abschnitt 2.4.5), dann fiel auf, dass sich beide Proteine in ihrem Sedimentationsverhalten sehr glichen (Abb. 27). Es machte auch keinen Unterschied, ob *tatABC* überexprimiert wurde oder nicht. In allen vier Fällen erhielt man eine Sedimentationsbande erst nach 30 min bei 130 000 x g (ent-

spricht 56 000 rpm). Da Abb. 27 keinen Western Blot zeigt, sondern direkt die Fluoreszenz im ‚Storm™ 840‘ Fluoreszenz-Imager gemessen wurde, heißt das, dass die fluoreszierenden Proteine keine *inclusion bodies* gebildet haben, sondern das Protein immer löslich geblieben ist. Dies ist ein wichtiger Hinweis darauf, dass die beobachteten Punkte in Abb. 25 tatsächlich durch eine Interaktion mit den Tat-Komponenten entstanden und nicht durch eine zufällig polare Aggregation des Fusionsproteins hervorgerufen wurden.



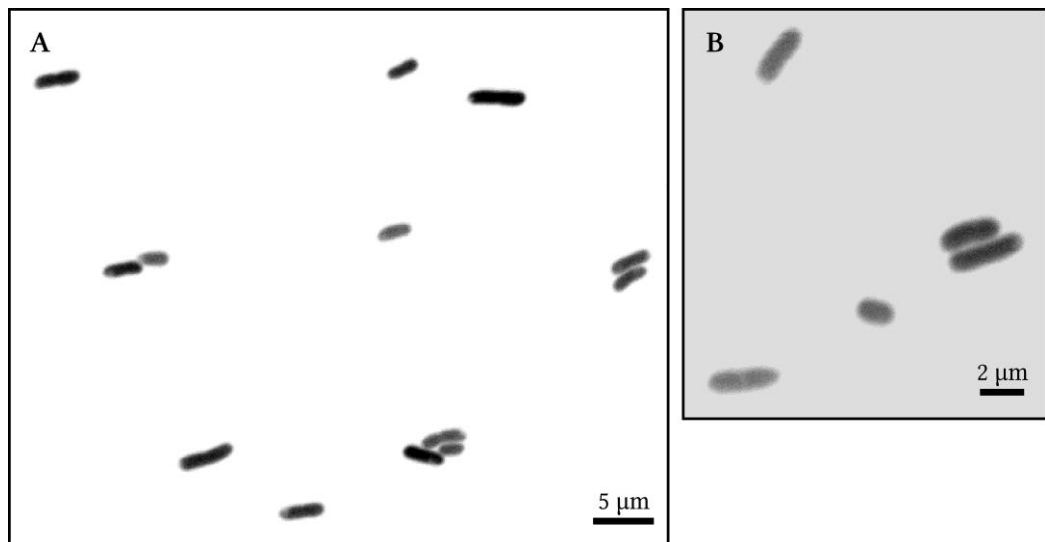
**Abb. 27: Vergleich des Sedimentationsverhaltens von HipSP-FG5-GFP-RR und der KK-Variante.** Zellen der Stämme MC4100 pABS-*tatABC* pBW-*hip<sup>SP</sup>-nspR5-gfp* und MC4100 pABS-*tatABC* pBW-*hip<sup>SP</sup>-nspR5-gfp-KK* (beide A) und MC4100 pABS pBW-*hip<sup>SP</sup>-nspR5-gfp* und MC4100 pABS pBW-*hip<sup>SP</sup>-nspR5-gfp-KK* (beide B) wurden geerntet (vorher 3 h mit 0,01% (w/v) Rhamnose induziert), durch zwei French Press-Passagen aufgeschlossen und dann drei Zentrifugations-schritten unterworfen (4 000, 13 000 und 56 000 rpm). Nach jedem Schritt wurden Proben des Überstandes (ÜS) und des resuspendierten Pellets (Pellet) genommen. Zusätzlich wurde eine Probe direkt nach der French Press-Behandlung aufbewahrt (FP). Die Fluoreszenz der SDS-PAGE-Gele, auf die die nur leicht erhitzten Proben aufgetragen worden waren, wurden nach der Gelelektrophorese direkt in einem ‚Storm™ 840‘ Fluoreszenz-Imager ausgewertet. In A und B ist links jeweils HipSP-FG5-GFP-RR und rechts die KK-Variante gezeigt. In A wurde *tatABC* co-exprimiert, in B nicht.

### 3.2.2.3 LOKALISATION VON HIPSP-FG5-GFP-RR OHNE ÜBEREXPRESSION ALLER TAT-KOMPONENTEN

Wenn man die beiden Experimente wiederholte, ohne *tatABC* zu überexprimieren, sahen die Zellen gleich aus. Eine Überexpression der Tat-Komponenten war also notwendig, um Fusionsproteine mit RR- und KK-Signalpeptiden mikroskopisch unterscheiden zu können. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass der Anteil des gebundenen Fusionsproteins abnimmt, je weniger Translokons für eine Interaktion zur Verfügung stehen. Wenn *tatABC* nicht co-exprimiert wurde, verschob sich das Verhältnis von gebundenem und freiem HipSP-FG5-GFP-RR in Richtung des freien Fusionsproteins. Dieses überstrahlte dann im LSM die Signale des gebundenen Proteins (s. Abb. 28).

Um das Verhältnis von gebundenem und freiem HipSP-FG5-GFP-RR umzukehren und damit eventuell auch unter wildtyp-ähnlicheren Bedingungen eine Lokalisierung zu er-

möglichen, wurde versucht, im Wildtypstamm MC4100 ohne Überexpression der Tat-Komponenten allein durch Variation der Rhamnose-Konzentration die Menge an Substrat möglichst gering zu halten. Es bestand die Hoffnung, dass ab einer gewissen niedrigen Konzentration wieder Punkte auftreten würden. Obwohl diese Vermutung zuerst gestützt wurde durch die Tatsache, dass eine geringere Konzentration von Rhamnose die polaren Punkte bei gleichzeitiger Überexpression von *tatABC* wie in Abb. 25 deutlicher werden ließ, konnte sie am Ende nicht bestätigt werden.



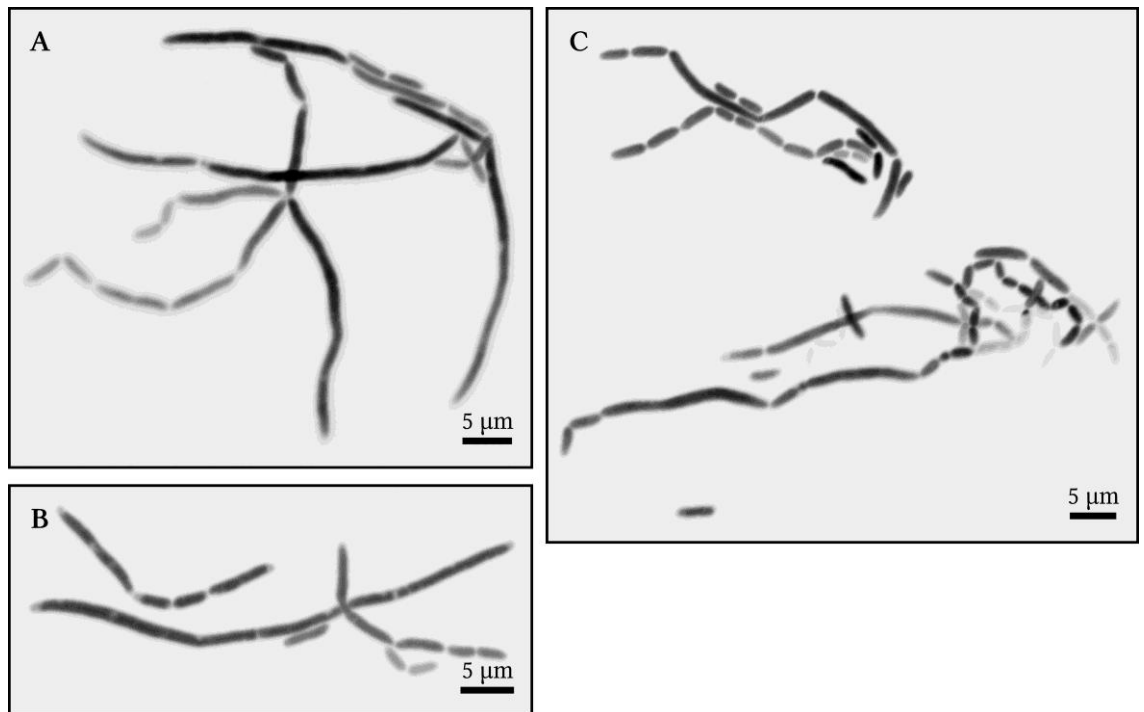
**Abb. 28: Fluoreszenz von HipSP-FG5-GFP-RR ohne *tatABC*-Überexpression.** Der hier gezeigte Stamm ist ein MC4100 pBW-*hip*<sup>SP</sup>-*nspR5-gfp*. Bei Bild A wurden die Zellen mit 0,1% (w/v) Rhamnose, bei Bild B mit 0,01% (w/v) Rhamnose induziert. In beiden Fällen scheint die Fluoreszenz sehr gleichmäßig verteilt aus dem Cytoplasma zu kommen. Man erkennt keine Punkte oder anderen Merkmale.

Selbst bis zu einer Konzentration von 0,00001% (w/v) Rhamnose waren ohne Überexpression von *tatABC* keine einzelnen Punkte auszumachen. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Zellen bei solch geringen Konzentrationen natürlich extrem schwach fluoreszierten und daher die Qualität der Aufnahmen wegen des ungünstigeren Rausch-Signal-Verhältnisses so schlecht wurde, dass es fraglich ist, ob noch eventuell vorhandene Punkte verlässlich erkennbar gewesen wären (Bilder deswegen nicht gezeigt).

Schon das Weglassen einzelner Tat-Komponenten führte nicht mehr zu der punktförmigen Fluoreszenzverteilung, die man bei Überexpression von *tatABC* beobachten konnte (s. Abb. 29). Getestet wurden drei verschiedene Stämme, die ausschließlich *tatA*, *tatAB* bzw. *tatAC* exprimierten. Bezogen auf die Verteilung der Fluoreszenz von HipSP-FG5-GFP sahen die Zellen aus wie Zellen ohne *tatABC*-Überexpression (s. Abb. 28) bzw. wie Zellen, die das Substrat HipSP-FG5-GFP-KK (mit mutiertem Signalpeptid) enthielten. Allerdings fällt auf, dass die Zellen nicht nur Ketten bildeten, wie bei einer fehlenden Tat-Komponente und dem damit einhergehenden Kettenphänotyp zu erwarten ge-



wesen wäre, sondern teilweise auch außergewöhnlich lang waren – eine Beobachtung, die sich später wiederholen sollte (mehr dazu im Abschnitt 3.3.10 auf S. 86). Erst die Co-Expression von *tatABC* im DADE führte zu einem normalen Wachstum der Zellen und auch wieder zu polaren Konzentrationen der Fluoreszenz (nicht gezeigt).



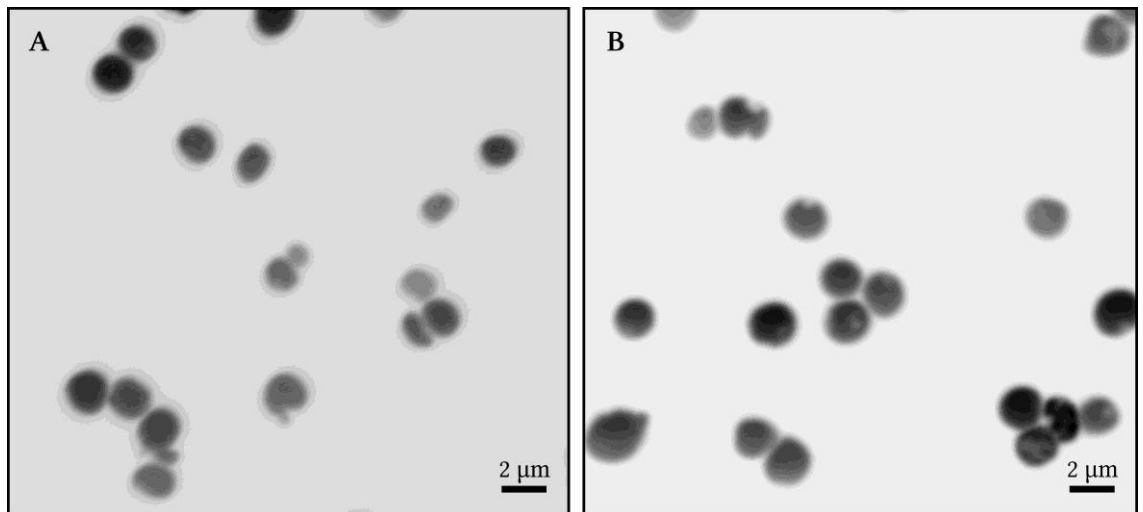
**Abb. 29: Fluoreszenz von HipSP-FG5-GFP-RR bei gleichzeitiger Überexpression ausgewählter Tat-Komponenten.** Oben werden drei verschiedene Stämme gezeigt. Alle drei beruhen auf dem Stamm DADE ( $\Delta tatABCDE$ ) pBW-*hip<sup>SP</sup>-nspR5-gfp*. In Bild A wurde zusätzlich *tatA* (pABS-*tatA*), in Bild B zusätzlich *tatAB* (pABS-*tatAB*) und in Bild C zusätzlich *tatAC* (pABS-*tatAC*) exprimiert. Alle Stämme wurden vor dem Aufnehmen dieser Bilder für 3 h mit 0,1% (w/v) Rhamnose induziert.

#### 3.2.2.4 DER EINFLUSS VON MREB AUF DIE SUBSTRATLOKALISATION

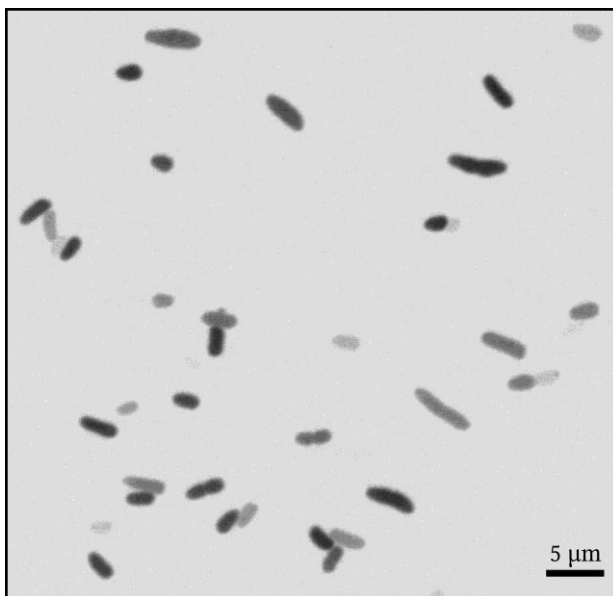
Eine Deletion von MreB hatte nicht nur einen starken Einfluss auf die Zellform (s. a. Abschnitt 3.1.2.1 auf S. 55), sondern auch auf die Verteilung von HipSP-FG5-GFP-RR (s. Abb. 30). Es waren im Gegensatz zu den Zellen mit MreB keine Konzentrationen von Fluoreszenz detektierbar und die gesamte Fluoreszenz schien aus dem Cytoplasma zu kommen, wobei es keinen Unterschied machte, ob HipSP-FG5-GFP-RR oder HipSP-FG5-GFP-KK untersucht wurden.

Der Versuch, das fehlende MreB zu komplementieren, scheiterte. Zwar zeigte der Stamm MC1000 $\Delta mreB$  pABS-*tatABC-mreBCD* pBW-*hip<sup>SP</sup>-nspR5-gfp* eine nahezu normale Zellmorphologie, aber auffällige Fluoreszenzpunkte waren trotz intensiver Suche nicht zu finden (Abb. 31). Dies ist jedoch nicht zwingend ein Gegenbeweis für die Annahme, dass MreB eine Rolle bei der Bildung der polaren Fluoreszenzpunkte spielt, denn aus *Caulobacter crescentus* ist bekannt, dass sowohl die Deletion als auch eine Überex-

pression von *mreB* die polare Lokalisierung von MreB-abhängigen Proteinen stört (ALLARD und RUTENBERG, 2007). Es kann also sein, dass der von uns gewählte MreB-Level zu hoch war.



**Abb. 30: Fluoreszenz von HipSP-FG5-GFP-RR in einem Stamm ohne MreB.** Die hier gezeigten Zellen sind Zellen des Stammes MC1000 $\Delta$ *mreB* pABS-*tatABC* pBW-*hip*<sup>SP</sup>-*nspR5-gfp* (Bild A) bzw. MC1000 $\Delta$ *mreB* pABS-*tatABC* pBW-*hip*<sup>SP</sup>-*nspR5-gfp*-KK (mit den oben schon erwähnten KK-Austauschen im Signalpeptid (s. Abb. 26)) im Fall von Bild B. Beide Zellkulturen wurden für 3 h mit 0,1% (w/v) Rhamnose induziert. Deutlich ist die abnorme, runde Zellform zu erkennen.

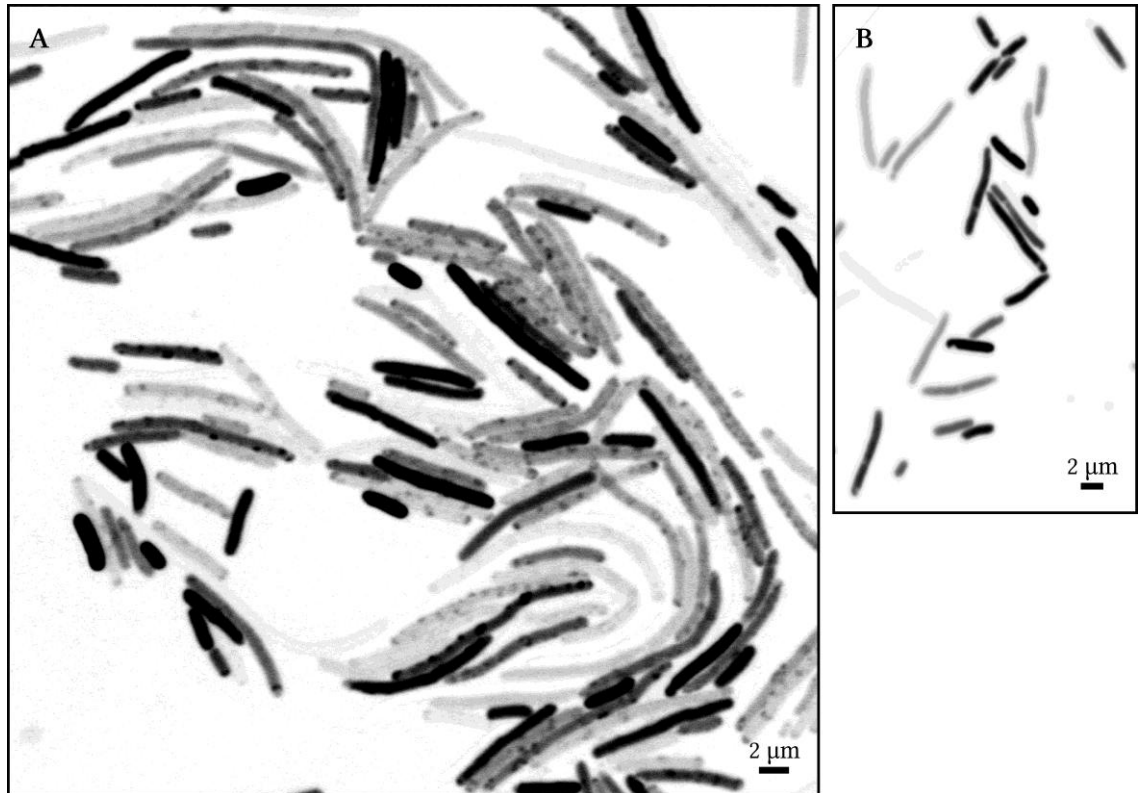


**Abb. 31: Teilweise Komplementation der MreB-Mutante.** Im Stamm ohne MreB MC1000 $\Delta$ *mreB* pABS-*tatABC-mreBCD* pBW-*hip*<sup>SP</sup>-*nspR5-gfp* kann man von einer normalen Zellmorphologie sprechen. Der gezeigte Stamm wurde für 3 h mit 0,01% (w/v) Rhamnose induziert.

### 3.2.2.5 DER EINFLUSS DES MIN-SYSTEMS AUF DIE SUBSTRATLOKALISATION

Ebenso wie MreB hatte auch das Min-System einen Einfluss sowohl auf die Zellmorphologie als auch auf die Lokalisation der Tat-Substrate. Da das Min-System in *E. coli* für die

Septumbildung und -lokalisierung verantwortlich ist und somit eine gänzlich andere Funktion erfüllt als MreB, ist auch der Einfluss auf die Zellform dementsprechend anders.



**Abb. 32: HipSP-FG5-GFP-RR in einem Stamm ohne funktionierendes Min-System.** Bild A zeigt den  $\Delta minCDE$ -Stamm PB114 pABS-*tatABC* pBW-*hip<sup>SP</sup>-nspR5-gfp*, Bild B hingegen die KK-Variante PB114 pABS-*tatABC* pBW-*hip<sup>SP</sup>-nspR5-gfp*-KK. Während bei der RR-Variante viele Punkte in oft gleichmäßigen Abständen erkennbar sind, zeigt Bild B nur eine gleichmäßige Verteilung ohne punktuelle Konzentrationen. Die Zellen wurden in beiden Fällen für 3 h bei 37°C kultiviert und mit 0,1% (w/v) Rhamnose induziert.

So bildete der Stamm PB114 ( $\Delta minCDE$ ) lange schlauchartige sowie winzige Mini-Zellen, da sich diese nicht mehr korrekt teilen konnten. Ebenfalls in *E. coli* wurde von JANAKIRAMAN und GOLDBERG, 2004 der polar lokalisierte Autotransporter IcsA (BRANDON *et al.*, 2003) an GFP gekoppelt und in dem Stamm PB114 untersucht. Dabei waren innerhalb der Zellschläuche nicht nur an den Polen, sondern auch an den verhin-derten zukünftigen Zellpolen viele einzelne Punkte erkennbar. Ähnliches konnte man auch für das Fusionsprotein HipSP-FG5-GFP-RR erwarten, wenn für die polare Verteilung tatsächlich die Interaktion mit polaren Translokons ursächlich wäre. Und tatsächlich: wenn sowohl *tatABC* als auch *hip<sup>SP</sup>-nspR5-gfp* in der *minCDE*-Mutante PB114 exprimiert wurden, erhielt man lange Zellschläuche mit einer Vielzahl von Punkten (Abb. 32 A). Ins Auge fällt neben den fluoreszierenden Punkten die Tatsache, dass ein Teil der Zellen so stark fluoreszierte, dass ihre Fluoreszenz kontrastlos erschien und die

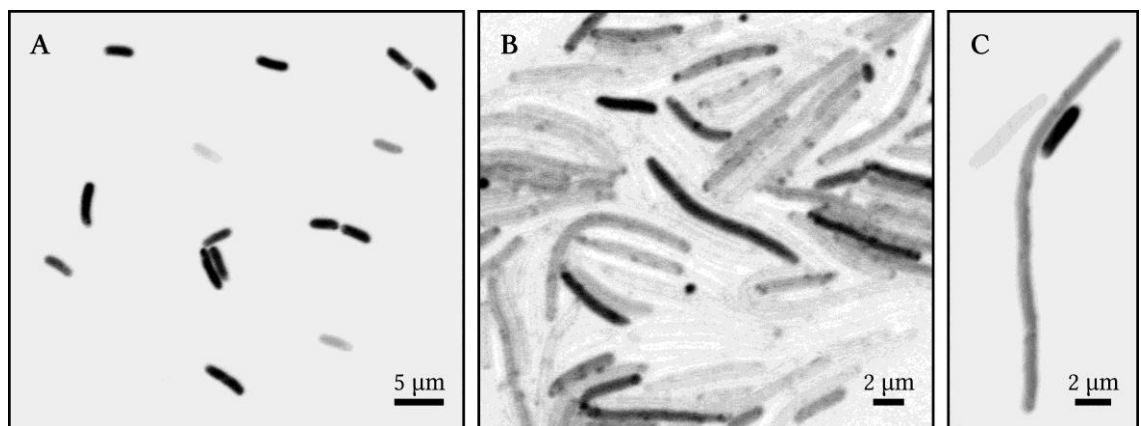
anderen Zellen überstrahlte (im Umkehrbild schwarz). Woran das lag, kann nur gemutmaßt werden. Die wahrscheinlichste Erklärung aber ist ein unterschiedliches Verhältnis der beiden enthaltenen Plasmide.

Ein identischer Stamm mit mutiertem Signalpeptid im Fusionsprotein (PB114 pABS-*tatABC* pBW-*hip*<sup>SP</sup>-*nspR5-gfp*-KK) zeigte keinerlei auffällige Verteilung der Fluoreszenz (Abb. 32 B).

Der Versuch einer Komplementation analog zu den Versuchen mit MreB (s. Abschnitt 3.2.2.4) schlug fehl, da eine Expression von *minCDE* im Stamm PB114 nicht zu einem normalen Wachstumsphänotyp führte.

### 3.2.2.6 DIE LOKALISATION VON HIPSP-FG5-GFP-RR IST BEEINFLUSSBAR DURCH DAS PROTONOPHOR CCCP

Carbonylcyanid-3-Chlorophenylhydrazon (CCCP) ist eine schwache Base und ein Protonophor, das das Membranpotential und damit auch den Protonengradienten aufhebt. Da das Tat-System in der Regel abhängig ist vom Protonengradienten, ist es sensitiv gegenüber Entkopplern wie CCCP (WIEGERT *et al.*, 1996 und SANTINI *et al.*, 1998). Die Verteilung von HipSP-FG5-GFP-RR in der Zelle sollte sich also eventuell auch mit der Zugabe von CCCP ändern, wenn ein aktives Tat-System für die Bildung der polaren Punkte Voraussetzung ist.



**Abb. 33: Der Einfluss von CCCP auf HipSP-FG5-GFP-RR.** Bild A zeigt den Stamm MC4100 pABS-*tatABC* pBW-*hip*<sup>SP</sup>-*nspR5-gfp* nach einer Inkubation mit 100 mM CCCP für 15 min. Es sind keine Punkte erkennbar. Die Bilder B und C vergleichen den  $\Delta$ *minCDE*-Stamm PB114 pABS-*tatABC* pBW-*hip*<sup>SP</sup>-*nspR5-gfp* vor (Bild B) und nach einer 10-minütigen CCCP-Behandlung (ebenfalls mit 100 mM) (Bild C). Während in Bild B noch viele kleine Punkte zu erkennen sind (s. a. Abschnitt 3.2.2.5), sind diese nach 10 min (Bild C) fast gänzlich verschwunden. Die Kultivierungsbedingungen (3 h / 37°C / 1:10 aus einer ÜNK) waren ebenso wie die L-Arabinose-Konzentrationen (0,1% (w/v)) in allen Fällen gleich.

Auch hier traf die Vorhersage ein: wenn man zu 3 h lang gewachsenen Kulturen 100 mM CCCP zugab, verschwanden die Punkte zwar nicht sofort, aber nach einigen Minuten (s. Abb. 33). Dass die fluoreszierenden Punkte sich nicht schneller auflösten,

liegt eventuell daran, dass sich die Substrate vielleicht nur langsam von den Translokons lösen und sich das Gleichgewicht zwischen gebundenem und ungebundenem Substrat deshalb mit einiger Verzögerung zu Gunsten der ungebundenen Variante verschiebt.

### 3.3 ÜBEREXPRIMIERTES TATA ORDNET SICH IN RÖHREN AN

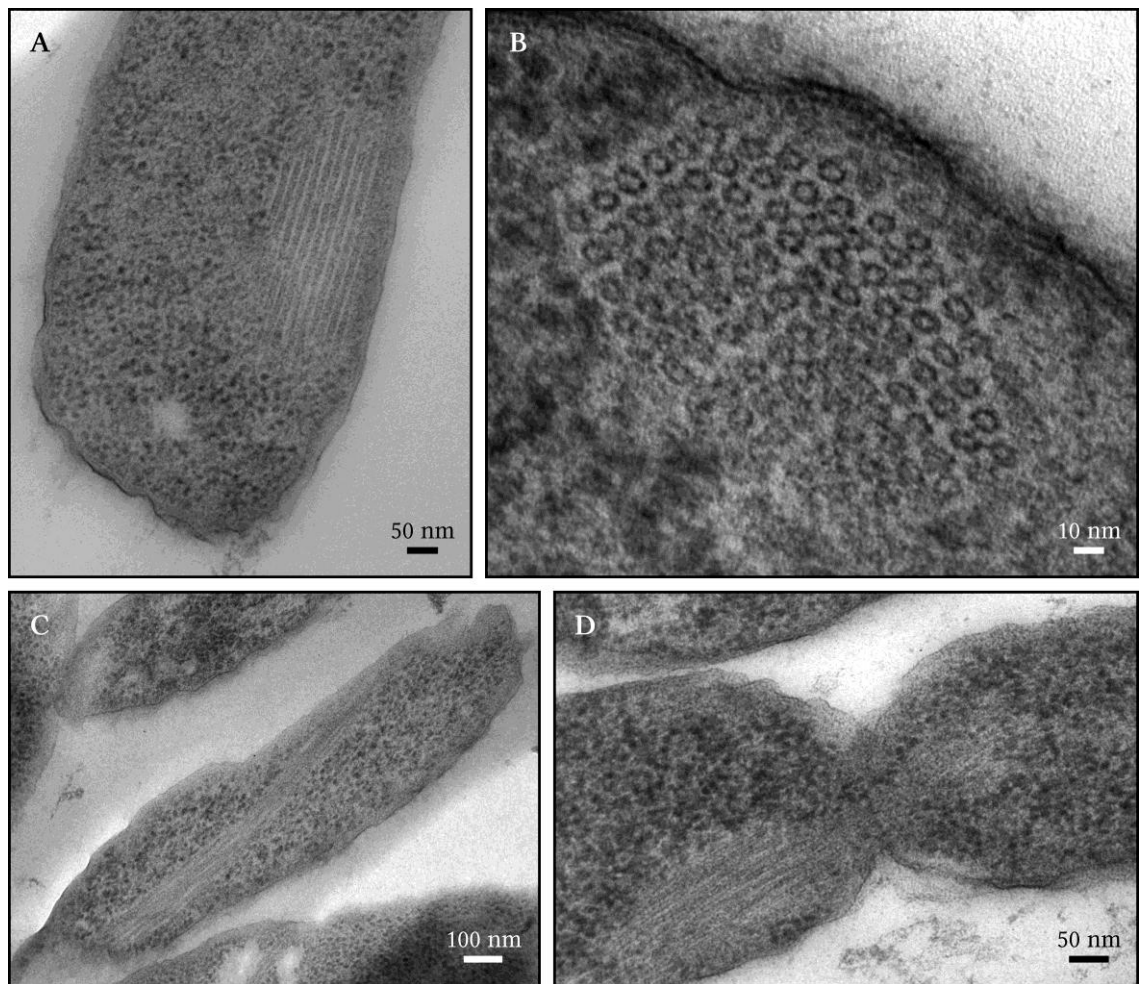
#### 3.3.1 ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE ENTDECKUNG

Wenn man Proteine in Zellen lokalisieren möchte, dann bieten sich eine Vielzahl von Möglichkeiten an. Neben der biochemischen Herangehensweise und der Fusion an fluoreszierende Partner (s. Abschnitte 3.1 und 3.2) ist natürlich die Elektronenmikroskopie die Methode der Wahl, wenn man sehr detaillierte Einblicke in die Zelle gewinnen möchte. Gerade die von uns in Kooperation mit Dr. Gerd Hause vom Biozentrum der Halleschen Universität verwendete *high pressure freeze fixation* (HPF) geht dabei sehr schonend mit den Zellen um und erlaubt es, Strukturen zu untersuchen, die bei einem Zellaufschluss zerfallen würden bzw. die bei einer Fusion an das Protein von Interesse gar nicht erst gebildet würden (s. a. Abschnitt 2.5.3.1).

Alle drei Hauptkomponenten des Tat-Systems sind von Anfang an als membranintegrale Proteine eingeordnet worden. Bei dem Versuch, TatA, TatB und TatC mit der Methode der Immuno-Gold-Markierung intrazellulär zu lokalisieren, stießen wir auf das Problem, dass die Level an Tat-Komponenten nicht hoch genug waren, um Aussagen über ihren Verbleib treffen zu können. So lag es nahe, *tatABC* zu überexprimieren. Wenn man das tat, fand man in den Zellen plötzlich lange, stapelartige Strukturen (Abb. 34 A und C), die teilweise einen großen Teil des Zellvolumens füllten.

In einigen Fällen reichten diese Bündel von einer Zelle bis in benachbarte Tochterzellen (Abb. 34 D). Dies erklärte auch rein mechanisch den schon vorher lichtmikroskopisch festgestellten Befund, dass allein die Überexpression von *tatABC* in geringem Maße einen Kettenphänotyp induzierte (nicht gezeigt). Die langen Strukturen behinderten dabei höchstwahrscheinlich die Zellteilung.

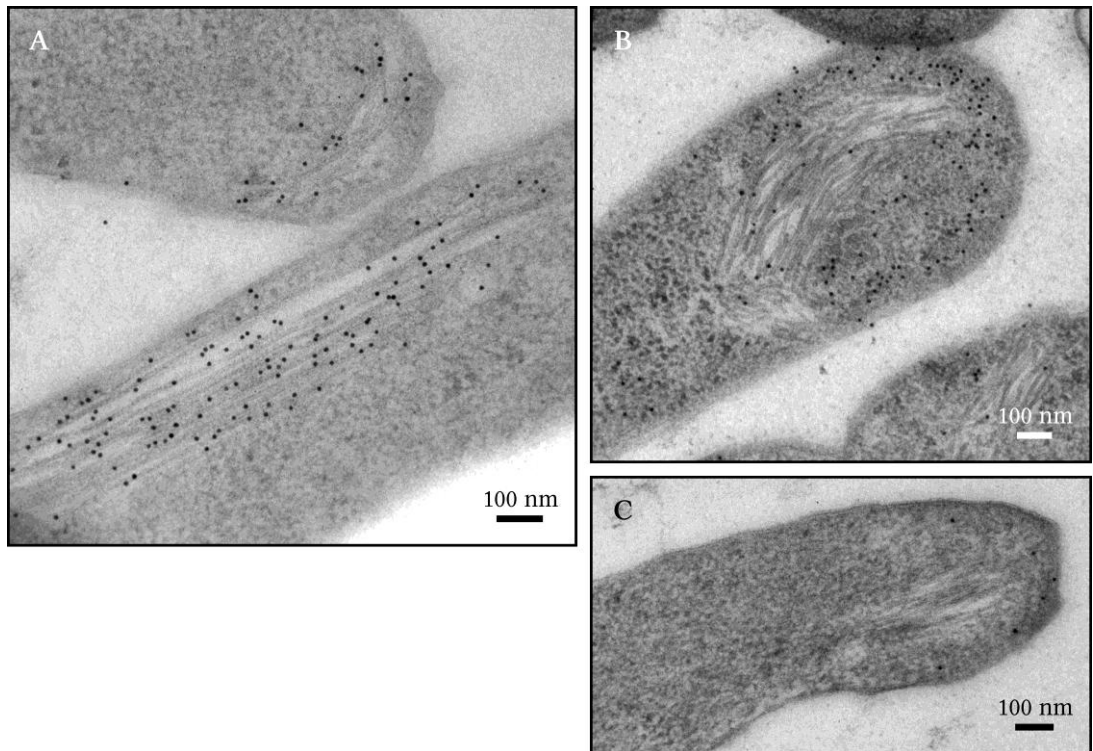
Manchmal fand man noch einen zweiten Typ von Strukturen, und zwar die in Abb. 34 B dargestellten Ringe. Diese waren sehr uniform angeordnet (s. a. Abschnitt 3.3.2). Auf Grund verschiedener Hinweise kann man mit hoher Sicherheit annehmen, dass es sich bei den Stapeln und den Kreisen nur um verschiedene Schnitt-Perspektiven derselben Struktur handelte, nämlich der einer Röhre.



**Abb. 34: Überexpression von *tatABC* führte zu geordneten intrazellulären Röhrenstrukturen im Cytoplasma.** Alle vier Bilder zeigen Stämme, die *tatABC* überexprimieren (pABS-*tatABC*). Bild A ist der Wildtypstamm MC4100, die Bilder B und D zeigen den Stamm JW1297  $\Delta$ *pspA*::Kan. Bild C entstand mit dem Stamm DADE ( $\Delta$ *tatABCDE*). Die verschiedenen Stämme hatten jedoch keinen Einfluss auf das Erscheinungsbild der Strukturen. In jedem Fall fand man längs angeordnete „Stapel“ (A, C und D) bzw. wabenartig angeordnete Ringe (B).

Um in Erfahrung zu bringen, welche von den drei überexprimierten Tat-Komponenten zu den Strukturen beitragen, wurden Immuno-Gold-Markierungen mit Antikörpern gegen TatA, TatB und TatC durchgeführt (Abb. 35). Als die Ergebnisse vorlagen, war sofort klar, dass TatA fast ausschließlich in den Strukturen lokalisiert war (Abb. 35 A sowie Abb. 10). TatB erschien oft in polaren membran-nahen cytoplasmatischen Bereichen (Abb. 35 B sowie Abb. 14 B), war jedoch im Gegensatz zu TatA nicht direkt in den Strukturen lokalisiert. Gleiches galt wahrscheinlich auch für TatC (Abb. 35 C), obwohl das Verhältnis an TatC-Signalen innerhalb der Zellen und auf dem Formvar<sup>®</sup>-Film darauf schließen ließ, dass der TatC-Antikörper sein Epitop nicht gut erkannt hatte. Die Ergebnisse für TatC sind deshalb sehr unsicher. Ich habe sie trotzdem gezeigt, weil davon auszugehen ist, dass TatC erkannt worden wäre, wenn es denn in hoher Konzentration in

den Strukturen vorhanden gewesen wäre. Es erscheint mithin unwahrscheinlich, dass TatC Teil der Strukturen ist.



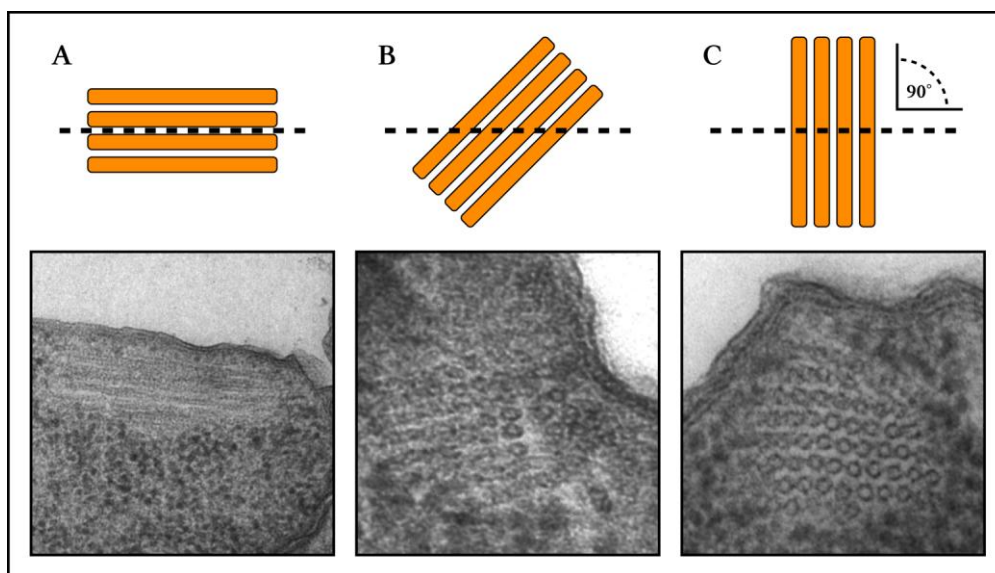
**Abb. 35: Immuno-Gold-Markierungen zeigten, dass die Tat-Strukturen hauptsächlich von TatA gebildet werden.** Alle drei Bilder zeigen den Stamm DADE pABS-*tatABC*, nur die Antikörper, die für die Immuno-Gold-Markierungen eingesetzt wurden, variieren. In Bild A beispielsweise markiert ein Antikörper gegen TatA sehr spezifisch die Strukturen. Ein Antikörper gegen TatB zeigt ein nahezu umgekehrtes Verhalten. TatB ist anscheinend kaum in den Strukturen vorhanden – fast alle Signale kommen von außerhalb (Bild B). In Bild C wurde ein Antikörper gegen TatC verwendet.

Ein weiteres Indiz dafür, dass TatA der Hauptbestandteil der Röhren ist, stellt die Tatsache dar, dass man keine Röhren beobachten konnte in Zellen, die ein mutiertes *tatA* neben *tatB* und *tatC* exprimierten. So waren in einem Stamm, dessen Expressionsprodukt ein auf die amphipathische Helix verkürztes TatA ist (DADE pABS-*tatA-TAA-BC*), keinerlei auffällige Strukturen zu finden (nicht gezeigt).

### 3.3.2 DIE TATA-RÖHREN IM DETAIL

Um zu erklären, warum die TatA-Röhren manchmal wie Stapel aussahen und manchmal kreisförmig waren, muss man sich vergegenwärtigen, dass in der Transmissionselektronenmikroskopie nur ein Schnitt betrachtet wird, der in den gezeigten Fällen bis zu 80 nm „dick“ war (s. a. Abschnitt 2.5.3.1 auf S. 41). Man sieht somit einen Bereich ein, der etwa 10-fach dicker ist als der Durchmesser der Röhren. Wenn man die Röhren zufällig

quer anschneidet, wie in Abb. 36 C, dann sieht man die Kreise nur sauber, wenn der Winkel zwischen Schnittebene und Röhren recht genau  $90^\circ$  beträgt. Wenn der Winkel nur etwas abweicht, wird man die Schrägung sehen und erhält ein verwaschenes Bild, wie in Abb. 36 B. Der Übergang zu einem Längsschnitt (Abb. 36 A) ist dabei fließend.



**Abb. 36:** Schematische Darstellung der möglichen Schnittwinkel der TatA-Röhren. Bild A zeigt Röhren, die längs der Röhrenrichtung geschnitten wurden. Bild C dagegen zeigt Röhren, die mehr oder weniger genau quer geschnitten wurden. Eine der vielen Übergangsformen zwischen A und C stellt B dar. Der Winkel ist hier beispielhaft mit  $45^\circ$  dargestellt, obwohl ein größerer Winkelbereich wahrscheinlich sehr ähnlich aussieht.

Um genauere Aussagen über die Dimensionen der TatA-Röhren machen zu können, wurden die Außendurchmesser von insgesamt 145 Röhren und die Innendurchmesser von 114 Röhren gemessen (Tab. 20). Der durchschnittliche Außendurchmesser lag bei etwa 11,5 nm, während der Innendurchmesser ca. 6,5 nm betrug. Die teilweise erhebliche Abweichung der Maximal- und Minimalwerte vom errechneten Mittelwert erklärt sich durch die geringe Größe der Strukturen, die ein Messen schwierig machten sowie durch leichte Verschiebungen, die während des Schneidens bzw. des Fixierens aufgetreten sein können. Die gewählte Probenzahl sollte jedoch ausreichen, um den Einfluss solcher Fehlerquellen gering zu halten.

Betrachtet man die Kreise in Abb. 34 B, Abb. 36 C oder auch in Abb. 42 B genauer, fällt sofort die exakte Ausrichtung der einzelnen Ringe zueinander auf. Jede Röhre hat nicht nur genau sechs Nachbarn, sondern auch die Abstände zu den jeweiligen Nachbarn sind immer identisch, wodurch sich Symmetrien in mehreren Richtungen ergeben (in Abb. 37 B orange angedeutet). Betrachtet man die Zwischenräume, findet man hin und wieder sogar dünne Linien, die nahelegen, dass es Verbindungen zwischen den einzelnen Röhren gibt (in Abb. 37 B rot markiert; s. a. Abb. 43 B). Auch ist hin und wieder eine eckige Form der gesamten Struktur zu beobachten (in Abb. 37 B schwarz eingerahmt).



Tab. 20: Dimensionen der TatA-Röhren

Wert	Außendurchmesser	Innendurchmesser
Minimum in nm	9,04	4,77
Maximum in nm	15,17	8,70
Probenzahl n	145	114
Standardabweichung	1,24	0,83
Mittelwert in nm	11,45	6,74

Der Versuch, durch eine Rückprojektion<sup>15</sup> – durchgeführt von Dr. Holger Stark vom Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie (Göttingen, Deutschland) – aus einem größeren Datensatz von Röhrenbildern (über 200) ein genaueres Bild der Röhren im Querschnitt zu errechnen, erbrachte trotz hohen Aufwandes keine entscheidende Verbesserung in der Auflösung und damit im Verständnis (deswegen auch nicht gezeigt).

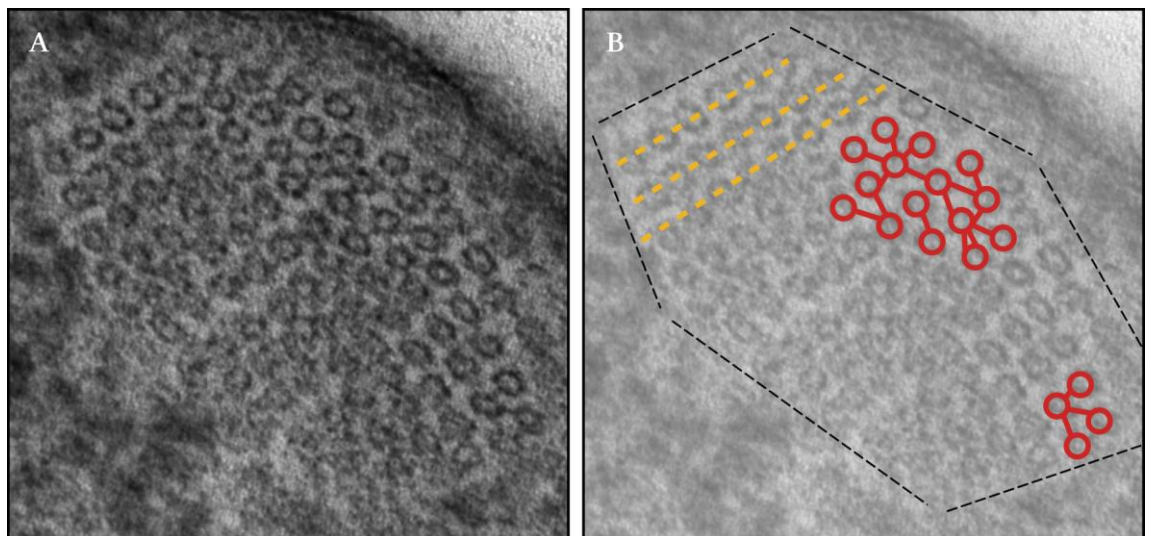


Abb. 37: Schematische Verdeutlichung der Symmetrie und der Verbindungslinien zwischen den TatA-Röhren. Beide Bilder entstanden in dem Stamm JW1297  $\Delta$ pspA::Kan pABS-tatABC. Während Bild A das Original zeigt, ist Bild B ein im gleichen Maßstab gehaltenes Schema, welches auf die Verbindungsbrücken (rot), die geordnete Aneinanderreihung (orange) bzw. auf die sechseckige Gesamtform der Struktur (schwarz) hinweist.

<sup>15</sup> Die Rückprojektion wird auch *filtered back-projection* genannt und ist zusammen mit der Radon-Transformation ein mathematisches Verfahren zum Aufbereiten von computertomografischem bzw. elektronenmikroskopischem Bildmaterial. Es ist mit diesem Verfahren prinzipiell möglich, aus einem möglichst großen Datensatz ähnlicher Bilder ein einzelnes Bild mit einer höheren Auflösung zu errechnen.

### 3.3.3 GEREINIGTES TATA KANN ALLEIN RÖHREN BILDEN

Wenn man Proteine mit Hilfe einer Affinitätsäule reinigt und die resultierende Proteinlösung einer TEM Fixiermethode wie dem *negative staining* (s. Abschnitt 2.5.3.2) unterzieht, kann man die Proteine und ihre Komplexe in der Lösung direkt sichtbar machen.

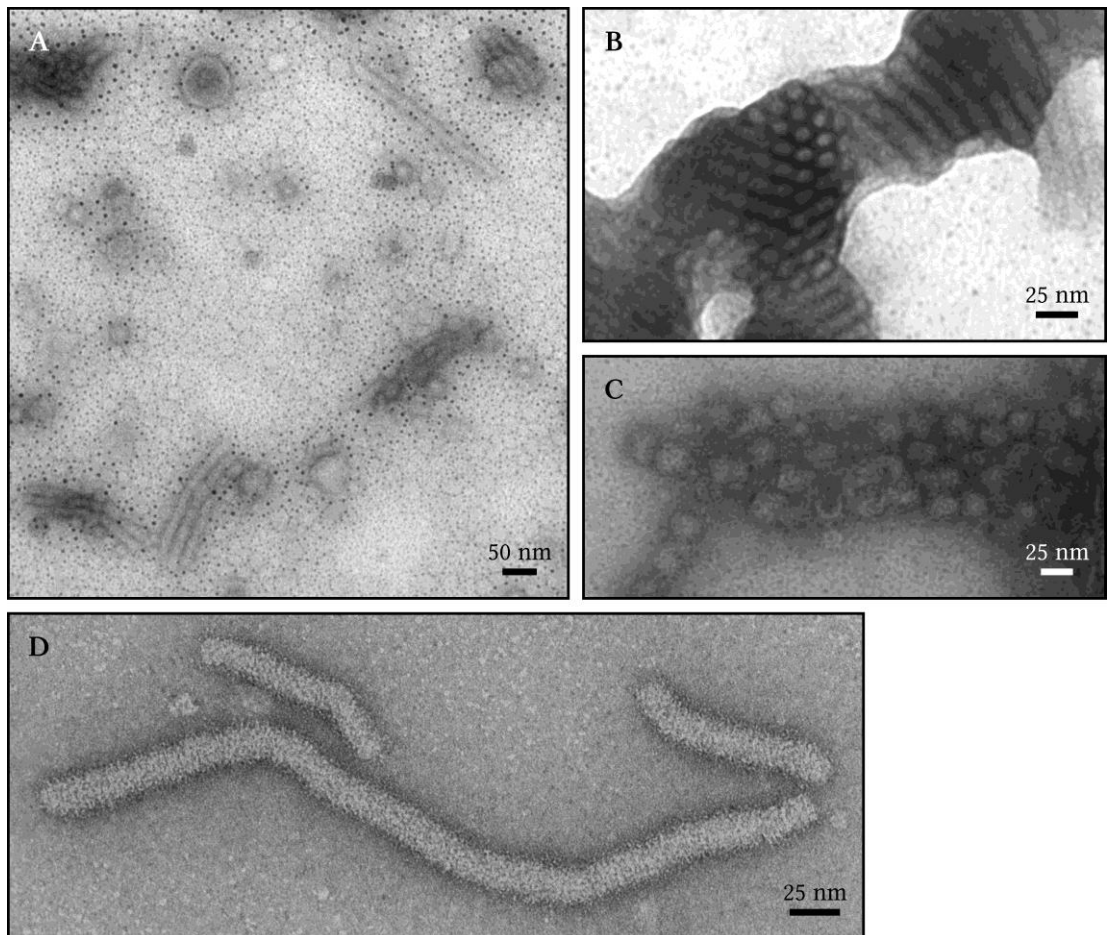


Abb. 38: *Negative stains* von gereinigtem TatA aus einem Stamm ohne weitere Tat-Komponenten. Die Bilder A bis D zeigen *negative stains* von aus dem Stamm DADE pBW-*tatA*-H6 gereinigtem TatA-H6. Die Probe in Bild D wurde von Dr. Heinrich Lünsdorf (Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig, Deutschland) nach einem alternativen Protokoll fixiert.

Wurde dies für TatA-H6 getan, das ohne jedes Detergens über seinen His-*tag* aus dem Stamm DADE pBW-*tatA*-H6 affinitätsgereinigt wurde (s. a. Abb. 39 für die Reinigung und Abschnitt 2.4.9 für das verwendete Protokoll), fand man neben Vesikeln drei verschiedene Strukturen auf dem Formvar<sup>®</sup>-Film: erstens fielen sofort lange Röhren ins Auge, die je nach Konzentration einzeln lagen oder sich zu langen „Stapeln“ bündelten (Abb. 38 A, D und in B oben rechts), zweitens fand man hin und wieder Ringe, die fast immer wabenartig nebeneinander lagen (Abb. 38 B in der Bildmitte), und drittens konnte man Kugeln unterschiedlicher Größe entdecken (Abb. 38 C).

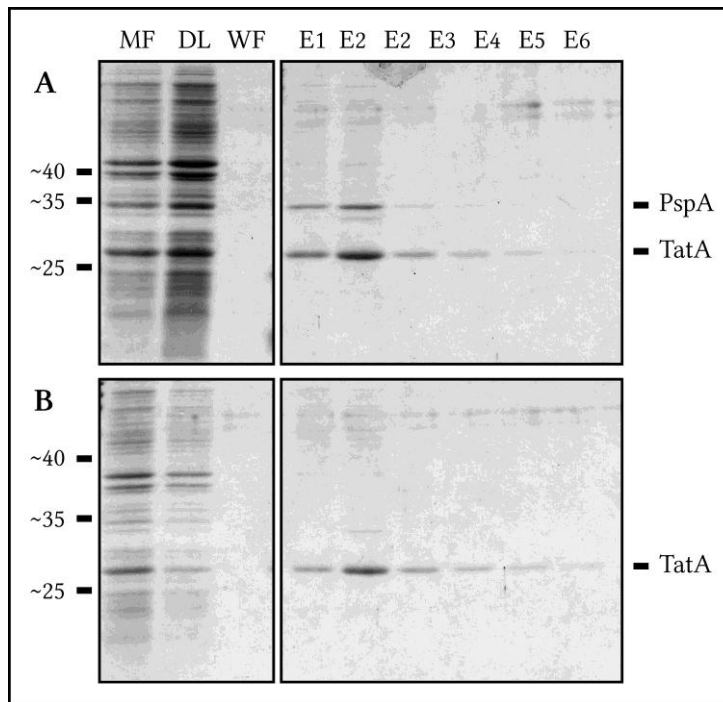


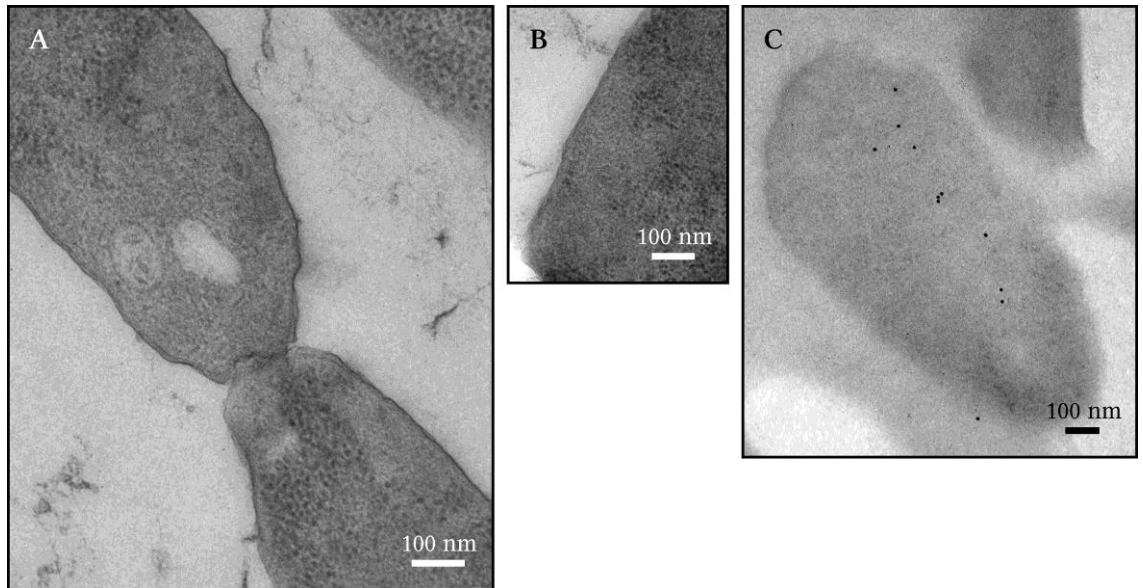
Abb. 39: Reinigung von TatA-H6 aus Stämmen mit und ohne PspA. Gezeigt sind Coomassie-gefärbte 15%ige SDS-PAGE Gele. Aufgetragen wurden Proben von Affinitätsreinigungen aus den Stämmen DADE pBW-*tatA*-H6 (Bild A) bzw. JW1297  $\Delta$ *pspA*::Kan pBW-*tatA*-H6 (Bild B). MF steht für Membranfraktion, DL für Durchlauf, WF für Waschfraktion und E1-6 für die verschiedenen Elutionsfraktionen.

Da schon vorher im Labor die Erfahrung gemacht wurde, dass das *phage shock protein A* (PspA) als Kontamination bei der Reinigung von TatA auftritt, wurde das Experiment in einem Stamm mit funktionierendem Tat-System, aber ohne PspA, wiederholt (JW1297  $\Delta$ *pspA*::Kan). Die TatA-Strukturen sahen in diesem Fall identisch aus, aber die kugeligen Gebilde, die, wie wir wissen, aus PspA bestehen (STANDAR *et al.*, 2008), waren nicht mehr auffindbar (nicht gezeigt). Die Reinheit des TatA bzw. die Kontamination durch PspA konnte auch in einem Coomassie-gefärbten SDS-Gel nachgewiesen werden (vgl. Abb. 39 A und B). Die Probe aus dem Stamm DADE pBW-*tatA*-H6 (Abb. 39 A) enthielt neben dem sehr sauberen TatA auch noch PspA. Bei dem Stamm ohne PspA (JW1297  $\Delta$ *pspA*::Kan pBW-*tatA*-H6) fehlte diese Bande (Abb. 39 B).

Was bleibt, ist die neue Erkenntnis, dass TatA die intrinsische Fähigkeit besitzt, ohne die anderen Tat-Komponenten und unabhängig von PspA Röhren zu bilden.

### 3.3.4 TATA ALLEIN FÜHRT NICHT ZU INTRAZELLULÄR SICHTBAREN RÖHREN

Da gereinigtes TatA, wie im vorherigen Abschnitt gezeigt, Röhren bildete, war zu erwarten, dass man diese Röhren auch *in vivo* finden konnte. Exprimierte man jedoch *tatA* in Abwesenheit der anderen Tat-Komponenten und führte eine HPF-Fixierung durch, dann fand man in den Zellen überraschenderweise keinerlei TatA-Röhren: weder ring- noch stapelförmige oder anders geordnete Strukturen waren erkennbar.



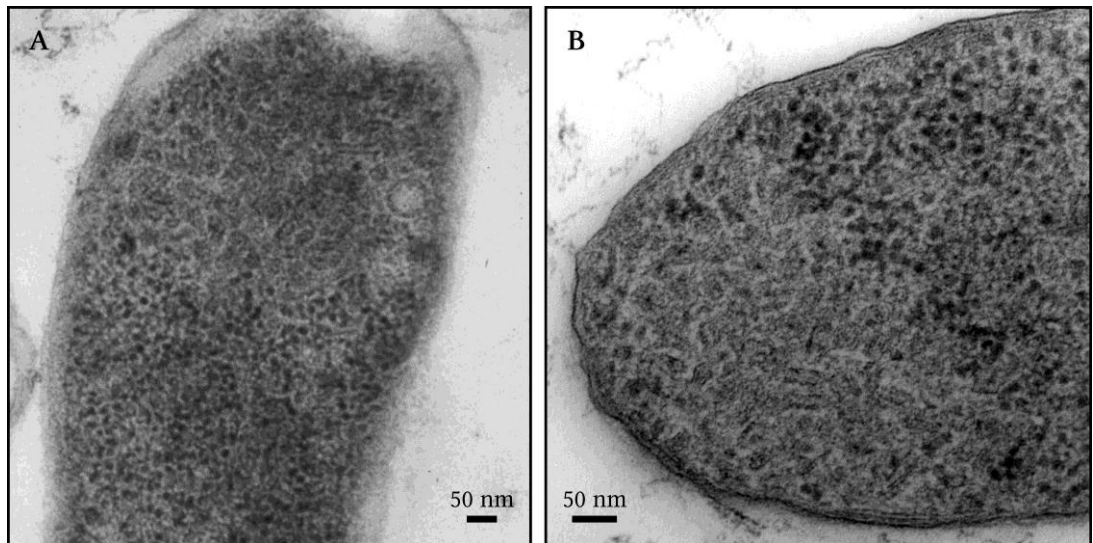
**Abb. 40:** Die Überexpression von *tatA* allein führt nicht zu Röhrenstrukturen. Der gezeigte Stamm ist ein DADE ( $\Delta tatABCDE$ ), der nur *tatA* exprimierte (pABS-*tatA*). Es bildeten sich flächige, schwer erkennbare Bereiche (Bilder A und B). In Bild C wurde zusätzlich eine Immuno-Gold-Markierung mit einem Antikörper gegen TatA durchgeführt.

Die Abb. 40 zeigt die stattdessen entstandenen Bereiche (in der TEM-Aufnahme hellgrau), bei denen es sich wahrscheinlich um Aggregationen von TatA handelte. Wenn man mit diesem Stamm eine Immuno-Gold-Markierung durchführte, fanden sich viele Goldpartikel im Cytoplasma. Diese waren auch oft in größeren Flecken konzentriert. Obwohl man diesen Bereich in Abb. 40 C auf Grund des geringen Kontrastes nicht ausmachen kann, ist es trotzdem wahrscheinlich, dass auch dort solch ein grauer Bereich für die Signale verantwortlich ist. Die optische Lokalisation der TatA-Strukturen bei Abwesenheit von TatB und TatC (s. Abschnitt 3.3.10 auf S. 86) bestätigte später diese Annahme.

Es stellte sich also die Frage, wie die Diskrepanz zwischen den vorhandenen Röhren nach einer Proteinreinigung und anschließendem *negative staining* und den nicht detektierbaren Röhren in der *in vivo*-nahen Situation nach HPF-Fixierung zu erklären ist.

Die Aufnahme einer Zelle, die *tatA* und zusätzlich *tatB* überexprimierte, lieferte eine wahrscheinliche Erklärung. Wenn man Abb. 41 genau betrachtet, dann erkennt man in dem grau schattierten Bereich an manchen Stellen kurze Röhren. Diese sind jedoch sehr ungeordnet, und die Situation lässt sich vielleicht am besten mit dem Bild von einem „Teller Spaghetti“ verdeutlichen. TatA scheint – eventuell unterstützt durch TatB – allein in der Lage zu sein, mehr oder weniger lange Röhren zu bilden. Die Röhren sind aber keineswegs geordnet, sondern liegen völlig zufällig verteilt und ineinander verschlungen vor. Dies fällt vor allem in Abb. 41 A (oben rechts) und in Abb. 41 B (mittig in der unteren Hälfte) auf. Es ist nicht ganz klar, ob es die Expression von *tatB* war, die zu einer

besseren Detektion der Röhren führte, oder ob die Probe in Abb. 41 nur zufällig etwas besser kontrastiert war, als die in Abb. 40.



**Abb. 41:** Bei Überexpression von *tatA* und *tatB* findet man kurze und ungeordnete Röhren. Der gezeigte Stamm ist ein DADE ( $\Delta tatABCDE$ ), der sowohl *tatA* als auch *tatB* exprimierte (pABS-*tatAB*). Es bildeten sich, wie in Abb. 40, flächige Bereiche, die aber in diesem Fall nicht völlig undifferenziert erschienen. Wenn man genau hinsieht, kann man kurze Röhren ausmachen.

Da die einzige fehlende Komponente in den vorangegangenen Experimenten TatC war, dessen Fehlen in beiden Fällen (Expression von *tatA* bzw. *tatAB*) auch zu einem Fehlen der geordneten TatA-Strukturen führte, war der nächste logische Schritt, *tatA* und *tatC* zusammen zu exprimieren. Eine Überexpression von *tatBC* auf einem ähnlichen Niveau ließ sich leider nicht realisieren, da dies für die Zellen letal ist (unveröffentlichte Ergebnisse von Jana Behrendt). Da die Strukturen aber, wie durch die Immuno-Gold-Markierung gezeigt werden konnte, hauptsächlich aus TatA bestehen, kann man mit hoher Sicherheit davon ausgehen, dass eine Überexpression von *tatBC* nicht zu ähnlichen Strukturen geführt hätte.

Und wirklich scheint TatB nicht essentiell für die Röhren zu sein. So waren in einem Stamm, der nur *tatA* und *tatC* exprimierte, die Röhren zu finden (Abb. 42). Diese sahen den Strukturen, die bei einer Überexpression von *tatABC* entstanden, auf den ersten Blick zum Verwechseln ähnlich. Auf den existierenden kleinen Unterschied geht der folgende Abschnitt 3.3.5 näher ein.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die reinen Röhren ausschließlich die Anwesenheit von TatA voraussetzen. Für hochgeordnete Strukturen, die dann auch intrazellulär gut nachweisbar sind, ist jedoch zusätzlich TatC essentiell.

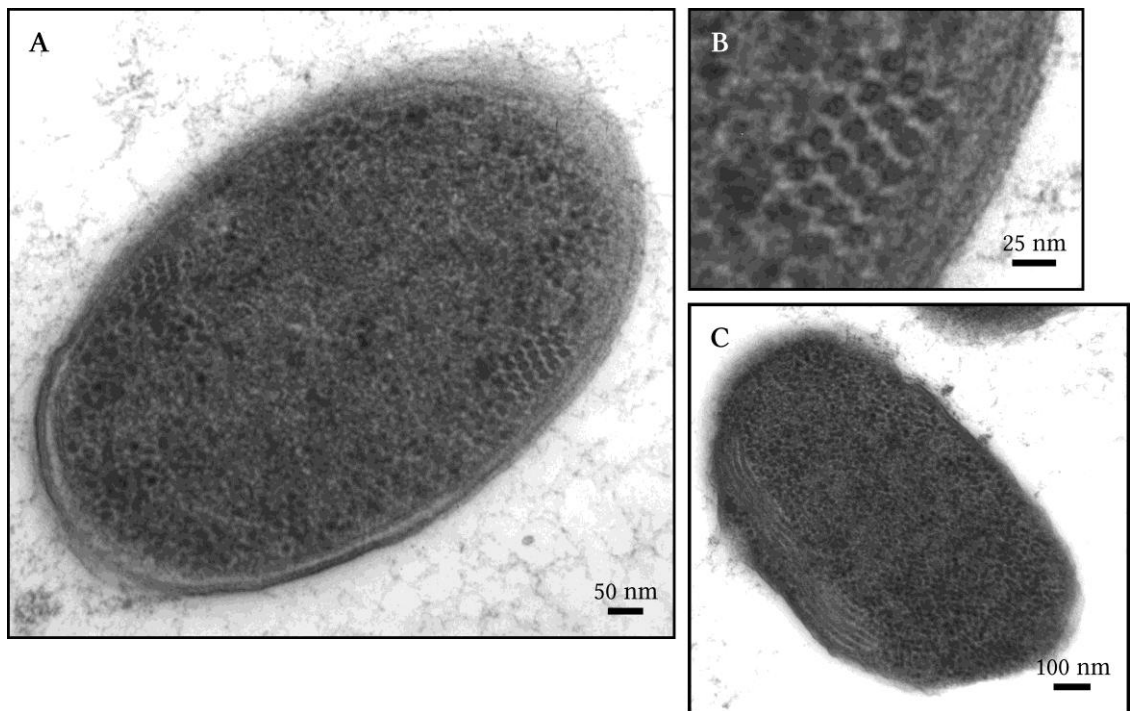


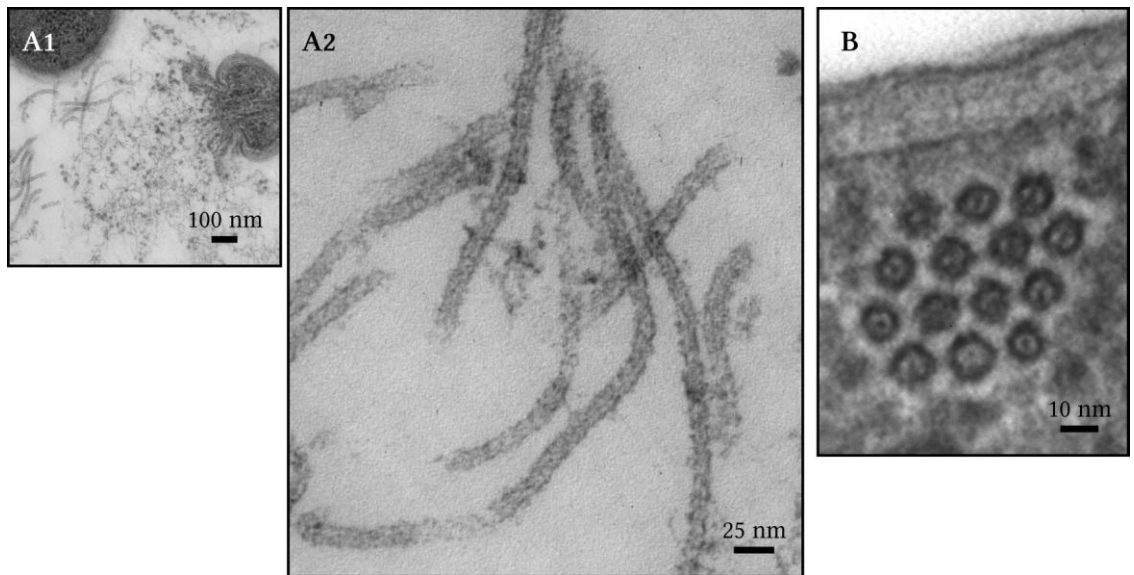
Abb. 42: Bei Überexpression von *tatA* und *tatC* werden wieder Röhren gebildet. Der verwendete Stamm war wieder ein DADE ( $\Delta tatABCDE$ ), der in diesem Fall *tatA* und *tatC* exprimierte (pABS-*tatAC*). In diesem Stamm fand man ebenfalls die Röhren (die stapelartigen Strukturen (Bild C) sowie die ringartigen Querschnitte (Bilder A und B), die schon bei der Überexpression von *tatABC* (Abb. 34) aufgefallen waren. Bild B ist eine Vergrößerung der rechten Struktur aus Bild A.

### 3.3.5 DER EINFLUSS VON TATB AUF DIE RÖHRENSTRUKTUR

Nachdem klar war, dass für die geordneten TatA-Strukturen sowohl TatA als auch TatC nötig waren, standen zwei verschiedene Stämme zur Verfügung, die Röhren bildeten: zum einen ein Stamm, der *tatABC* exprimierte, und zum anderen ein Stamm ohne TatB, der nur *tatAC* exprimierte. Dabei fiel frühzeitig auf, dass die Röhren eine leicht veränderte Ultrastruktur hatten. Während sie in einem Stamm, der *tatABC* exprimierte, hohl waren (vgl. Abb. 34 B), enthielten die Querschnitte der Röhren aus dem *tatAC*-überexprimierenden Stamm einen einzelnen Punkt (Abb. 42 B und Abb. 43 B).

Durch einen seltenen und glücklichen Zufall wurde eine Zelle gefunden, die wahrscheinlich während der HPF-Fixierung geplatzt war (Abb. 43 A1). Diese Zelle bot die Möglichkeit, einzelne Röhren hintergrundfrei beobachten zu können (Abb. 43 A2). Der oben erwähnte Punkt erscheint in den Längsschnitten als langer, dünner Faden direkt in der Mitte der Röhre (*ibid.*). Scheinbar widersprüchlich dabei ist, dass das Fehlen einer Komponente (in diesem Fall TatB) ein zusätzliches Signal hervorbringt. Es gibt dafür zwei verschiedene Erklärungsmöglichkeiten: entweder bewirkt das Fehlen von TatB eine Konformationsänderung von TatA, die dazu führt, dass der zusätzliche Proteinstrang im

Inneren der Röhren entsteht, oder TatB verdrängt einen vierten, bisher unbekanntem Partner von TatA, der neben TatB und TatC zur Röhrenbildung beiträgt. Dieser könnte vielleicht erst mit den Röhren interagieren, wenn TatB aus dem System entfernt wird.



**Abb. 43: Durch Überexpression von *tatA* und *tatC* entstehen Tata-Röhren mit einer leicht geänderten Konformation.** Der gezeigte Stamm ist wieder ein DADE ( $\Delta tatABCDE$ ), der *tatA* und *tatC* exprimierte (pABS-*tatAC*). Bild A1 zeigt eine Übersicht und Bild A2 eine Vergrößerung aus dem linken Randbereich von A1. In Bild B ist nochmals ein Querschnitt (wie in Abb. 42 B) zu sehen, der besonders schön die Symmetrie, die Verbindungen zwischen den Röhren (oben rechts) sowie den zentralen Punkt augenscheinlich werden lässt (vgl. auch Abb. 34 B).

### 3.3.6 AUSWIRKUNGEN DES EXPRESSIONSNIVEAUS AUF DIE TATA-RÖHREN

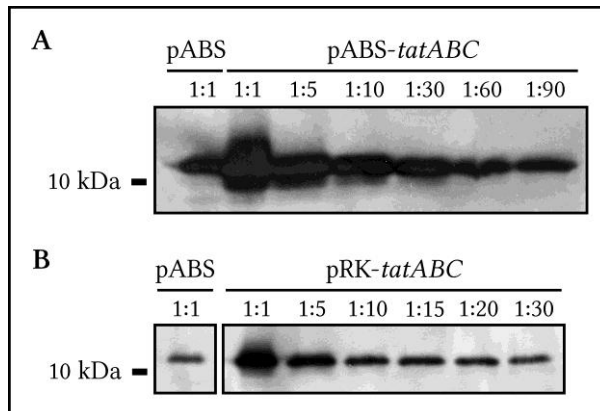
Wenn TatA cytoplasmatische Röhren bilden kann, dann wäre zu erwarten gewesen, dass man diese Strukturen auch in Wildtyp-Zellen finden kann, in denen keine Überexpression erfolgt. Dies ist jedoch nicht der Fall. Trotz intensiver Suche wurden bisher keine TatA-Strukturen in Wildtyp-Zellen entdeckt.

Um Genaueres über die Menge an benötigtem Protein zu erfahren, wurde an Stelle des pABS-*tatABC* ein anderes Plasmid benutzt, um *tatABC* zu exprimieren. Der Vektor pRK415 hat eine geringere Kopienzahl als der Vektor pABS und ein entsprechend niedrigeres Expressionsniveau. In Abb. 44 A kann man erkennen, dass der Level von TatA durch die Expression vom pABS-*tatABC* auf etwa das 40- bis 50-fache ansteigt, während der pRK-*tatABC* nur eine Steigerung auf etwa das 20- bis 30-fache bewirkt.

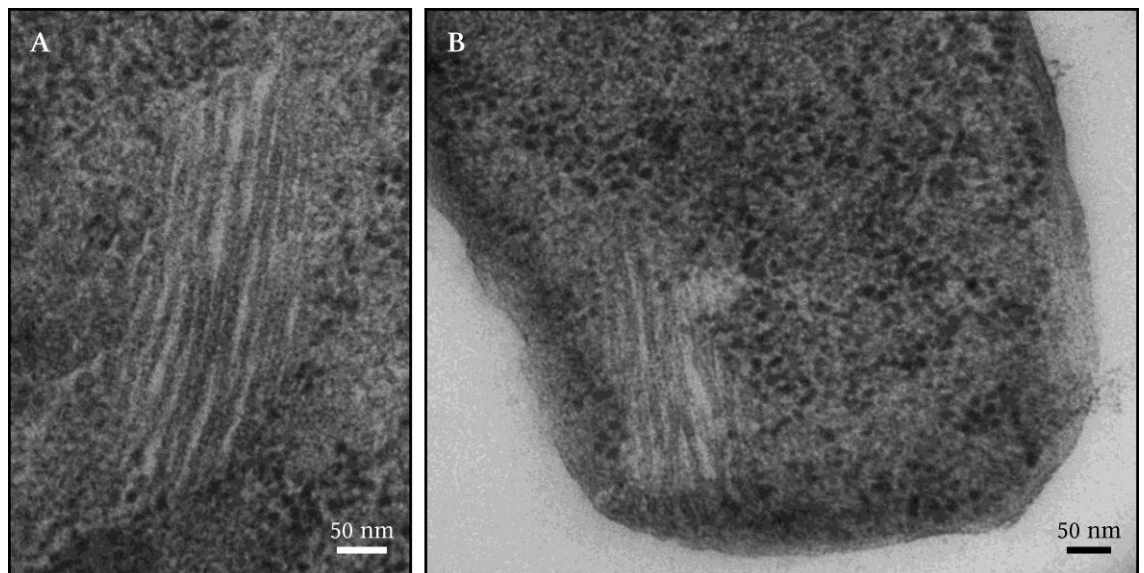
Trotz des Unterschiedes im TatA-Niveau kann man auch in Zellen, die das Plasmid pRK-*tatABC* enthalten, die TatA-Röhren entdecken (s. Abb. 45). Die Tat-Strukturen kommen in diesen Zellen allerdings mit einer signifikant geringeren Häufigkeit vor und



waren tendenziell kleiner, was darauf schließen lässt, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Intensität der Überexpression von *tatABC* und der Häufigkeit und Größe der TatA-Röhren besteht.



**Abb. 44: Expressionsniveaus von pABS-*tatABC* und pRK-*tatABC* im Vergleich.** Verglichen werden die Expressionsniveaus von TatA in den Stämmen MC4100 pABS (Leervektor) und MC4100 pABS-*tatABC* in A sowie MC4100 pABS und MC4100 pRK-*tatABC* in B. Es wurden unfraktionierte Proben (s. Abschnitt 2.4.8) in verschiedenen Verdünnungen aufgetragen (15% (w/v) SDS-PAGE, Western Blot, Detektion mit TatA-AK und dem ECL-System).



**Abb. 45: Die TatA-Röhren entstehen auch bei geringerer Überexpression.** Beide Bilder zeigen Zellen des Stammes MC4100 pRK-*tatABC*. Obwohl das Expressionsniveau sehr viel geringer war als bei den vorangegangenen Experimenten, fand man auch hier die TatA-Röhren, allerdings seltener und in geringerer Größe.

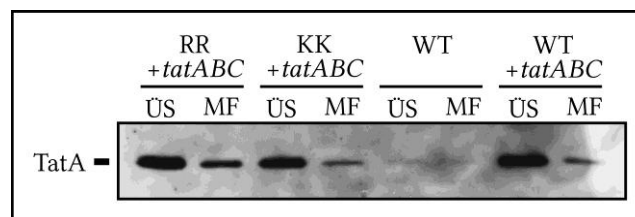
### 3.3.7 DER EINFLUSS VON SUBSTRATEN AUF DIE STAPELBILDUNG

Um zu überprüfen, ob Tat-Substrate einen Einfluss auf die Bildung der Tat-Strukturen haben, wurden die Stämme MC4100 pABS-*tatABC* pTB-DG und MC4100 pABS-*tatABC* pTB-DG-KK (mit einem deaktivierten Signalpeptid), die nun neben *tatABC* auch noch ein Substrat exprimierten, per HPF cryofixiert und im TEM untersucht. Obwohl es



schwierig war, die Strukturen bei elektronenmikroskopischer Untersuchung zu quantifizieren, wurde offensichtlich, dass beide Stämme im Vergleich zu Stämmen ohne Substratüberexpression eine stark verringerte Anzahl der Tat-Strukturen aufwiesen.

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass ein verändertes Expressionsniveau von *tatA* hierfür ursächlich war, wurden die beiden Stämme sowie die beiden Kontrollen MC4100 pABS und MC4100 pABS-*tatABC* per French Press aufgeschlossen und die Trümmerfraktionen abgetrennt. Dann wurden die Membran- bzw. Überstandfraktionen durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 130 000 x g voneinander getrennt und beide auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen (s. Abb. 46). Im anschließenden Western Blot wurde schließlich TatA detektiert und seine Menge verglichen.



**Abb. 46: Vergleich der TatA-Expressionsniveaus mit und ohne gleichzeitige Expression eines Tat-Substrates.** Gezeigt sind sowohl die Membranfraktionen (MF) als auch die Überstände (ÜS) der Stämme MC4100 pABS-*tatABC* pTB-DG (RR +*tatABC*), MC4100 pABS-*tatABC* pTB-DG-KK (KK +*tatABC*), des Wildtyps mit Leervektor MC4100 pABS (WT) und des Wildtyps mit *tatABC*-Überexpression MC4100 pABS-*tatABC* (WT +*tatABC*). Während das TatA-Signal im Wildtyp sehr schwach ist, ist es bei allen anderen Stämmen sehr deutlich sichtbar – besonders in den Membranfraktionen (15% SDS-PAGE, Western Blot, Detektion mit TatA-AK und dem ECL-System).

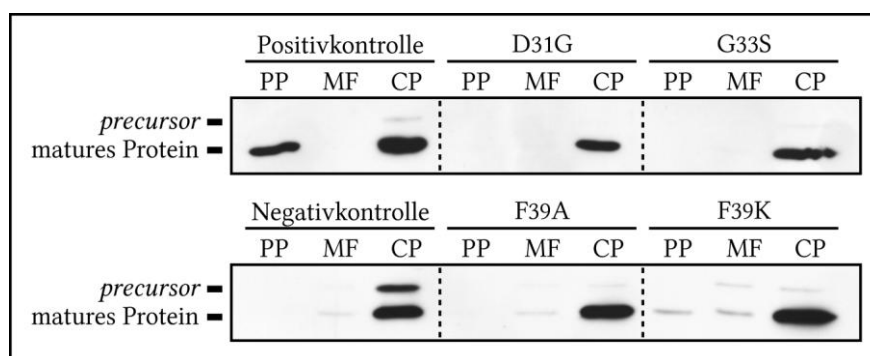
Man kann aus den Banden ablesen, dass kein Unterschied im TatA-Level besteht, der die sehr viel geringere Inzidenz der Tat-Strukturen hätte erklären können. Dies ist einerseits ein Indiz dafür, dass die Strukturen tatsächlich etwas mit dem aktiven Transport von Substraten zu tun haben, andererseits deutet es auf ein sehr viel dynamischeres System hin. So ist vorstellbar, dass die Röhren nur kurz gebildet werden und nach jedem Transportvorgang zerfallen. Dies würde übereinstimmen mit dem Modell von MORI und CLINE, 2002 (Abb. 4) und erklären, warum mehr Transport zu kürzeren bzw. weniger Röhren führt.

### 3.3.8 AUSWIRKUNGEN VON PUNKTMUTATIONEN AUF DIE TATA-RÖHREN

Nachdem klar wurde, dass TatA die Hauptkomponente der Röhren war und sowohl TatB als auch TatC eine – im Fall von TatC sogar essentielle – Rolle spielten, stellte sich die Frage nach der Aufgabe der TatA-Röhren. Eine Korrelation zwischen der TatA-Funktionalität und der Fähigkeit, Röhren zu bilden, wäre zwar kein Beweis, aber doch immerhin ein starkes Indiz für eine biologische Relevanz der TatA-Röhren. Deshalb

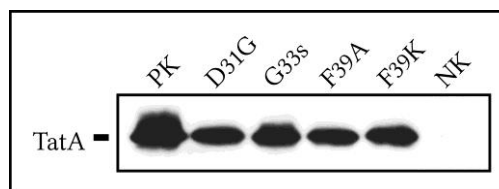
wurden eine Reihe von TatA-Mutationen auf die Anwesenheit der TatA-Röhren hin getestet. Zum Einsatz kamen die TatA-Mutationen D31G, G33S sowie F39A und F39K (HICKS *et al.*, 2005). Alle vier Austausche führen jeweils sowohl zu einer starken SDS-Sensitivität als auch zu einer verschwindend geringen TMAO-Reduktase-Aktivität im Periplasma (*ibid.*). Beides sind sichere Zeichen für einen Tat-Defekt.

Um ein möglichst vergleichbares Expressionsniveau zu erreichen, wurden alle vier Austausche in den pABS-*tatABC* eingeführt. Die entstandenen Plasmide wurden dementsprechend pABS-*tatA*-D31G-BC, pABS-*tatA*-G33S-BC, pABS-*tatA*-F39A-BC und pABS-*tatA*-F39K-BC genannt und in den *E. coli*-Stamm DADE ( $\Delta$ *tatABCDE*) transformiert. Um sicherzustellen, dass die Austausche erfolgt waren und die gewünschte Wirkung hatten, wurden die Konstrukte nicht nur sequenziert, sondern es wurden auch Transportversuche mit einem GFP-Fusionsprotein (GFP-DmsA-SP) durchgeführt. In allen vier Fällen konnten die mutierten Proteine im Gegensatz zur Positivkontrolle das fehlende Tat-System nicht – bzw. im Fall von F39K kaum – komplementieren. Bis auf die Mutation F39K wurde das Fusionsprotein überhaupt nicht in das Periplasma transloziert (Abb. 47).



**Abb. 47: Funktionstests der verschiedenen TatA-Mutationen.** Getestet wurde die Fähigkeit, DmsA-SP-GFP (also ein GFP mit einem DmsA-Signalpeptid) zu transportieren. Zu diesem Zweck wurden Periplasma, Membranen und das Cytoplasma fraktioniert. Bei den Stämmen handelte es sich um den  $\Delta$ *tatABCDE*-Stamm DADE, der jeweils das Plasmid pTB-DG-RR (außer Negativkontrolle) trägt, sowie den pABS-*tatABC* (Positiv- und Negativkontrolle) oder die Varianten (D31G, G33S, F39A sowie F39K) mit den entsprechenden Austauschen. Bei der Negativkontrolle wurde anstatt des pTB-DG-RR das Plasmid pTB-DG-KK verwendet (15% SDS-PAGE, Western Blot, Detektion mit GFP-AK und dem ECL-System). Deutlich erkennt man den Transport in der Positivkontrolle, der sowohl in der Negativkontrolle als auch in den Stämmen mit mutiertem TatA nicht oder nur sehr gering stattfindet.

Bei früheren Mutanten traten teilweise Probleme auf, was die Stabilität der mRNA und daraus folgend die Expressionsniveaus anbetrifft. Da der Level an Tat-Komponenten für die Detektierbarkeit der TatA-Röhren von großer Bedeutung zu sein schien, wurden Gesamtzellextrakte (s. Abschnitt 2.4.8 auf S. 38) der entsprechenden Stämme mittels Western Blot auf die Anwesenheit von TatA hin untersucht (Abb. 48). Die Level sind etwas geringer als in der Positivkontrolle DADE pABS-*tatABC*, aber durchaus vergleichbar.



**Abb. 48: Vergleich der Expressionslevel der verschiedenen TatA-Varianten.** Aufgetragen wurden Gesamtzellextrakte (s. Abschnitt 2.4.8 auf S. 38 für Details) von einer Positivkontrolle (PK), die vier mutierten TatAs (D31G, G33S, F39A und F39K) und eine Negativkontrolle (NK). Die dazugehörigen Stammbezeichnungen lauten: DADE pABS-*tatABC* (PK), DADE pABS-*tatA-D31G-BC*, DADE pABS-*tatA-G33S-BC*, DADE pABS-*tatA-F39A-BC*, DADE pABS-*tatA-F39K-BC* und DADE pABS (NK). Der TatA-Level ist in der PK am höchsten und in den Mutanten etwas niedriger (15% SDS-PAGE, Western Blot, Detektion mit TatA-AK und dem ECL-System).

Die vier DADE-Stämme mit den Plasmiden pABS-*tatA-D31G-BC*, pABS-*tatA-G33S-BC*, pABS-*tatA-F39A-BC* bzw. pABS-*tatA-F39K-BC* wurden HPF-cryofixiert, cryosubstituiert, geschnitten, kontrastiert (s. a. Abschnitt 2.5.3.1 auf S. 41) und im TEM untersucht. Mit Ausnahme der Mutation D31G war es in keiner der Mutanten möglich, TatA-Röhren oder anders geartete Strukturen zu finden. Es besteht also eine signifikante Korrelation zwischen der Funktionalität von TatA einerseits und der Fähigkeit, Röhren zu bilden, andererseits. Dass das Expressionsniveau in allen Fällen ausreichend war, erkennt man auch daran, dass die Mutante mit dem geringsten Level an intrazellulärem TatA (D31G) die einzige war, die noch TatA-Röhren bildete.

Im Laufe der Zeit wurden auch weitere Mutanten auf die Anwesenheit von TatA-Röhren hin getestet. Dazu gehört z. B. eine Mutante, deren TatA ein zusätzliches Glycin an Position 28 besitzt. Der entsprechende Stamm MC4100 pABS-*tatA(+Gly28)BC* (Plasmid von Denise Mehner; Manuskript in Vorbereitung) enthält außergewöhnlich geformte Tat-Strukturen. Die TatA-Röhren sind stark gekrümmt bis hin zu vereinzelt auffindbaren Ringschlüssen (s. Abb. 49).

Im Zuge des nicht erfolgreichen Versuchs, die Tat-Komponenten mit biarsenischen Farbstoffen<sup>16</sup> zu detektieren, wurde unter anderem eine weitere TatA-Mutation erzeugt, die an ihrem extremen C-Terminus direkt vor dem Stoppcodon einen Austausch von sechs Aminosäuren (HDKEQV geändert in CCPGCC) besaß. Der entsprechende Stamm MC4100 pABS-*tatA-CCPGCC-BC* enthielt keinerlei im TEM zu findende Tat-Strukturen. Das sogenannte Tetracystein-Motif (ursprünglich CCXXCC) scheint, obwohl die Austausche im extremen und bisher als eher unwichtig geltenden (LEE *et al.*, 2002) C-Terminus von TatA liegen, den Aufbau der TatA-Röhren massiv zu behindern.

<sup>16</sup> Die biarsenischen Farbstoffe FAsH-EDT2 und ReAsH-EDT2 fluoreszieren, wenn sie spezifisch an den Protein-tag CCPGCC (das sogenannte Tetracystein-Motiv) gebunden haben, und ermöglichen so theoretisch eine Lokalisierung des rekombinanten Proteins ohne die Fusion an ein GFP zum Beispiel (GRIFFIN *et al.*, 1998 und GRIFFIN *et al.*, 2000).

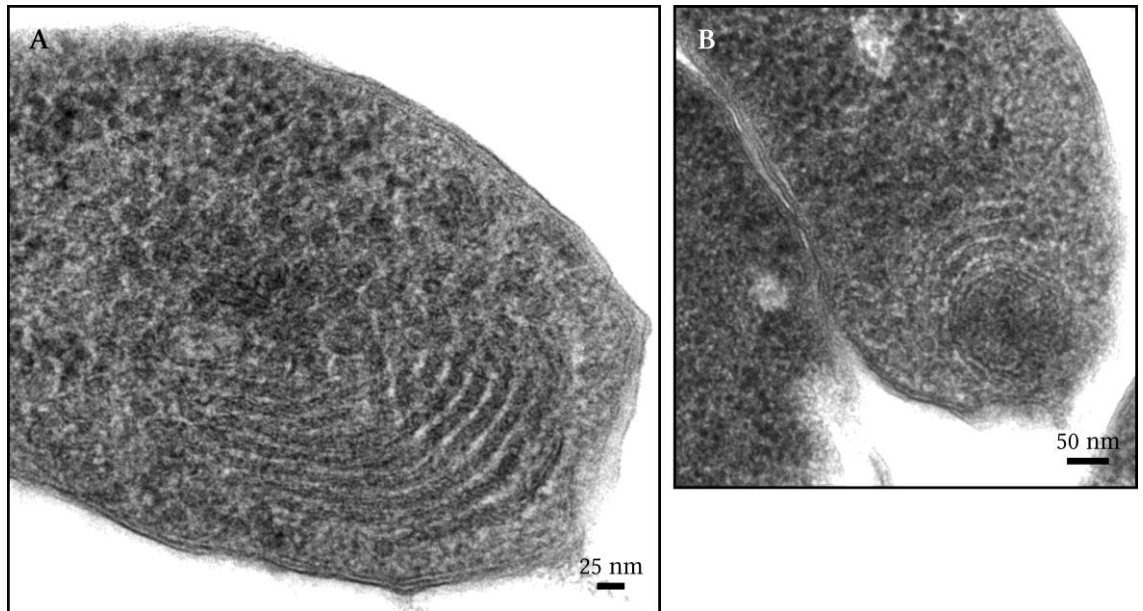


Abb. 49: Gebogene Tat-Strukturen in einem Stamm mit mutiertem TatA. Beide Bilder zeigen Zellen des Stammes MC4100 pABS-*tatA*(+Gly28)BC. Es fällt jeweils die ungewöhnliche Form der Strukturen auf, die sehr viel mehr als sonst gebogen sind. In Bild B erkennt man sogar einzelne Ringe.

### 3.3.9 GFP-FUSIONEN AN TATA UNTERDRÜCKEN DIE RÖHRENBILDUNG

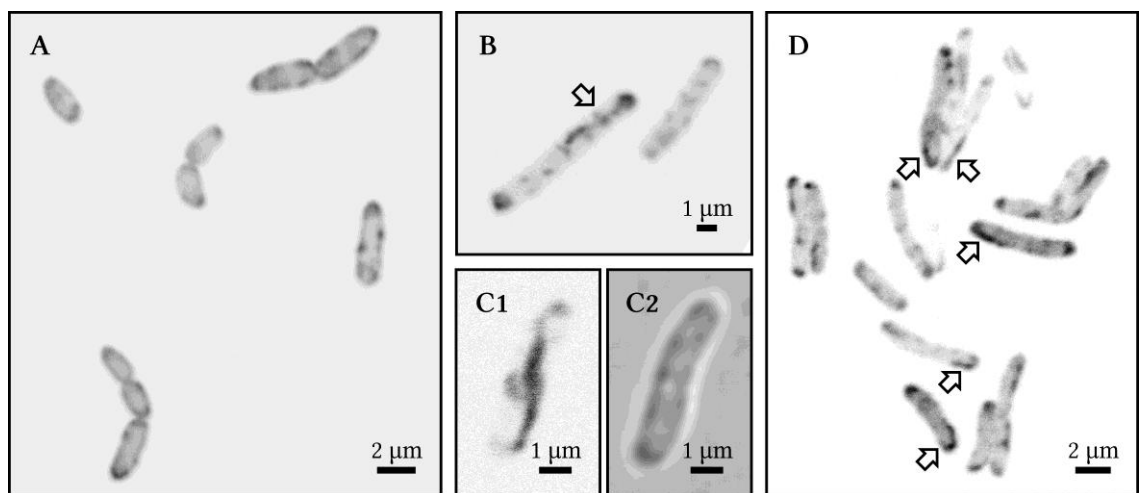
Da während dieser Arbeit TatA sowohl mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie als auch mittels GFP-Fusionen lokalisiert wurde, fiel natürlich die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen beider Untersuchungsmethoden auf. Während ein Großteil des TatA bei Überexpression ohne anfusioniertes GFP und in Anwesenheit von TatC in länglichen cytoplasmatischen Strukturen auftauchte, fand man überexprimiertes TatA-GFP, je nach Expressionsniveau, vor allem in der Cytoplasmamembran. TatA ohne TatC wiederum lag in Form von Aggregaten an den Zellpolen vor.

Diese Diskrepanz machte es wichtig zu überprüfen, ob ein Stamm mit dem Plasmid pABS-*tatA-gfp-BC* keine Tat-Strukturen enthielt oder diese einfach nur nicht fluoreszierten. Ersteres ist der Fall. Der Stamm DADE pABS-*tatA-gfp-BC* wurde einer HPF-Fixierung unterzogen und im TEM untersucht, aber es wurden keinerlei Tat-Strukturen gefunden (nicht gezeigt). Die Fusion von GFP an TatA schien die Eigenschaften von TatA soweit zu ändern, dass es sich völlig anders verhielt als in seinem Wildtyp-Zustand. Die gleichmäßig verteilte membranständige Lokalisation von TatA, die wir und andere mit Hilfe von GFP (BERTHELMANN und BRÜSER, 2004; RAY *et al.*, 2005) bzw. anderen fluoreszierenden Fusionspartnern (RIDDER *et al.*, 2009) bestimmt hatten, war also even-

tuell stark von dem jeweiligen Fusionspartner beeinflusst und deshalb in ihrer Aussagekraft in Frage zu stellen.

### 3.3.10 OPTISCHE LOKALISIERUNG DER TATA-RÖHREN

Obwohl eine Überexpression von *tatA-gfp-BC* nicht zur Bildung der TatA-Strukturen führte, wollten wir trotzdem versuchen, die Strukturen lichtmikroskopisch zu untersuchen. Dadurch sollten die Nachteile der Transmissionselektronenmikroskopie – nämlich die Einschränkung auf ein sehr kleines räumliches Umfeld (vor allem in der dritten Dimension) – vermieden werden.



**Abb. 50: Optische Lokalisierung der Tat-Strukturen durch gleichzeitige Expression von *tatA-gfp* und *tatABC*.** Bis auf C2 (DIC) zeigen alle Bilder die GFP-Fluoreszenz (schwarzes Signal). Bild A ist eine Kontrolle und zeigt die Fluoreszenzverteilung ohne Überexpression von *tatABC* im Stamm DADE *ara<sup>R</sup> pBAD-tatA-gfp*. Im Gegensatz dazu vgl. Bild B, das den Stamm MC4100 *pABS-tatABC pBAD-tatA-gfp* – also mit Überexpression von *tatABC* – zeigt. Beide Stämme wurden für 3 h mit 0,001% (w/v) L-Arabinose induziert. Deutlich erkennbar war das längliche Filament in der oberen Zelle in B (Pfeil). Dies gilt auch für C1 und C2. Wieder war ein langes fluoreszierendes Filament auszumachen. Bild D bietet eine Übersicht, die deutlich macht, dass nicht alle Zellen fluoreszierende Filamente aufwiesen (C und D jeweils mit 0,1% (w/v) L-Arabinose).

Um dies zu ermöglichen und um einen lichtmikroskopischen Überblick zu schaffen, wurde ein Stamm hergestellt, der neben dem Plasmid *pABS-tatABC* zur Überexpression aller Tat-Komponenten noch das Plasmid *pBAD-tatA-gfp* enthielt. Letzteres ermöglichte es, gezielt *tatA-gfp* zu exprimieren und das auch noch je nach Arabinose-Konzentration in einer steuerbaren Intensität (s. a. Abschnitt 3.1.1). Ziel war es, einerseits genügend Wildtyp-*tatA* in der Zelle zu exprimieren, sodass die Tat-Strukturen noch gebildet werden würden, und andererseits gleichzeitig eine zweite TatA-Population – nämlich an GFP fusioniertes TatA (TatA-GFP) – so zu exprimieren, dass ein kleiner Teil in die Struk-

turen eingebaut werden würde, aber möglichst ohne deren Bildung zu behindern. Das eingebaute TatA-GFP würde dann die Strukturen gleichsam anfärben.

Dies funktionierte tatsächlich bis zu einem gewissen Grad. Wie der Vergleich der Bilder A und B in Abb. 50 offensichtlich werden lässt, machte es für die Fluoreszenzverteilung von TatA-GFP durchaus einen großen Unterschied, ob *tatABC* gleichzeitig überexprimiert wurde oder nicht. In Abb. 50 A erkennt man die typische membran nahe Verteilung von TatA-GFP. In den Bildern B bis D liegt die Fluoreszenz hingegen mehrheitlich in Form von Punkten vor, die hin und wieder in die Länge gezogen als Filamente erscheinen (s. Pfeile). Diese Filamente hatten – wenn vorhanden – häufig Kontakt zu einem der Zellpole, im Fall von Bild C1 sogar zu beiden Zellpolen. Dies deckte sich mit der Vermutung, dass TatC der Membrananker der Filamente ist, da der TatBC-Komplex sich wahrscheinlich an den Polen befindet (s. Abschnitt 3.2.2).

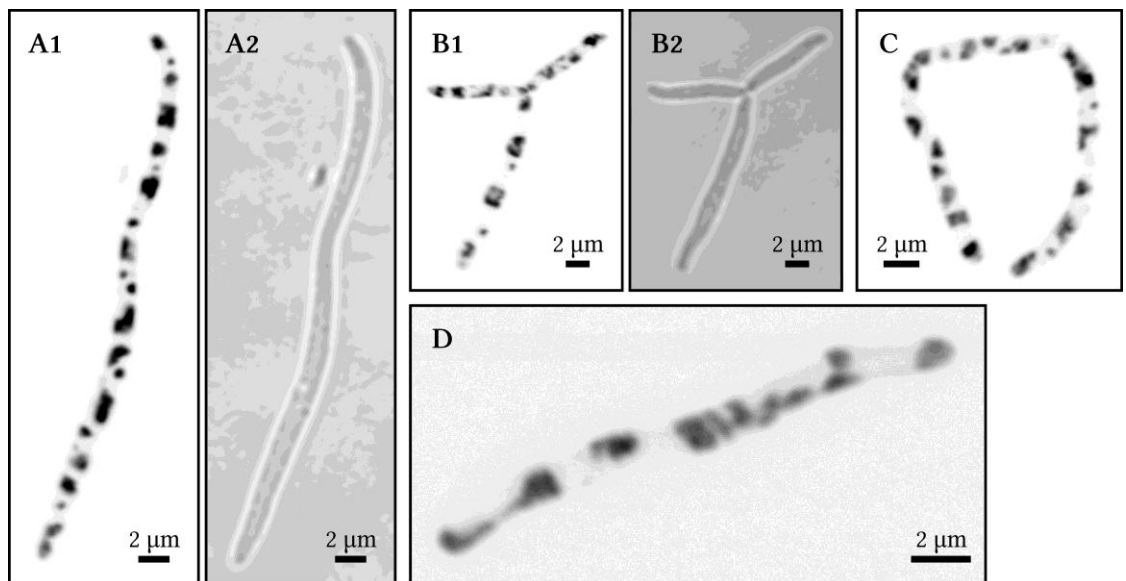


Abb. 51: Optische Lokalisierung der Tat-Strukturen durch gleichzeitige Expression von verschiedenen Kombinationen der Tat-Komponenten und *tatA-gfp*. Bis auf A2 und B2 (DIC) sind alle Bilder Aufnahmen der GFP-Fluoreszenz (schwarzes Signal). Die Bilder A1 und A2 zeigen eine extrem lange Zelle des Stammes DADE  $\text{ara}^R$  pABS-*tatA* pBAD-*tatA-gfp*. Auf den Bildern B1, B2 und C sind Zellen des Stammes DADE  $\text{ara}^R$  pABS-*tatAB* pBAD-*tatA-gfp* zu sehen. Bild D enthält das Fluoreszenzmuster einer Zelle des Stammes DADE  $\text{ara}^R$  pABS-*tatAC* pBAD-*tatA-gfp*. Die L-Arabinose-Konzentration betrug in allen Fällen 0,01% (w/v). Nur in Bild D – bei Überexpression von *tatAC* – sind Filamente erkennbar, sonst herrschen zufällig verteilte Aggregationen vor.

Um auszuschließen, dass die optisch detektierbaren Filamente nur Artefakte der Überexpression von *tatABC* waren, wurden analog zu den Versuchen am TEM auch bei den optischen Verfahren verschiedene Kombinationen der Tat-Komponenten getestet. So wurden Stämme mit *tatA*-, *tatAB*- bzw. *tatAC*-Überexpression – alle bei gleichzeitiger Expression von *tatA-gfp* – im LSM untersucht (s. Abb. 51).

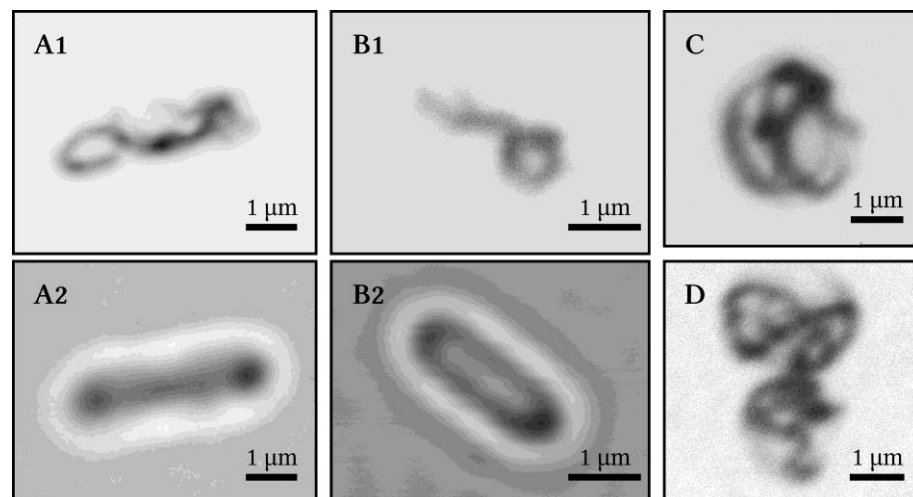
Betrachtet man die Abbildung, fällt zuerst auf, dass sowohl die Überexpression von *tatA* als auch von *tatAB* jeweils im Stamm DADE *ara*<sup>R</sup> einen auffälligen Wachstumsphänotyp hervorrief (Abb. 51 A bis C). Die Zellen sind extrem lang und anscheinend konnten sich keine Teilungsebenen ausdifferenzieren. Dies war zuvor im TEM wegen der sehr viel stärkeren Vergrößerung, der daraus resultierenden sehr viel schlechteren Übersicht und der geringen Tiefeninformation nicht so auffällig gewesen (s. a. Abschnitt 3.3.4 auf S. 76). Zum zweiten fällt ins Auge, dass auch die Verteilung der Fluoreszenz in den Zellen, die in A und B bzw. C dargestellt sind, sehr ähnlich ist. In beiden Fällen kommt das TatA-GFP-Fusionsprotein in sehr eng umrissenen, flächigen Bereichen vor, die sehr gleichmäßig in den überlangen Zellen verteilt sind. Letzteres ist ein Hinweis darauf, dass sich die Aggregationen an den Polen bzw. an den Teilungsebenen *in spe* anordnen (für eine andere Erklärung s. Abschnitt 4.3.4 auf S. 109). Die Bereiche scheinen identisch zu sein mit den schon im TEM beobachteten schattierten Aggregationsflächen bei *tatA*- (Abb. 40) bzw. *tatAB*-Überexpression (Abb. 41). Nur bei einem Zusammenspiel von mindestens TatA und TatC, wie in Abb. 51 D bzw. in Abb. 50 (dort TatABC), verlängerten sich die Punkte hin und wieder zu filamentartigen Fäden. Diese entsprechen wahrscheinlich den im TEM beobachtbaren TatA-Röhren (s. a. Abschnitt 3.3 auf S. 70).

Das Experiment ist allerdings trotzdem als nur bedingt erfolgreich anzusehen, denn obwohl sich die Fluoreszenzverteilung von TatA-GFP bei gleichzeitiger Überexpression von *tatABC* grundlegend von der Fluoreszenzverteilung ohne diese Überexpression unterschied, blieben Fragen offen. So fiel schnell auf, dass nicht alle Zellen fluoreszierten. Außerdem hatte man den Eindruck, dass die Rate der Inkorporation der GFP-Fusionsproteine in die Tat-Strukturen eher gering war. Zumindest konnten optisch weniger Strukturen detektiert werden, als durch die elektronenmikroskopischen Ergebnisse zu erwarten gewesen wären. So ist nicht sicher, ob die TatA-GFP-Proteine nicht eventuell auch in geringerer Konzentration trotzdem noch die Bildung der Röhren unterbrechen. Zum Beispiel fallen dem Betrachter zuerst polare Punkte auf, bei denen es sich nicht ausschließen lässt, dass es sich um unspezifische Aggregationen handelt. Auch ist der Anteil an Zellen mit fädigen fluoreszierenden Bereichen vergleichsweise gering. Eine völlig fehlerfreie Unterscheidung von Zellen mit und ohne TatA-Strukturen scheint mit dieser Methode nicht realisierbar, aber zumindest ist es ein Hinweis darauf, dass die Filamente von den polaren Punkten ausgehen und meist mit den Zellpolen in Kontakt stehen.

### 3.3.11 PSPA HAT KEINEN EINFLUSS AUF DIE TATA-RÖHREN

Schon früh wurde ein eventueller Zusammenhang zwischen dem *phage shock protein A* (PspA) und dem Tat-System diskutiert. PspA erfüllt in *E. coli* eine stressassoziierte Aufgabe. Es bildet wahrscheinlich an der Innenseite der Cytoplasmamembran große, netzartige Strukturen (STANDAR *et al.*, 2008), die die Membran stützen und stabilisieren. Außerdem kann es die Effizienz des Tat-Systems steigern (DELISA *et al.*, 2004), eventuell indirekt über die Verringerung von Protonenverlusten.

Ein Hinweis auf eine Interaktion wurde durch Kerstin Standar entdeckt, die bei der affinitätschromatografischen Reinigung von TatA immer auch PspA als Kontamination nachweisen konnte (unveröffentlicht). So wurde z. B. auch bei der Reinigung von TatA in Abb. 39 PspA mitgereinigt. Dieses ließ sich auf Grund der Menge sogar elektronenmikroskopisch nachweisen (s. Abb. 38 C), da die PspA-Strukturen sich grundsätzlich von den TatA-Röhren unterscheiden. Erstere ähneln kleinen, strukturierten Bällen.



**Abb. 52: Erscheinungsbild von PspA-GFP im LSM.** Für diese Abbildung wurden zwei verschiedene Stämme verwendet: Die Bilder A und B beruhen auf dem Stamm MC4100  $ara^R$  pBAD-*pspA-gfp*-H6, während C und D in der *mreB*-Mutante MC1000 $\Delta$ *mreB* pBAD-*pspA-gfp*-H6 entstanden. A2 und B2 sind DIC-Aufnahmen. Die anderen Abbildungen zeigen die GFP-Fluoreszenz. Die Expression von *pspA-gfp*-H6 wurde in A, C und D mit 0,01% (w/v) sowie in B mit 0,001% (w/v) L-Arabinose induziert.

Obwohl TatA auch ohne PspA Röhren bilden kann, gibt es eine interessante Parallele zwischen PspA und TatA: wenn man PspA an GFP fusionierte und Zellen, die dieses Fusionsprotein enthielten, im LSM untersuchte, dann fiel ins Auge, dass die Verteilung von PspA-GFP den Tat-Strukturen in mancher Hinsicht ähnelte. PspA-GFP ordnete sich nämlich in langen, teilweise mehr oder weniger gewundenen Filamenten im Cytoplasma an (Abb. 52 A und B). In allen vier gezeigten Fällen erkennt man deutlich die langen fluoreszierenden Stränge, die sich durch die Zelle winden. MreB hat keinen Einfluss auf die



Bildung der Stränge, denn auch in der *mreB*-Mutante sind diese Filamente vorhanden (Abb. 52 C und D).

Obwohl es durchaus interessant ist, dass PspA solche Filamente bildet, ist dennoch zu vermuten, dass die Ähnlichkeit zu den TatA-Röhren nur Zufall ist. Denn die TatA-Strukturen bildeten sich, wie in Abb. 34 B auf S. 71 gezeigt werden konnte, auch in Abwesenheit von PspA, und in den Zellen mit den PspA-GFP-Filamenten (Abb. 52) war wiederum das Tat-System nicht überexprimiert. Die extrem langen TatA-Strukturen waren in diesem Fall also gar nicht vorhanden.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 DIE LOKALISATION DER TAT-KOMPONENTEN

Hauptziel dieser Arbeit und schon meiner Diplomarbeit war es, die Lokalisation der Tat-Komponenten zu klären. Dabei war es naheliegend, TatA, TatB und TatC an GFP zu fusionieren und die Zellen in einem Fluoreszenzmikroskop zu untersuchen. Eine Vielzahl von Studien haben dieses Verfahren genutzt, um Proteine in Zellen zu lokalisieren (STEPANENKO *et al.*, 2008). Ein großes Problem bei dieser Herangehensweise ist die Gefahr, dass man Artefakte einführt, indem man die zu lokalisierenden Proteine an das immerhin 27 kDa große GFP fusioniert. Denn der fluoreszierende Marker ist im Fall des Tat-Systems in etwa so groß wie TatC und fast so groß wie TatA und TatB zusammen. Man muss sich deshalb immer bewusst sein, dass man ein Fusionsprotein beobachtet und lokalisiert, das in seiner Größe, Struktur und seinen Eigenschaften nicht unbedingt dem Wildtyp-Protein entspricht.

#### 4.1.1 DIE DUALE LOKALISATION VON TATA

Zuerst sollen die Ergebnisse der TatA-Lokalisationsstudien diskutiert werden. Dabei liegt das Hauptaugenmerk auf den verschiedenen Möglichkeiten, TatA zu detektieren, sowie auf den jeweiligen Nachteilen dieser Methoden. Außerdem werden verschiedene Daten bewertet, die ein neues Licht auf die bisher als korrekt geltende membranständige Lokalisation von TatA werfen.

##### 4.1.1.1 DER EINFLUSS MÖGLICHER ARTEFAKTE AUF DIE LOKALISATION VON TATA

Einige der Ergebnisse meiner Diplomarbeit (BERTHELMANN, 2004) – wie die gleichmäßige Verteilung von TatA-GFP in der Membran – müssen unter dem Eindruck der jetzt vorliegenden Ergebnisse neu bewertet werden. Die Tatsache, dass die langen TatA-Strukturen durch eine GFP-Fusion unterdrückt werden (s. a. Abschnitt 3.3.9), lässt die Frage aufkommen, ob TatA wirklich hauptsächlich in der Membran lokalisiert ist. Zumindest scheint es Eigenschaften von TatA zu geben, wie beispielsweise die Fähigkeit zur Polymerisation, die durch die Fusion an GFP verloren gehen. Insofern ist die membrangebundene und gleichmäßig verteilte Fluoreszenz von TatA-GFP bei geringem Expressionsniveau, wie in Abb. 50 A erkennbar und wie auch von uns und anderen bereits veröffentlicht (BERTHELMANN und BRÜSER, 2004 sowie RAY *et al.*, 2005), eventuell

ein Artefakt. Andererseits muss man beachten, dass hier die induzierte Expression von *tatA-gfp* (pBAD-*tatA-gfp*) sicherlich geringer ist als die konstitutive Expression von *tatABC* bzw. *tatA* in den Versuchen zu den TatA-Strukturen (pABS-*tatA* bzw. pABS-*tatABC*). Es gibt mindestens drei Faktoren, die zu Artefakten bei der korrekten Lokalisierung von TatA führen können.

Erstens die Fusion selbst, die einen gravierenden Eingriff in das Protein darstellt und es massiv vergrößert. Besonders da für TatA eine strukturelle Funktion vorhergesagt wurde (SARGENT *et al.*, 2006), ist vorstellbar, dass die Fusion eines 27 kDa großen GFP an das nur 9 kDa große TatA sterische Behinderungen nach sich zieht, die die Eigenschaften von TatA grundlegend ändern. Auch die Wahl des Fusionspartners scheint eine Rolle zu spielen. Das gelb fluoreszierende Protein YFP zum Beispiel aggregiert noch etwas stärker als GFP. Zumindest zeigte das Fusionsprotein TatA-YFP eine Vielzahl von ausgeprägten, vor allem polaren Punkten selbst bei Induktionsleveln, bei denen mit TatA-GFP kaum noch Aggregationen erkennbar waren (Abb. 9). Mit GFP als möglicher Artefaktquelle beschäftigt sich auch der Abschnitt 4.3.1 ab S. 105.

Zweitens ist die Lokalisation von TatA-GFP abhängig vom Expressionsniveau. Je höher das Niveau, desto mehr fluoreszierende Foci wurden an den Zellpolen beobachtet (vgl. Abb. 7 und Abb. 8), wobei unklar ist, ob dabei die Aggregationsneigung des GFP oder eine intrinsische Eigenschaft des TatA ursächlich ist. Man kann aber annehmen, dass bei einer ausreichend geringen Expression die immer beobachtbare Fluoreszenz in der Membran überwiegt, während höhere Level zu cytoplasmatischen Aggregationen führen.

Ein dritter Faktor mit Einfluss auf die Lokalisation von TatA ist die An- bzw. Abwesenheit von TatB und TatC (vgl. Abb. 40 und Abb. 42). Ohne TatC aggregiert im Überschuss vorhandenes TatA im Cytoplasma. Mit TatC dagegen kommt es zu den typischen, oben beschriebenen Tat-Strukturen (Abschnitt 3.3). Wenn man Zellen, die nur *tatA* (Abb. 40) bzw. *tatAB* exprimieren (Abb. 41), vergleicht, dann hat man den Eindruck, dass auch TatB einen leichten organisierenden Einfluss auf TatA besitzt. In Zellen, die *tatAB* überexprimieren, sind kurze Röhren zu erkennen, die aber sehr ungeordnet vorliegen.

#### 4.1.1.2 IST TATA MEMBRANINTEGRAL?

Die Frage nach der Lokalisation von TatA lässt sich also trotz oder gerade auf Grund der Vielzahl der Ergebnisse nicht leicht bzw. bisher nicht zufriedenstellend beantworten. Sicher ist, dass TatA ohne fusioniertes GFP schon bei mäßiger Überexpression in röhrenartigen Strukturen im Cytoplasma auftaucht (Abb. 34). Die membranintegralen Anteile hingegen sind, wenn vorhanden, verschwindend gering, wie die Immuno-Gold-Markierungen zeigen (Abb. 10). Dabei muss man aber beachten, dass von einem mem-

branständigen Protein, das gleichmäßig in der Membran verteilt ist, in einer geschnittenen Zelle nur ein sehr kleiner Anteil zugänglich ist. Die Epitopmenge, die dem Antikörper während der Immuno-Gold-Markierung zugänglich ist, ist daher nicht mit einem cytoplasmatischen, an einer Stelle konzentrierten Protein zu vergleichen. Eine Membranständigkeit von TatA lässt sich also – trotz Überexpression von *tatABC* – auf diese Weise nicht ausschließen.

Dass TatA bislang überhaupt als membranständig galt, ist unter anderem auf seine Co-Sedimentation mit den Membranen zurückzuführen (PORCELLI *et al.*, 2002). Von löslichen Proteinen würde man erwarten, dass sie selbst nach einer Ultrazentrifugation im Überstand bleiben. TatA stellt aber eventuell eine Ausnahme dar. Da es bei Überexpression von *tatA* und *tatC* sofort zu den großflächigen Tat-Strukturen kommt (Abb. 34) und auch TatA allein lange Röhren bilden kann, die aus vielen Untereinheiten bestehen (Abb. 38), ist es möglich, dass die TatA-Komplexe zusammen mit den Membranen sedimentieren, ohne zwingend selbst membranintegral zu sein. Ebenfalls nicht auszuschließen und faszinierend ist die Möglichkeit, dass sich TatA sowohl im Cytoplasma befinden als auch membranintegral sein könnte. In den TatAC-Systemen, wie z. B. in *B. subtilis*, ist das lange bekannt (POP *et al.*, 2003 und SCHREIBER *et al.*, 2006). Dort wird die Translokation durch Bindung vom löslichen TatA(d) an das Substrat initiiert. TatA übernimmt dabei die Aufgabe eines cytoplasmatischen *targeting*-Faktors. Ähnliches ist auch in *E. coli* denkbar.

#### 4.1.2 IST TATB WIRKLICH POLAR?

Wie bei TatA-GFP ist es auch bei TatB-GFP wahrscheinlich, dass die großen cytoplasmatischen Aggregationen Produkte der Überexpression sind. Da der natürliche Level von TatB in *E. coli* etwa 20-fach geringer ist als der des TatA, ist TatB eventuell sehr viel empfindlicher gegenüber einer Erhöhung der Expression. So wurde für TatB auch nie ein detektierbarer Induktionslevel gefunden, an dem TatB-GFP nicht polar gewesen wäre. RAY *et al.*, 2005 kamen zu ähnlichen Ergebnissen, jedoch war TatB-GFP bei ihren Untersuchungen stärker, wenn auch nicht nur, in der Membran verteilt – eine Lokalisation, die bei uns praktisch keine Rolle spielte. Der Unterschied mag dabei im Fusionsprotein TatB-GFP zu suchen sein, da das TatB-GFP von RAY *et al.*, 2005 vier Aminosäuren des extremen C-Terminus von TatB mehr enthält. Ob *tatB-gfp* konstitutiv (Abb. 11) oder induziert (Abb. 12) exprimiert wurde, machte im Gegensatz zu TatA-GFP keinen Unterschied für die Lokalisation. RAY *et al.*, 2005 interpretierten ihre Daten dahingehend, dass bei ihrem Konstrukt die polaren Punkte mit der Zeit zunahmen. Je länger die Induktion

zurücklag, desto höher war der Anteil an Zellen mit polaren Punkten. Auch dies war bei unserem Konstrukt nicht zu beobachten. Schon wenige Minuten nach der Induktion konnte man sehr feine Punkte an den Polen entstehen sehen. Dies mag aber auch irreführend sein, da die polaren Punkte wahrscheinlich sehr viel einfacher detektierbar sind als in der Membran verteilte Fluoreszenz.

Die hin und wieder beobachtbaren Zellen mit gleichmäßig lateral verteilten Signalen (Abb. 13) erinnern an die helikale Verteilung von MreB, aber es ist auch eine sehr viel einfachere Erklärung möglich (WANG *et al.*, 2008). Die Diskussion möglicher Mechanismen hierfür erfolgt jedoch erst im Abschnitt 4.3.4 ab S. 109, da eine ähnliche Verteilung der Punkte auch bei der Expression von *hip<sup>SP</sup>-nspR5-gfp-RR* im  $\Delta$ *minCDE*-Stamm PB114 zu beobachten war.

Wo die polaren Fluoreszenzsignale herkommen, die auch RAY *et al.*, 2005 beobachtet haben, erkennt man sehr gut in Abb. 14 A: nämlich aus großen cytoplasmatischen Ansammlungen. Wenn man davon ausgeht, dass überschüssiges TatB-GFP in polaren Aggregaten vorkommt, bleibt die Frage, warum diese *spots* gerade an den Polen liegen. Denn obwohl man auch häufig eine Reihe von Punkten außerhalb der Polregionen finden kann, sind die polaren Fluoreszenzzentren die mit Abstand am deutlichsten sichtbaren. Hinzu kommt die Frage, warum das Fusionsprotein TatB-GFP – wie auch TatA-GFP – noch aktiv ist (BERTHELMANN, 2004), wenn es doch wahrscheinlich aggregiert. Eine mögliche Antwort auf diese beiden Fragen ist, dass wahrscheinlich ein gewisser Anteil von TatB bzw. von TatB-GFP in der Membran verbleibt und dort mit TatC interagieren kann, während gleichzeitig überproduziertes Protein an den Zellpolen aggregiert. Es könnte also sein, dass die Aggregationen in der Nähe des membranständigen Proteins beginnen. Die Aggregationen wären dann genau da lokalisiert, wo auch das Protein normalerweise in der Membran inseriert ist.

In diesem Zusammenhang ist auch interessant, dass eine Deletionsmutante, die das Zytoskelettprotein MreB fehlt, einen Einfluss auf die Lokalisation von TatB-GFP hat. MreB stellt wahrscheinlich für eine Anzahl von Proteinen eine polare Determinante dar (s. a. Abschnitt 1.3.1). Mit den Zellpolen verschwinden in den typischen runden Mutanten auch die zwei Hauptpunkte von TatB-GFP-Fluoreszenz und werden durch eine variable Anzahl von mehr oder weniger gleichmäßig leuchtenden Punkten ersetzt (Abb. 15 B und C). Dies ist eventuell ein Hinweis darauf, dass TatB-GFP zwar nahezu unabhängig vom Expressionslevel aggregiert, aber dies eben nicht zufällig an den Polen tut.

#### 4.1.2.1 DER SEKUNDÄRE KETTENPHÄNOTYP ALS FOLGE DER TATB-GFP-FUSION

Die beobachteten cytoplasmatischen Aggregationen von TatB-GFP erklären wahrscheinlich auch die von mir „sekundärer Kettenphänotyp“ genannte Wachstumsmorphologie von Zellen, die *tatB-gfp* konstitutiv exprimieren (pABS-*tatAB-gfp-C*). Im Gegensatz zum „primären“ Kettenphänotyp, der durch ein fehlendes Tat-System und der damit einhergehenden Unfähigkeit zum Transport der Amidasen AmiA und AmiC verursacht wird (HEIDRICH *et al.*, 2001 und IZE *et al.*, 2003), beruht die in Abb. 11 sichtbare Kettenbildung wahrscheinlich rein mechanisch auf einer Störung der Zellteilung durch die Aggregationen. Für diese These spricht erstens, dass TatB-GFP den Phänotyp auch in Wildtyp-Zellen mit funktionierendem Tat-System induzieren kann, und zweitens, dass eine geringere Expression – wie z. B. im induzierbaren System – nicht mehr zur Kettenbildung führt. Eventuell spielen auch die cytoplasmatischen TatA-Strukturen eine gewisse Rolle, denn von dem Plasmid pABS-*tatAB-gfp-C* werden auch Wildtyp-Varianten der Gene *tatA* und *tatC* exprimiert, und die Anwesenheit dieser Genprodukte reicht zur Stapelbildung aus (Abb. 42). Wenn die TatA-Strukturen von einer Zelle in die nächste reichen, können sich die Zellen nicht mehr vollständig teilen. Dies kann man hin und wieder beobachten, wenn man HPF-fixierte Zellen untersucht (Abb. 34 D). Und tatsächlich kommen bei Überexpression von *tatABC* vermehrt Ketten vor, wenn auch längst nicht in dem Maße, wie dies eine Expression von *tatAB-gfp-C* verursacht.

#### 4.1.3 IST DIE TATC-LOKALISATION ABHÄNGIG VON TATA UND TATB?

Fusionsproteine von TatC und GFP waren von Anfang an sehr schlecht zu lokalisieren. Die Fluoreszenz war sehr gering und selten war eine eindeutige Lokalisation erkennbar (Abb. 16). Andere Gruppen hatten jedoch klarere Ergebnisse mit ihren Fusionsproteinen und konnten TatC-GFP ganz ähnlich wie TatA-GFP frei und gleichmäßig in der Membran verteilt, aber auch in einer Vielzahl von feinen, frei verteilten Punkten lokalisieren (RAY *et al.*, 2005). Dies widerspricht jedoch meinen Ergebnissen der TatC-GFP-Lokalisierung bei gleichzeitiger Überexpression von *tatABC* (Abb. 17). Werden alle drei Tat-Komponenten und das Gen für das TatC-GFP-Fusionsprotein exprimiert, dann findet man plötzlich eine ganze Reihe von Zellen mit polaren Punkten. Diese ähneln in Form und Größe stark den TatB-GFP-Punkten. Dies wäre prinzipiell sinnvoll, denn TatB und TatC interagieren ja im TatBC-Komplex miteinander (BOLHUIS *et al.*, 2001). Genauer gesagt, gibt es sogar zwei verschiedene TatBC-Komplexe, einen 440 kDa großen und einen 580 kDa großen (RICHTER und BRÜSER, 2005). Eine Co-Lokalisation von TatB und TatC wäre also nur folgerichtig. Andererseits muss man beachten, dass gleichzeitig

*tatABC* überexprimiert wird, was eigentlich zu den länglichen Tat-Filamenten führt. TatC-GFP scheint aber nicht direkt mit diesen Strukturen zu interagieren, da die Fluoreszenz stärker in Punkten konzentriert ist als z. B. bei TatA-GFP (vgl. Abb. 17 und Abb. 50). Trotzdem ist es nicht ausgeschlossen, dass die Überexpression von *tatABC* und *tatC-gfp* zu Artefakten führt, die die polare Lokalisation von TatC-GFP bedingen.

## 4.2 DIE TATA-STRUKTUREN

Eine der faszinierendsten Entdeckungen, die im Zuge der Lokalisationsstudien gemacht wurden, war der Fund von Röhrenstrukturen in Zellen, die *tatABC* überexprimierten. Ganz besonders interessant ist in diesem Zusammenhang die Rolle von TatA, der häufigsten Tat-Komponente in *E. coli*, denn Immuno-Gold-Markierungen erbrachten schnell, dass TatA die Hauptkomponente – wenn nicht sogar die einzige Komponente – der Strukturen ist (Abb. 35).

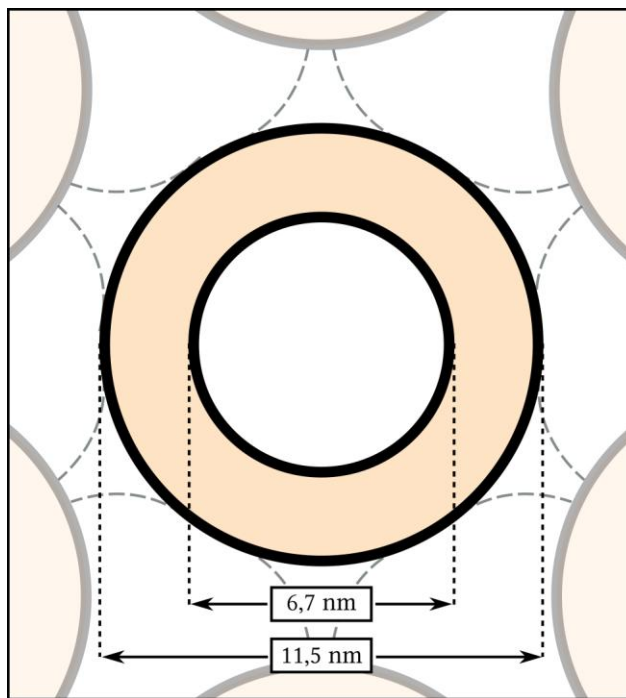
Schon früh wurde ein 460 kDa großer TatA-Komplex beschrieben (PORCELLI *et al.*, 2002). Später entdeckte man, dass TatA in BN-PAGE-Analysen (*blue native*-Gelen) in einer Vielzahl von verschiedenen großen Oligomeren läuft, ein Muster, das auch als *ladder* (Leiter) bezeichnet wird (OATES *et al.*, 2005). Dies unterstützte die Idee, dass TatA eine Art flexible Pore bildet, die je nach Größe aus unterschiedlich vielen Oligomeren aufgebaut sein kann und aus diesem Grund sehr unterschiedliche Durchmesser aufweist (SARGENT *et al.*, 2001 sowie GOHLKE *et al.*, 2005). In beiden Veröffentlichungen, die in der Arbeitsgruppe um Ben Berks entstanden, wurde TatA aus der Membranfraktion solubilisiert, und die Autoren fanden daraufhin in *negative stains* viele runde Ringe unterschiedlicher Größen. Unsere Entdeckung der TatA-Röhren erweitert die Idee einer ringförmigen Pore nun um eine dritte Dimension.

### 4.2.1 WIE ENTSTEHEN DIE TATA-STRUKTUREN?

Obwohl die Tat-Strukturen in den HPF-fixierten Schnitten scheinbar verschiedene Formen annehmen (Abb. 34 und Abb. 36), handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit durchweg um Röhren mit einem sehr uniformen Durchmesser von etwa 11,5 nm. Die porenartige Öffnung in der Mitte ist etwas unter 7 nm groß. Wenn genügend Röhren im Querschnitt sichtbar sind, wie z. B. in Abb. 37, dann wird deutlich, dass die einzelnen Röhren ein hochgradig geordnetes Ganzes bilden, das Symmetrien in mehreren Richtungen aufweist. Jede Röhre hat genau sechs Nachbarn, mit denen sie teilweise durch kleine

„Brücken“ verbunden zu sein scheint. Schematisch ist dies noch einmal in Abb. 53 zusammengefasst.

Gereinigtes TatA bildet zwar schon allein Röhren (Abb. 38), aber für die hochgeordneten intrazellulären Tat-Strukturen wird zusätzlich TatC benötigt (Abschnitt 3.3.4). Fehlen TatB und TatC (Abb. 40) oder auch nur TatC (Abb. 41), dann bilden sich höchstens kurze, ungeordnete Röhren, die nur schwer oder gar nicht im TEM auszumachen sind. TatB ist zwar nicht essentiell, hat aber trotzdem einen Einfluss auf die Struktur der Röhren. Fehlt es, findet man direkt in der Mitte der Röhre einen zusätzlichen elektronendichten Bereich, wobei unklar bleibt, ob es sich dabei um einen zusätzlichen Interaktionspartner oder um eine Konformationsänderung handelt (Abb. 43).



**Abb. 53: Schema einer TatA-Röhre.** Die nebenstehende Abb. zeigt alles, was über die Ultrastruktur der TatA-Röhren bekannt ist: den Außen- und Innendurchmesser, die Anordnung der Nachbarröhren sowie die Verbindungen zwischen den Röhren. Da unklar ist, wie viele Verbindungen es pro Röhre gibt, sind diese gestrichelt gezeichnet.

Dass TatC Voraussetzung ist für geordnete TatA-Röhren, lässt die These zu, dass das mit hoher Sicherheit membrangebundene TatC mit seinen sechs transmembranen Durchgängen als eine Art Membrananker für TatA fungiert. Eine Entsprechung gibt es bei den Zweikomponentensystemen der gramnegativen Bakterien. So konnte in *B. subtilis* gezeigt werden, dass TatC(d) mit seinen cytosolischen Bereichen an TatA(d) bindet und diesem so bei der korrekten Membranlokalisierung assistiert (SCHREIBER *et al.*, 2006). Im gleichen Organismus wurde drei Jahre später beobachtet, dass TatAd-GFP polare *spots* bildet, die abhängig sind von der Anwesenheit von entweder TatCd oder TatCy (RIDDER *et al.*, 2009).

Gleichzeitig lassen sich – wenn man die These von TatC als ordnendem Gerüst akzeptiert – aus der gleichmäßigen Struktur von TatA Rückschlüsse auf TatC ziehen. So er-



scheint es wahrscheinlich, dass die verschiedenen TatC-Untereinheiten sehr eng beieinander liegen und ebenfalls stark geordnet und gleichmäßig ausgerichtet sind. Dies wiederum erinnert an die „*translocon rafts*“ genannten Mikrodomänen, die in *Streptococcus pyogenes* im Zusammenhang mit dem Sec-System beschrieben wurden (ROSCH und CAPARON, 2004). Neben „Floß“ lässt sich das englische Wort *raft* auch mit „Fundamentplatte“ übersetzen. Im Sinne eines membranständigen Bereichs von konzentrierten TatBC-Komplexen, auf denen die TatA-Röhren aufbauen, die dann je nach Translokationsstatus und Expressionsniveau verschieden weit ins Cytoplasma hineinwachsen, ist diese Übersetzungsvariante sehr treffend. Es erscheint wahrscheinlich, dass diese eng begrenzten „Translokoninseln“ tatsächlich existieren. Sie würden auch sehr elegant die stark konzentrierte, polare Lokalisation der transportunfähigen HipSP-FG5-GFP-Fusionsproteine erklären (s. a. Abschnitt 3.2.2 und Abschnitt 4.3.2). Für TatA wurden nach *single-molecule*-Untersuchungen von YFP-Fusionen etwa 15 den *rafts* entsprechende TatA-Komplexe mit jeweils etwa 25 TatA-Untereinheiten in tetramerer Anordnung vorhergesagt (LEAKE *et al.*, 2008). Hinzu kommen nach dieser Rechnung etwa 100 in der Membran verteilte TatA-Proteine. Dabei ist natürlich auch hier wieder zu bedenken, dass Fusionsproteine aus TatA und YFP mit all ihren potentiellen Nachteilen beobachtet wurden.

#### 4.2.2 WARUM LIEGEN DIE TATA-STRUKTUREN IM CYTOPLASMA?

Es ist überraschend, dass ein propagiertes Membranprotein wie TatA (CHANAL *et al.*, 1998; MORI *et al.*, 1999 sowie DE LEEUW *et al.*, 2001) in so großer Abundanz im Cytoplasma zu finden ist. Es stellt sich deshalb die Frage, ob die Überexpression der alleinige Grund hierfür ist und ob bei einem Wildtyp-System die Röhren vielleicht nur in der Membran zu finden wären. Dann wäre die Eigenschaft von TatA, eine längere dreidimensionale Röhre bilden zu können, reiner Zufall und die cytoplasmatische Lokalisation eine Folge der Überexpression. Gegen diese Annahme sprechen eine Reihe von Argumenten.

So konnten wir zeigen, dass TatA auch bei geringerer Expression immer noch im Cytoplasma zu finden ist (Abb. 45), was es zumindest unwahrscheinlicher macht, dass TatA auch ohne Detergensbehandlung nur auf Grund des hohen Expressionsniveaus ins Cytoplasma gezwungen wurde. Selbst bei Reinigungen aus dem Wildtypstamm MC4100 ohne jede Co-Expression war nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 130000 x g immer noch TatA im Überstand zu finden. Auch die ordnende Funktion von TatC, die Empfindlichkeit der Strukturen gegenüber von Punktmutationen in TatA sowie der Einfluss von

TatB auf den Röhrenquerschnitt sind mit einer unspezifischen Aggregation, z. B. durch Bildung von *inclusion bodies*, sehr schwer zu erklären.

Möglicherweise sind die Tat-Systeme der Proteobakterien gar nicht so verschieden von den Zweikomponentensystemen, und TatA hat wirklich eine Funktion im Cytoplasma. Dann müsste man allerdings erklären, warum TatA bisher als membranintegral galt. Dafür sprachen bisher zwei Gründe. Der erste ist der Wert der maximalen Hydrophobizität nach BOYD *et al.*, 1998. Dieser Wert (MaxH) beträgt für TatA 1,74 (CHANAL *et al.*, 1998), wobei Werte über 1,53 Membranproteine anzeigen sollen. Um diesen Widerspruch zu erklären, könnte man sich vorstellen, dass die TatA-Strukturen so organisiert sind, dass sie die hydrophoben Bereiche maskieren. Und monomeres TatA konnten wir nie direkt nachweisen. Es kann also sein, dass die oligomeren TatA-Strukturen trotz der TatA-Hydrophobizität im Cytoplasma lokalisiert sind.

Ein zweiter Grund für die bisherige Annahme, dass TatA membranintegral ist, besteht darin, dass TatA mit Membranen co-sedimentiert und durch Detergensbehandlung aus den Membranen „herausgelöst“ werden kann. Allerdings wurde dabei nicht beachtet, dass TatA auch ohne die anderen Tat-Komponenten kurze, aber hochmolekulare Röhren aus vielen Untereinheiten bildet. Diese Röhren co-sedimentieren auf Grund ihrer Größe mit den Membranen und bleiben nicht oder nur in sehr geringem Maße im Überstand. Der Einsatz von Detergenzien beeinflusst wahrscheinlich nicht die Membranständigkeit von TatA, sondern das Oligomerisierungsverhalten. Beides führt zu einer Erhöhung des Anteils an TatA in der löslichen Fraktion. Es könnte also sein, dass diese Ergebnisse eine Membranständigkeit von TatA vortäuschen, obwohl der Grund ein ganz anderer ist. Dies würde auch erklären, warum sich TatA in Form von langen Röhren ohne jede Detergensbehandlung in großen Mengen aus Membranfraktionen reinigen lässt (Abb. 38).

Es ist also durchaus möglich, dass es zwei Formen von TatA gibt: einmal in der Membran und gleichzeitig im Cytoplasma. Diese „duale Lokalisation“ kommt so z. B. in den Chloroplasten (ebenfalls ein Dreikomponenten-Tat-System) vor. Es wurde beschrieben, dass chloroplastidäres TatA in der Matrix den Tat-Transport um den Faktor 2 verbessern kann (FRIELINGSDORF *et al.*, 2008). Ähnliches wäre für TatA in *E. coli* denkbar: einerseits membranintegral, was die Interaktion mit dem Substrat-TatBC-Komplex erleichtert, und andererseits in Form von Röhren im Cytoplasma. Die These der „dualen Lokalisation“ würde auch zu den Ergebnissen der Proteaseversuche von PORCELLI *et al.*, 2002 passen. Denn obwohl man sich vorstellen kann, dass TatA in den Röhrenstrukturen etwas geschützt ist, ist es sehr unwahrscheinlich, dass es so proteaseunempfindlich ist wie ein membranintegrales Protein. Bei den Versuchen wurden Spheroplasten und invertierte Vesikel mit Proteinase K behandelt und die Auswirkungen auf TatA untersucht. Während TatA von der periplasmatischen Seite her (Spheroplasten) geschützt war, wurde

ein Großteil des TatA der invertierten Vesikel von der cytoplasmatischen Seite her abgebaut – interessanterweise jedoch nicht alles. Ein kleiner Rest verblieb, der erst abgebaut wurde, als zusätzlich zur Behandlung mit Proteinase K die Membran mit dem Detergens Triton X-100 permeabilisiert wurde. Diese Tatsache bleibt im Artikel undiskutiert, ließe sich aber elegant und entsprechend der These der „dualen Lokalisation“ mit einem gewissen Anteil an löslichem, cytoplasmatischem TatA, das in die Vesikel gelangte, erklären.

#### 4.2.3 DIE ULTRASTRUKTUR DER RÖHREN

Da TatC nötig ist, um die TatA-Röhren zu ordnen, kann man davon ausgehen, dass TatA und TatC in irgendeiner Form bei der Röhrenbildung interagieren. TatB spielt dabei keine direkte, wohl aber eine indirekte Rolle. Da TatC mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit in der Membran verankert ist, ist anzunehmen, dass TatC als eine Art Gerüst die Anlagerung der TatA-Röhren und damit deren hohe Ordnung ermöglicht. Bei diesem Prozess sind prinzipiell zwei verschiedene Varianten denkbar.

Bei der ersten Hypothese wäre TatA in jedem Fall in die Membran integriert (*membrane-only hypothesis*) und würde nur lateral mit TatC interagieren (s. Abb. 54 C). Die Röhren, und damit die cytoplasmatische Lokalisation von TatA, wären dann ein reiner Artefakt der Überexpression.

Möglich ist auch eine zweite Variante: die von uns vorgeschlagene „duale Lokalisationshypothese“ von TatA in *E. coli* (BERTHELMANN *et al.*, 2008). Diese würde eine apikale Interaktion von cytoplasmatischem TatA mit TatC beinhalten (s. Abb. 54 B). Das cytoplasmatische TatA würde dann reversibel an TatC in der Membran andocken. Abhängig vom Expressionsniveau wäre die Länge der TatA-Röhren variabel. Neben dem cytoplasmatischen TatA wäre weiteres TatA in der Membran integriert.

Die stattfindende Oligomerisierung der einzelnen TatA-Untereinheiten zu größeren Komplexen läuft wahrscheinlich über die transmembrane Helix (DE LEEUW *et al.*, 2001, PORCELLI *et al.*, 2002 und GREENE *et al.*, 2007). Eine gewisse Rolle könnte auch der Bereich spielen, der sich direkt an die amphipathische Helix anschließt (WARREN *et al.*, 2009). Ein dort entdecktes drei bis fünf Reste langes konserviertes Motiv negativ geladener Aminosäuren hatte erhebliche Auswirkungen auf die Oligomerisierungsfähigkeit entsprechender Mutantenformen von TatA. Es wurden die Mutationen D45N, D46N und E47Q eingeführt. Während alle drei Austausche einzeln zu keinem Phänotyp führten, verschwand bei einer Dreifach-Mutation das Bandenmuster in einer BN-PAGE fast vollständig, und auch die Funktionalität von TatA war stark eingeschränkt (*ibid.*). Ob diese

dreifache Mutation jedoch spezifisch ist in ihrer Funktion oder ob einfach das Gesamtprotein geschwächt wurde, bleibt unklar.

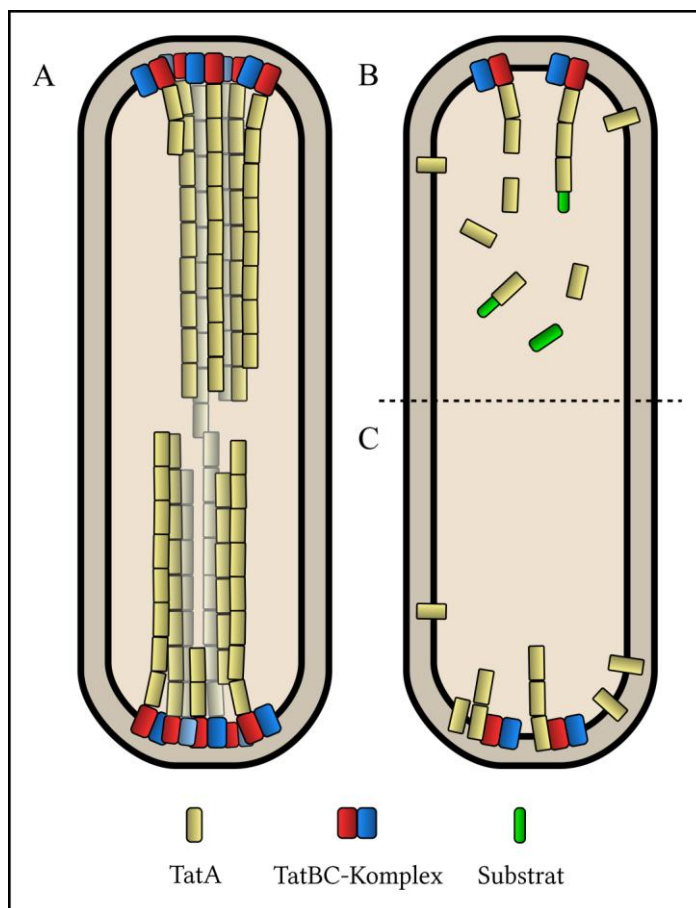
Die jeweils sechs Nachbarröhren innerhalb der Strukturen legen eine Symmetrie nahe, der die Zahl drei oder sechs zu Grunde liegt. So wäre es denkbar, dass eine einzelne Schicht der Röhren aus 6, 12 oder 18 TatA-Untereinheiten besteht. Diese ringförmigen Schichten könnten übereinandergestapelt erst kurze Zylinder und je nach Expressionsniveau längere Röhren bilden.

#### 4.2.4 DIE FUNKTION DER TATA-RÖHREN

Mit den vorliegenden Daten lässt sich über die genaue Funktion der Röhren nur spekulieren. Eines der Hauptprobleme des Tat-Weges ist der hohe Verlust an Protonen pro Transportvorgang. Da die zu translozierenden Proteine teilweise sehr groß sind, müssen die Poren oder Kanäle bzw. Membrandurchgänge, durch die der Transport abläuft, zwangsläufig mindestens ebenso groß sein. Somit ist immer auch die Funktion der Cytoplasmamembran als Protonenbarriere gefährdet. Es ist denkbar, dass die TatA-Röhren eventuell eine schützende Funktion erfüllen und, in das Cytoplasma hineinragend, einen unnötig hohen Verlust an Protonen verhindern helfen. Dafür würde sprechen, dass eine Überexpression von *tatBC* in Abwesenheit von TatA letal für die Zellen ist. Diese Letalität lässt sich am einfachsten durch *leakage* erklären, was bei großen membranintegralen Proteinen wie TatC, die auch noch große Komplexe bilden, nicht undenkbar erscheint. Da eine Überexpression von *tatA* diesen Effekt völlig aufhebt, wirkt es anscheinend auch als abdichtender Faktor. Dies könnte eventuell durch eine Umhüllung der Substrate bzw. des Translokons geschehen. Dabei erscheint es als nicht zufällig, dass der Innendurchmesser der TatA-Röhren (6,7 nm) in etwa dem Durchmesser der größten Tat-Substrate (6-7 nm laut BERKS *et al.*, 2000b) entspricht. Der Durchmesser deckt sich auch genau mit den Daten über die Tat-Poren, die SARGENT *et al.*, 2001 und GOHLKE *et al.*, 2005 beschrieben haben (6,5-7 nm). Im Unterschied zu unseren Untersuchungen, die völlig ohne Detergenzien durchgeführt wurden, hatten die oben genannten Autoren das zwitterionische Detergens CHAPS verwendet. Eventuell führten diese Behandlungen zum Zerschneiden der TatA-Röhren in die einzelnen, ringähnlichen Untereinheiten, die dann als Poren interpretiert wurden.

TatA nimmt die Substrate vielleicht im Cytoplasma in Empfang, entweder direkt in einer bestehenden Röhre oder indem es sich neu um das Substrat herum anordnet. Das Substrat würde dann zum TatBC-Komplex geleitet. Im Anschluss an die Bindung vom Substrat an TatBC würde auch TatA fest gebunden und die Translokation fände statt

(Abb. 54 B). Dabei ist es nicht selbstverständlich, dass TatA auch die membranpenetrierende Röhre bildet, auch wenn dies möglich wäre. Der Transport könnte auch – nach dem *membrane weakening and pulling*-Mechanismus (BRÜSER und SANDERS, 2003) – ohne eine definierte Pore direkt durch die Membran mit TatC als Motor ablaufen. TatA würde dabei nur zur cytoplasmatischen Seite hin die Abschirmung übernehmen. Dies würde auch erklären, wie TatC bei einer längeren abgeschlossenen Röhre die Motorfunktion übernehmen kann, wenn es nicht selbst Teil der Röhre ist und deshalb keinen direkten Zugang zum Substrat hat.



**Abb. 54: Schema der möglichen Organisation des Tat-Systems in der Zelle.** Das Bild A zeigt die Situation, wie sie wahrscheinlich bei einer hohen Überexpression von *tatABC* existiert. Die Zahl der TatBC-Komplexe und damit die Anzahl der Andockstellen für die extrem langen TatA-Röhren ist erhöht. Die Bilder B und C versuchen zu approximieren, wie es im Wildtyp aussehen könnte. Bild B verdeutlicht die Situation für den Fall der „dualen Lokalisationshypothese“, beschrieben in BERTHELMANN *et al.*, 2008. Bild C hingegen beruht auf der lateralen Interaktion von TatA und TatC im Fall der „*membrane-only hypothesis*“ (*ibid.*). In B ist außerdem noch die mögliche *targeting*-Funktion von TatA durch das „eingefangene“ Substrat angedeutet.

Es ist auch gut vorstellbar, dass die Rekrutierung von TatA eine Verlängerung der unter Umständen bei Wildtyp-Bedingungen sehr kurzen Röhren nach sich zieht (für einen Vergleich der Situation im Wildtyp und unter Überexpressionsbedingungen s. Abb. 54). Eine rhythmische Verlängerung und Verkürzung wären denkbar. Ein Indiz für diese These ist, dass eine Überexpression von Tat-Substraten die durch eine gleichzeitige Überexpression von *tatABC* sichtbar gemachten Röhrenstrukturen kleiner und seltener auffindbar werden lässt (Abschnitt 3.3.7). Je häufiger Translokationen stattfinden und je mehr Translokons aktiv sind, desto schneller würde der Abbau der Röhren auf eine voll

funktionsfähige Länge geschehen. Denn die extrem langen Röhren, die in den HPF-fixierten Schnitten zu finden sind, entstehen nur durch die Überexpression und entsprechen in ihrer Länge sicherlich nicht dem funktionsfähigen Typ. Transport durch solch lange Röhren ist kaum denkbar, wenn das denn die Funktion der Röhren ist. Kurze und eventuell auch zeitlich schwer fassbare Röhrenstrukturen hingegen wären bei Wildtyp-Expressionsniveau mit allen zur Verfügung stehenden Methoden wie Immuno-Gold-Markierung bzw. optischer Lokalisation mit fluoreszierenden Fusionspartnern schwierig zu detektieren und wären zumindest scheinbar immer an oder in der Membran lokalisiert. Und das, auch ohne dass sie zwingend membranintegral wären.

Diese Ungenauigkeit kommt im optischen System durch die geringe Auflösung zustande. Bei der Immuno-Gold-Markierung befinden sich zwischen der Probe und dem Goldpartikel immer sowohl der primäre als auch der sekundäre Antikörper. Dies führt dazu, dass der elektronendichte schwarze Punkt in der Aufnahme nicht genau über dem Epitop entsteht, sondern in einem gewissen Radius<sup>17</sup> darum herum. Dies macht völlig exakte Lokalisierungen und damit Unterscheidungen von membranintegralen und membranadhäsiven Proteinen mit diesem Verfahren unmöglich.

Es wäre auch vorstellbar, dass die TatA-Röhren überhaupt nicht essentiell sind für das Tat-System in *E. coli*, sondern dass ihre Funktion eher optimierender Art ist und ihre Anwesenheit den Verlust an Protonen, der ohnehin schon sehr hoch ist, verringert. Denkbar wäre sogar, dass nicht alle, sondern nur bestimmte Substrate von den TatA-Röhren profitieren. Die Funktionalität von TatA-GFP ist ein Hinweis darauf.

#### 4.2.5 SIND DIE TATA-RÖHREN EINE NATÜRLICHE STRUKTUR?

Ohne Detergensbehandlung bildet TatA auch in Abwesenheit der anderen Tat-Komponenten längliche Röhren (Abb. 38). Das Stressantwort-Protein PspA, welches bei Reinigungen von TatA z. B. über eine His-tag-Säule immer co-eluiert wird (Abb. 39), besitzt keinen essentiellen Einfluss auf die Röhrenbildung, da diese Strukturen auch in einer PspA-Mutante gebildet werden.

Die Tatsache, dass drei von vier TatA-Mutationen (D31G, G33S, F39A und F39K) eine Korrelation von TatA-Funktion und Fähigkeit zur Bildung geordneter Röhren zeigen (Abb. 47 und Abb. 48), ist ein Indiz dafür, dass die TatA-Röhren eine Funktion innerhalb des Tat-Systems erfüllen. Die drei Stämme, die weder TatA-Röhren bilden noch ein aktives Tat-System besitzen (G33S, F39A und F39K), sind kein zwingender Beweis für eine Funktion der TatA-Röhren. Allerdings ist der Stamm D31G, der zwar noch Röhren bil-

---

<sup>17</sup> Der Radius beträgt etwa 20 nm und ist damit weit größer als die Cytoplasmamembran dick ist (etwa 6 bis 8 nm).

det, aber trotzdem keine TatA-Funktion mehr besitzt, auch kein Gegenbeweis, denn man kann argumentieren, dass TatA eine Reihe von Eigenschaften besitzt, allen voran die Bindung an den TatBC-Substrat-Komplex, die sehr wichtig sind für die Translokation. Sicherlich auch aus diesem Grund existieren eine ganze Reihe von essentiellen Aminosäuren in TatA (HICKS *et al.*, 2005). Diese erfüllen im Gesamtprotein mit hoher Wahrscheinlichkeit sehr unterschiedliche Aufgaben. Es ist deshalb durchaus denkbar, dass ein an einer Aminosäure mutiertes TatA zwar noch die Fähigkeit zur Röhrenbildung behält, aber wegen eines anderen Defektes nicht mehr an der Translokation von Proteinen beteiligt sein kann.

Aus diesen Gründen können Mutationsstudien keinen Beweis liefern für oder gegen die *in vivo*-Relevanz der TatA-Röhren. Indizien für eine physiologische Bedeutung sind sie aber allemal, denn es erscheint unwahrscheinlich, dass die TatA-Röhrenbildung zufällig von essentiellen Aminosäuren abhängig sein soll, auch wenn es nach unserem bisherigen Wissen nicht ausgeschlossen werden kann.

Weitere Indizien, die gegen einen Überexpressionsartefakt sprechen, sind die TatC-Abhängigkeit, der Einfluss von TatB sowie das Vorhandensein der Verbindungen zwischen den einzelnen Röhren. Außerdem sind die TatA-Röhren sehr uniform und besitzen einen Innendurchmesser, der ziemlich genau Platz für die größten Tat-Substrate (s. Abschnitt 1.2.1) bieten würde. Auch die Verbesserung des Transportes durch verstärkte Expression von *tatABC* spricht eindeutig gegen die Bildung inaktiver Aggregationen. All dies deutet darauf hin, dass tatsächlich kurze TatA-Röhren bei einem Wildtyp-Expressionsniveau existieren und diese erst durch die Überexpression von *tatABC* bzw. *tatAC* sehr viel länger und damit sichtbar werden. Die TatA-Röhren scheinen eine bislang ungeklärte Rolle bei der Translokation von Proteinen durch das Tat-System zu spielen.

#### 4.3 DIE LOKALISATION DER TAT-SUBSTRATE UND DES AKTIVEN TRANSLOKONS

Als eine weitere Möglichkeit, die Translokons des Tat-Systems zu lokalisieren, wurde nicht nur von uns frühzeitig die Beobachtung von Substraten bei deren Transport über die Membran angesehen (SANTINI *et al.*, 2001). Dies ist theoretisch sehr viel einfacher möglich als eine Untersuchung der Tat-Komponenten, denn während man letztere erst an fluoreszierende Partner fusionieren muss, kann man bei den Tat-Substraten an Stelle natürlicher Substrate gleich fluoreszierende Proteine verwenden. Dies erübrigt große Fusionen, minimiert mögliche Fehlerquellen und stellt gleichzeitig sicher, dass man ein ge-

faltetes Protein beobachtet. Denn GFP fluoresziert, so wie seine vielen Derivate auch, nur als gefaltetes Protein in seiner charakteristischen  $\beta$ -barrel-Form mit zentralem Fluorophor. Für diese Herangehensweise ist es nur notwendig, ein fluoreszierendes Protein mit einem C-terminalen Signalpeptid zu fusionieren, wobei das Signalpeptid im Vergleich zum Gesamtprotein recht klein ist.

#### 4.3.1 TENDIERT GFP ZU AGGREGATIONEN?

Studien mit GFP habe ich schon als Teil meiner Diplomarbeit (BERTHELMANN, 2004 und BERTHELMANN und BRÜSER, 2004) durchgeführt. Auffallend an den polar lokalisierten Ansammlungen von DmsA-SP-GFP, wie sie z. B. in Abb. 18 gezeigt werden, ist vor allem die zeitliche Komponente. So bilden Zellen diese Ansammlungen erst nach einer gewissen Zeit (vgl. Abb. 18 und Abb. 20), was ein Indiz dafür sein könnte, dass es sich hierbei um cyto- oder periplasmatische Aggregationen handelt, die erst ab einer gewissen Konzentration an transportiertem oder aber auch nicht transportierbarem Protein auftreten. Andererseits sieht man, dass gerade die Zellen in Abb. 20, die keine polaren Punkte aufweisen, sondern deren Fluoreszenz gleichmäßig im Cytoplasma verteilt ist, besonders stark leuchten. Oder anders gesagt: Zellen ohne starke Expression neigen eher zu polaren Ansammlungen. Dies spricht gegen die Möglichkeit, dass die Ansammlungen an den Polen nur durch die Überexpression und die – durch den stetig steigenden Level an GFP hervorgerufene – Aggregation entstehen, und gegen die Annahme, dass die untersuchten Proteine im „Mülleimer der Zelle“ gelandet sind. Hinzu kommt, dass im Fall unspezifischer Aggregationen solche polaren *spots* auch in Zellen mit einem KK-Signalpeptid zu erwarten gewesen wären (Abb. 21). Dort treten sie jedoch nicht auf.

Im Rahmen des „Genome Analysis Project in Japan“ wurde mit der ASKA-Bibliothek<sup>18</sup> eine riesige Kollektion von *open reading frames* (ORF) des Bakteriums *E. coli* K-12 W3110 geschaffen. Alle Gene wurden dabei auch mit einer GFP-Fusion exprimiert und einer sehr groben mikroskopischen Untersuchung unterworfen. Immerhin 25 von 28 Tat-Substraten in *E. coli* sind im Zuge dessen in der ASKA-Bibliothek mit GFP versehen und untersucht worden. Von diesen 25 sind 17 (also etwa 70%) laut dieser Untersuchung cytoplasmatisch verteilt, und die restlichen 8 (30%) zeigen mehr oder weniger deutlich polare Aggregationen. Besonders auffällig sind diese punktuellen Ansammlungen z. B. bei YcdB, FhuD und TorZ. Dies ist bemerkenswert, weil sowohl die Expressions- als auch die experimentellen Bedingungen bei allen GFP-Fusionen identisch

---

<sup>18</sup> ASKA steht für „A complete Set of *E. coli* K-12 ORF Archive“. Es ist Teil des „Genome Analysis Project in Japan“ und steht unter der URL <http://ecoli.naist.jp/GB6/search.jsp> zur Verfügung (Stand: 14.07.2009).



waren. Es erscheint also möglich, dass die Lokalisationen der verschiedenen Substrate in *E. coli* nicht alle gleich sind. Dann wären einige Substrate auch unter *in vivo*-Bedingungen polar und andere nicht. Obwohl bei diesen Ergebnissen wie bei allen GFP-Studien das *caveat* der Artefaktbildung durch die großen fluoreszierenden Fusionspartner gegeben ist, sind diese Daten durchaus ein Hinweis darauf, dass GFP nicht automatisch zu einer Aggregation an den Polen führen muss. Es ist möglich, dass verschiedene Signalpeptide unterschiedliche Lokalisationen bedingen bzw. bevorzugen.

Trotzdem muss man die Ergebnisse in Abschnitt 3.2.1 mit Vorsicht interpretieren und stets darauf achten, dass man, wenn man mit GFP arbeitet, am besten ein Kontrollexperiment unter gleichen Bedingungen durchführt, das ausschließt, dass das GFP für die beobachtete Lokalisation verantwortlich ist.

#### 4.3.2 DIE INDIREKTE VARIANTE

Ein solches im vorherigen Abschnitt erwähntes Kontrollexperiment wurde möglich durch ein Konstrukt meiner Kollegin Silke Richter (RICHTER, 2009). Ihr – in einem anderen Zusammenhang entstandenes – Fusionsprotein aus einem Signalpeptid, einem 110 Aminosäuren langen ungefalteten Bereich und einem GFP (HipSP-FG5-GFP-RR) erwies sich als hervorragend geeignet, um die Lokalisation des Tat-Translokons zu untersuchen. Denn das Fusionsprotein wird, zwar vom Translokon erkannt, aber nicht transportiert (*ibid.* und Abb. 24). Wie in Abb. 25 zu sehen, ist das Fusionsprotein HipSP-FG5-GFP-RR teilweise in der Zelle verteilt zu finden, aber auch immer deutlich an den Zellpolen konzentriert. Silke Richter spekuliert in ihrer Promotionsschrift (*ibid.*), dass die polaren Punkte durch aggregiertes, in die Membran entlassenes HipSP-FG5-GFP-RR entstehen.

Das bemerkenswerte an dieser Methode ist, dass eine Mutante, bei der das Signalpeptid an zwei Stellen geändert wurde (HipSP-FG5-GFP-KK), diese polaren Punkte nicht mehr aufweist (vgl. Abb. 25 und Abb. 26). Dies ist spannend, weil man durch nur zwei Austausche (RR>KK), die das *consensus*-Motiv des Tat-Systems zerstören, eine komplett andere Lokalisation des Fusionsproteins hervorgerufen hat. Dadurch kann man mit hoher Sicherheit Artefakte, die durch eine eventuelle Aggregationsneigung des GFP, das Fusionsprotein mit seinen ungefalteten Bereichen oder die vielleicht zu hohen Expressionsbedingungen entstanden sein könnten, ausschließen. Denn bis auf diese zwei Austausche, die als Kern des Signalpeptids für das Substrat den Schlüssel zum Tat-System darstellen, ist in beiden Stämmen alles identisch – so identisch, dass sich trotz etlicher Versuche keine proteinbiochemischen Unterschiede zwischen HipSP-FG5-GFP-RR und

HipSP-FG5-GFP-KK sowohl mit als auch ohne *tatABC*-Überexpression finden ließen (Abb. 27).

Einen Nachteil hat die Methode jedoch. Um die polaren Punkte sichtbar zu machen, ist nach wie vor eine Überexpression von *tatABC* erforderlich. Ohne zusätzliches *TatABC* war ausschließlich cytoplasmatische und gleichmäßig verteilte Fluoreszenz sichtbar (Abb. 28). Einerseits untermauert diese Tatsache die *Tat*-Abhängigkeit der Substrat-Foci an den Polen, andererseits wäre es wünschenswert gewesen, diese Punkte auch ohne Co-Expression von *tatABC* detektieren zu können. Dass dies nicht möglich war, lässt sich eventuell damit erklären, dass die Anzahl der Translokons in Zellen ohne *tatABC*-Überexpression geringer war als in Zellen mit zusätzlichem *TatABC*. Und weniger Translokons bedeuten weniger Andockstellen für das Substrat, was wiederum das Verhältnis von gebundenem und frei im Cytoplasma liegendem Substrat verschiebt. Letzteres überstrahlte dann wahrscheinlich die polaren Punkte. Das Verhältnis änderte sich auch dann nicht gravierend, wenn erheblich weniger *hip<sup>SP</sup>-nspR5-gfp* exprimiert wurde. Auch bei sehr geringen Induktionsleveln verschob sich das Verhältnis nicht so weit, dass polare Punkte auch ohne *tatABC*-Überexpression detektiert werden konnten.

Tab. 21: Lokalisation von transportinkompetenten Substraten

Stamm	exprimierte Gene		Lokalisation von HipSP-FG5-GFP-RR/KK
MC4100	<i>hip<sup>SP</sup>-nspR5-gfp-RR</i>	<i>tatABC</i>	polare Punkte
"	<i>hip<sup>SP</sup>-nspR5-gfp-KK</i>	<i>tatABC</i>	gleichmäßig im Cytoplasma verteilt
"	<i>hip<sup>SP</sup>-nspR5-gfp-RR</i>	-	"
"	<i>hip<sup>SP</sup>-nspR5-gfp-KK</i>	-	"
DADE	<i>hip<sup>SP</sup>-nspR5-gfp-RR</i>	<i>tatABC</i>	polare Punkte
"	<i>hip<sup>SP</sup>-nspR5-gfp-KK</i>	<i>tatABC</i>	gleichmäßig im Cytoplasma verteilt
"	<i>hip<sup>SP</sup>-nspR5-gfp-RR</i>	<i>tatA</i>	"
"	<i>hip<sup>SP</sup>-nspR5-gfp-RR</i>	<i>tatAB</i>	"
"	<i>hip<sup>SP</sup>-nspR5-gfp-RR</i>	<i>tatAC</i>	"
MC1000 $\Delta$ <i>mreB</i>	<i>hip<sup>SP</sup>-nspR5-gfp-RR</i>	<i>tatABC</i>	"
"	<i>hip<sup>SP</sup>-nspR5-gfp-RR</i>	<i>tatABC; mreBCD</i>	"

Die Tab. 21 fasst die verschiedenen Stämme zusammen, die alle auf die Anwesenheit von polaren Punkten von HipSP-FG5-GFP getestet wurden. Es fällt auf, dass nur in zwei Fällen polare Punkte gefunden wurden: im Wildtypstamm MC4100 bei gleichzeitiger Überexpression von *tatABC* bzw. im  $\Delta$ *tatABCDE*-Stamm DADE ebenfalls nur bei Co-Expression aller drei essentiellen *Tat*-Komponenten. Weder *tatA*- noch *tatAB*- oder *tatAC*-Überexpression reichten aus. Ganz ohne zusätzliches *tatABC* war der Level an *Tat*-

Komponenten zu gering, das Signalpeptid war zwingend notwendig, und MreB spielte eine Rolle, denn sowohl die Deletion von *mreB* als auch eine Überexpression von *mreBCD* führten zu gleichmäßiger Verteilung der Fluoreszenz.

#### 4.3.3 DIE LOKALISATION DES TATBC-KOMPLEXES

Da seit langem bekannt ist, dass das Substrat zusammen mit TatBC den sogenannten TatBC-Substrat-Komplex bildet (CLINE und MORI, 2001), ist es naheliegend, TatBC auch an den Polen zu lokalisieren, weil hauptsächlich dort das Substrat HipSP-FG5-GFP-RR fluoresziert. Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass TatC die einzige Tat-Komponente ist, die das RR-Motiv erkennt (ALAMI *et al.*, 2003 und GERARD und CLINE, 2006), und weil die Ergebnisse in Abschnitt 3.2.2 gezeigt haben, dass die Lokalisation von HipSP-FG5-GFP-RR bzw. HipSP-FG5-GFP-KK ausschließlich vom *twin-arginine*-Motiv bestimmt wird. Ebenso ist es wichtig zu erwähnen, dass weder eine Überexpression von *tatA*, *tatAB* oder *tatAC* ausreichte, um die polaren Punkte zu induzieren (Abb. 29). Nur bei einer Co-Expression von *tatABC* und *hip<sup>SP</sup>-nspR5-gfp* wurden Punkte beobachtet. Diese Abhängigkeit von der Anwesenheit des TatBC-Komplexes ist ein weiterer Hinweis für die wahrscheinliche Co-Lokalisation von TatBC und dem Substrat HipSP-FG5-GFP-RR.

Auch die Sensitivität der fluoreszierenden Punkte gegenüber dem Entkoppler CCCP deutet auf eine Relevanz des Tat-Systems hin, da die protonenmotorische Kraft Voraussetzung für die Bindung des Substrates an den TatBC-Komplex ist (GERARD und CLINE, 2007). Die Punkte stellen eventuell keine dauerhaften Aggregationen von Transportintermediaten dar, sondern scheinen eher durch reversible und kurzfristige Interaktionen vom TatBC-Komplex mit dem Substrat zu entstehen. Dies erklärt die leichte Verzögerung, mit der sich die fluoreszierenden Punkte bei CCCP-Behandlung auflösen.

Natürlich passen auch unsere Lokalisationsergebnisse mit TatC-GFP ohne und mit gleichzeitiger Überexpression von *tatABC* (Abb. 16 bzw. Abb. 17) sowie die Lokalisation von TatB-GFP bei allen Expressionsbedingungen (Abb. 11 und Abb. 12) sehr gut ins Bild eines polaren TatBC-Komplexes. Dass dies wahrscheinlich auch in anderen Organismen so ist, zeigen Untersuchungen in *B. subtilis*, nach denen TatCy in distinkten Punkten an den Polen und teilweise an der Teilungsebene konzentriert ist (MEILE *et al.*, 2006 und RIDDER *et al.*, 2009).

Allerdings gibt es auch eine Veröffentlichung, die einer polaren Lokalisation von TatC widerspricht. So publizierten RAY *et al.*, 2005 Daten aus *E. coli*, nach denen TatC-GFP membranintegral und hauptsächlich gleichmäßig verteilt vorkommt. Nur teilweise war

es in Punkten konzentriert, die unter jenen Bedingungen aber ebenfalls verteilt in der Membran vorkamen und nicht an den Polen lokalisiert waren. Auch TatB-GFP wurde von dieser Arbeitsgruppe als eher verteilt angesehen, obwohl ihre Bilder den unseren verblüffend ähneln und praktisch alle Zellen polare Punkte aufweisen. Da bei allen diesen Studien jedoch immer XFPs (CFP, GFP oder YFP) zur Fusion an die Tat-Komponenten eingesetzt wurden, müssen stets die schon erwähnten Nachteile von Fusionsproteinen berücksichtigt werden, denn die Tat-Komponenten haben (wie in Abschnitt 4.1.1.1 gezeigt) andere Eigenschaften, wenn sie an GFP fusioniert werden. Die Ergebnisse mit GFP als transportinkompetentem Tat-Substrat sind deshalb in meinen Augen sehr viel aussagekräftiger, weil die Wahrscheinlichkeit von Artefakten geringer sind.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass TatC und damit auch der TatBC-Komplex in *E. coli* wahrscheinlich hauptsächlich in polaren Regionen in der Cytoplasmamembran lokalisiert ist und auch der Transport dort stattfindet.

#### 4.3.4 DER EINFLUSS POLARER DETERMINANTEN AUF DAS TAT-TRANSLOKON

Sehr interessant war, dass die Deletion von MreB nicht nur einen Einfluss auf die Zellform, sondern auch auf die polaren Punkte von HipSP-FG5-GFP-RR hatte (Abb. 30). Da MreB wahrscheinlich eine polare Determinante für eine Reihe von Proteinen ist (GITAI *et al.*, 2004 und SHIH *et al.*, 2005), nährt dies die These, dass die polare Lokalisation von HipSP-FG5-GFP-RR ihren Grund in der ebenfalls polaren Lokalisation des TatBC-Komplexes hat. Es ist jedoch kein schlüssiger Beweis, denn der Effekt könnte auch indirekter Natur sein. Immerhin zeigen die MreB-Mutanten einen sehr auffälligen Wachstumsphänotyp, der wahrscheinlich eine ganze Reihe von sekundären Effekten nach sich zieht.

Überraschend war, dass der Versuch der Komplementation fehlschlug. Die *in trans*-Expression von *mreB* konnte zwar die Zellmorphologie komplementieren, führte aber nicht zu einer Wiederkehr der polaren Punkte (Abb. 31). Dies lässt sich vielleicht durch die Ergebnisse von ALLARD und RUTENBERG, 2007 erklären, die herausfanden, dass die MreB-abhängige polare Lokalisation der integralen Membranproteine PleC, DivJ und CckA in *Caulobacter crescentus* sowohl durch Unter- als auch durch Überexpression von *mreB* verhindert wurde. Unabhängig davon, ob MreB also selbst eine polare Determinante darstellt oder ob der Effekt indirekter Natur ist, ist das Expressionsniveau anscheinend von eminenter Bedeutung und selbst kleinere Abweichungen – die bei einer Überexpression schwer zu verhindern sind – führen zu einer Fehllokalisation der von MreB abhän-

gigen Proteine. Dies erklärt vermutlich die in Abb. 31 gezeigte nicht erfolgte Komplementation der Punktbildung an den Polen.

Eine weitere Mutante, die getestet wurde, war der  $\Delta minCDE$ -Stamm PB114 (Abb. 32). Das Min-System ist maßgeblich an der Festlegung des Ortes der Septumbildung beteiligt und ermöglicht so die Zellteilung. Der entsprechende Mutantenstamm zeigte einen extremen Wachstumsphänotyp. Durch die Unfähigkeit zur regelmäßigen Zellteilung wuchsen die Zellen zu langen Schläuchen heran. Ähnlich wie bei der Fluoreszenz von DmsA-SP-GFP interferierte das fehlende Min-System nicht mit der Punktbildung. Zellen, die neben *tatABC* auch noch *hip<sup>SP</sup>-nspR5-gfp-KK* exprimierten, besaßen sogar nicht nur zwei Punkte an den Zellpolen, sondern eine Vielzahl von Punkten. Diese Lokalisationen entsprechen höchstwahrscheinlich den zukünftigen Polarregionen, die aber durch die fehlenden Septa nicht zu Polen geworden sind. Solche lateralen *cluster* kennt man z. B. von den Chemorezeptor-Komplexen in *E. coli* (THIEM *et al.*, 2007).

Eine sehr ähnliche Verteilung mit alternierenden lateralen Signalen wurde auch in einem  $\Delta minCD$ -Stamm für *inclusion bodies* von IbpA-YFP gefunden (LINDNER *et al.*, 2008 Abb. 1 H). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde 2008 ein Artikel veröffentlicht, in dem die Autoren mit Hilfe komplexer mathematischer Modelle zu zeigen versuchen, dass die beobachtete Periodizität von einzelnen *clustern* unabhängig von dedizierten Mechanismen spontan entstehen kann (WANG *et al.*, 2008). Ist diese Theorie korrekt, dann hätte dies weitreichende Implikationen für eine Vielzahl von Lokalisationsstudien. Doch während diese These eventuell die gerade bei TatB-GFP hin und wieder aufgetretenen periodischen lateralen Punkte (Abb. 13) erklären könnte, ist sie mit hoher Wahrscheinlichkeit keine Erklärung für die Punkte im  $\Delta minCDE$ -Stamm PB114 in Abb. 32. Gründe dafür sind einerseits der Unterschied zwischen den Zellen, die *hip<sup>SP</sup>-nspR5-gfp-RR* bzw. *hip<sup>SP</sup>-nspR5-gfp-KK* exprimieren. Im Fall einer unspezifischen spontanen Entstehungsweise wäre kein Einfluss des Signalpeptids zu erwarten gewesen. Andererseits spricht die – gerade bei dem  $\Delta minCDE$ -Stamm PB114 beobachtete – CCCP-Sensitivität (Abb. 33) gegen unspezifische Aggregationen. Die zusätzlichen Punkte wären zudem dann auch im Wildtyp zu erwarten gewesen (Abb. 25) und nicht nur in der  $\Delta minCDE$ -Mutante.

#### 4.4 DIE LOKALISATION DES TAT-SYSTEMS

Obwohl man bisher nicht mit endgültiger Sicherheit Aussagen über die Lokalisation des Tat-Systems machen kann, so deuten die vorhandenen Ergebnisse auf eine Polarität des Tat-Systems hin. TatB und TatC kommen als Komplex wahrscheinlich in eng gepackten Bereichen an den Zellpolen vor und interagieren während bzw. direkt vor dem Transport

mit cytoplasmatischem und membranintegralelem TatA. Letzteres bildet mehr oder weniger lange Röhren, die in das Cytoplasma protudieren und auf unbekannt Art und Weise beim Transport helfen. Ob die Röhren dabei als fester oder dynamischer Transportkanal, als *targeting*-Faktor oder nur unterstützend durch Abschirmung gegen Protonenverlust funktionieren, ist dabei noch unklar. Die Röhren selbst scheinen aus sechs oder einem Vielfachen von sechs Untereinheiten zu bestehen. Auch die TatBC-Komplexe werden sich wahrscheinlich als Startpunkte in einer identischen Symmetrie in der Membran organisieren.

Wenn dies alles so zutrifft, dann stellt sich die Frage, warum das Tat-System gerade an den Zellpolen organisiert ist. Die Konzentration der Translokons ist eventuell durch mechanistische und energetische Überlegungen zu erklären. Eventuell ist die Abschirmung des Transports einfacher, wenn viele Translokons eng beieinander liegen. Die „Schadensbegrenzung“ im Sinne der Eindämmung des Protonenverlustes ist bei dem ohnehin sehr energieintensiven Tat-System sicherlich ein evolutionär treibender Faktor für die Zellen. Die Nähe der Translokons zueinander könnte es auch erleichtern, die Membran während des Transportes zu destabilisieren bzw. zu stabilisieren. Dabei und bei der Abschirmung könnte z. B. schon die Krümmung der Cytoplasmamembran an den Polen eine Rolle spielen. Auch könnten die polaren Regionen selbst Vorteile für den Transport bringen. So ist die Zusammensetzung der Membran anders an den Polen, was einerseits einen Einfluss auf die Lokalisation von Proteinen haben kann (MASCARENHAS *et al.*, 2001 und ROMANTSOV *et al.*, 2008) und andererseits eventuell den Membrandurchtritt erleichtern könnte. Dies würde besondere Relevanz erlangen, wenn TatA nicht als Kanal fungiert, sondern sich das *membrane weakening and pulling*-Modell (BRÜSER und SANDERS, 2003) als richtig herausstellt und das Substrat direkt durch eine geschwächte Membran gezogen wird

Eine weitere Möglichkeit liegt in der Natur der Zellteilung begründet. Von der Festlegung der Septumsebene bis hin zur Einschnürung ist es ein langer und komplexer Prozess, an dem viele Proteine beteiligt sind und bei dem die Struktur der Membran unmittelbar am Septum stark geändert wird. Eventuell behindern diese Prozesse den Tat-Transport, und die Translokons sind auf Grund einer Art negativer Attraktion so weit wie möglich entfernt von der Zellteilungsebene lokalisiert.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Werden die vorliegenden Daten der verschiedenen Experimente betrachtet, gibt es eine Reihe von Hinweisen, die darauf hindeuten, dass das Tat-System nicht gleichmäßig in der Membran verteilt ist, sondern hauptsächlich an den Polen funktioniert. So besitzen sowohl die TatB- als auch teilweise die TatC-GFP-Fusionen anscheinend eine gewisse polare Affinität, die auf eine Polarität des TatBC-Komplexes hinweist. Transportierte Tat-Substrate akkumulieren zeitabhängig an den Zellpolen, und transportinkompetente Substrate bilden definierte Punkte an den Zellpolen, solange *tatA*, *tatB* und *tatC* überexprimiert werden und das Signalpeptid vom Tat-System erkannt werden kann. Auch die polare Determinante MreB muss verfügbar sein.

TatA-GFP befindet sich bei Überexpression gleichmäßig verteilt in der Membran. Ohne GFP-Fusion allerdings kommt TatA fast ausschließlich in langen, cytoplasmatischen Röhren vor, die oft in Kontakt mit einem oder beiden Zellpolen stehen. Dort findet wahrscheinlich auch die Interaktion mit TatB und TatC statt. Die Anwesenheit von TatC ist Grundvoraussetzung für die Beobachtbarkeit der langen, geordneten TatA-Röhren und das, obwohl TatA auch allein Röhren bilden kann. Diese Strukturen haben genau definierte Maße, scheinen untereinander verbunden zu sein und sind sehr sensitiv gegenüber Mutationen in TatA. Auch TatB spielt eine Rolle und beeinflusst die Form der Röhren, obwohl es nicht essentiell für deren Bildung ist. Es besteht wahrscheinlich eine Korrelation zwischen der Funktionalität von TatA und der Anwesenheit der Röhren, was darauf hindeutet, dass die TatA-Röhren keine einfachen Artefakte sind. Mögliche Funktionen der – unter Wildtyp-Bedingungen sicherlich sehr viel kürzeren – Röhren wären zum Beispiel die Abschirmung des Transportes, um den Protonenverlust niedrig zu halten, oder auch eine Art Kanalisierung und Weiterreichung der Substrate zum TatBC-Komplex.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- ALAMI, M., I. LUKE, S. DEITERMANN, G. EISNER, H. G. KOCH, J. BRUNNER und M. MÜLLER (2003). "Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in *Escherichia coli*." Mol Cell **12**(4): 937-46.
- ALDER, N. N. und S. M. THEG (2003). "Energetics of protein transport across biological membranes: A study of the thylakoid  $\Delta$ pH-dependent/cpTat pathway." Cell **112**(2): 231-42.
- ALLARD, J. F. und A. D. RUTENBERG (2007). "Steady-state helices of the actin homolog MreB inside bacteria: dynamics without motors." Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys **76**(3 Pt 1): 031916.
- AUSMEES, N., J. R. KUHN und C. JACOBS-WAGNER (2003). "The bacterial cytoskeleton: an intermediate filament-like function in cell shape." Cell **115**(6): 705-13.
- BABA, T., T. ARA, M. HASEGAWA, Y. TAKAI, Y. OKUMURA, M. BABA, K. A. DAT-SENKO, M. TOMITA, B. L. WANNER und H. MORI (2006). "Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection." Mol Syst Biol **2**: 2006 0008.
- BACKERT, S. und M. SELBACH (2008). "Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis." Cell Microbiol **10**(8): 1573-81.
- BAGCHI, S., H. TOMENIUS, L. M. BELOVA und N. AUSMEES (2008). "Intermediate filament-like proteins in bacteria and a cytoskeletal function in *Streptomyces*." Mol Microbiol **70**(4): 1037-50.
- BAGESHWAR, U. K. und S. M. MUSSER (2007). "Two electrical potential-dependent steps are required for transport by the *Escherichia coli* Tat machinery." J Cell Biol **179**(1): 87-99.
- BARDY, S. L. und J. R. MADDOCK (2007). "Polar explorations Recent insights into the polarity of bacterial proteins." Curr Opin Microbiol **10**(6): 617-23.
- BARRETT, C. M. und C. ROBINSON (2005). "Evidence for interactions between domains of TatA and TatB from mutagenesis of the TatABC subunits of the twin-arginine translocase." Febs J **272**(9): 2261-75.
- BAYLISS, R., T. LITTLEWOOD und M. STEWART (2000). "Structural basis for the interaction between FxFG nucleoporin repeats and importin-beta in nuclear trafficking." Cell **102**(1): 99-108.
- BEALL, B. und J. LUTKENHAUS (1991). "FtsZ in *Bacillus subtilis* is required for vegetative septation and for asymmetric septation during sporulation." Genes Dev **5**(3): 447-55.
- BEHRENDT, J., U. LINDENSTRAUß und T. BRÜSER (2007). "The TatBC complex formation suppresses a modular TatB-multimerization in *Escherichia coli*." FEBS Lett **581**(21): 4085-90.
- BEHRENDT, J., K. STANDAR, U. LINDENSTRAUß und T. BRÜSER (2004). "Topological studies on the twin-arginine translocase component TatC." FEMS Microbiol Lett **234**(2): 303-8.



- BERKS, B. C. (1996). "A common export pathway for proteins binding complex redox co-factors?" Mol Microbiol 22(3): 393-404.
- BERKS, B. C., T. PALMER und F. SARGENT (2005). "Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway." Curr Opin Microbiol 8(2): 174-81.
- BERKS, B. C., F. SARGENT, E. DE LEEUW, A. P. HINSLEY, N. R. STANLEY, R. L. JACK, G. BUCHANAN und T. PALMER (2000a). "A novel protein transport system involved in the biogenesis of bacterial electron transfer chains." Biochim Biophys Acta 1459(2-3): 325-30.
- BERKS, B. C., F. SARGENT und T. PALMER (2000b). "The Tat protein export pathway." Mol Microbiol 35(2): 260-74.
- BERNHARDT, T. G. und P. A. DE BOER (2003). "The *Escherichia coli* amidase AmiC is a periplasmic septal ring component exported via the twin-arginine transport pathway." Mol Microbiol 48(5): 1171-82.
- BERTANI, G. (1951). "Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*." J Bacteriol 62(3): 293-300.
- BERTHELMANN, F.: *Lokalisation der Komponenten des twin-arginine translocation-Systems in Escherichia coli*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Mikrobiologie, 2004.
- BERTHELMANN, F. und T. BRÜSER (2004). "Localization of the Tat translocon components in *Escherichia coli*." FEBS Lett 569(1-3): 82-8.
- BERTHELMANN, F., D. MEHNER, S. RICHTER, U. LINDENSTRAUß, H. LÜNSDORF, G. HAUSE und T. BRÜSER (2008). "Recombinant Expression of *tatABC* and *tatAC* Results in the Formation of Interacting Cytoplasmic TatA Tubes in *Escherichia coli*." J Biol Chem 283(37): 25281-9.
- BINGLE, L. E., C. M. BAILEY und M. J. PALLEN (2008). "Type VI secretion: a beginner's guide." Curr Opin Microbiol 11(1): 3-8.
- BLAUDECK, N., P. KREUTZENBECK, M. MÜLLER, G. A. SPRENGER und R. FREUDL (2005). "Isolation and characterization of bifunctional *Escherichia coli* TatA mutant proteins that allow efficient Tat-dependent protein translocation in the absence of TatB." J Biol Chem 280(5): 3426-32.
- BLOCK, A., G. LI, Z. Q. FU und J. R. ALFANO (2008). "Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets." Curr Opin Plant Biol 11(4): 396-403.
- BOGSCH, E. G., F. SARGENT, N. R. STANLEY, B. C. BERKS, C. ROBINSON und T. PALMER (1998). "An essential component of a novel bacterial protein export system with homologues in plastids and mitochondria." J Biol Chem 273(29): 18003-6.
- BOLHUIS, A., J. E. MATHERS, J. D. THOMAS, C. M. BARRETT und C. ROBINSON (2001). "TatB and TatC form a functional and structural unit of the twin-arginine translocase from *Escherichia coli*." J Biol Chem 276(23): 20213-9.
- BOYD, D., C. SCHIERLE und J. BECKWITH (1998). "How many membrane proteins are there?" Protein Sci 7(1): 201-5.

- BRANDON, L. D., N. GOEHRING, A. JANAKIRAMAN, A. W. YAN, T. WU, J. BECKWITH und M. B. GOLDBERG (2003). "IcsA, a polarly localized autotransporter with an atypical signal peptide, uses the Sec apparatus for secretion, although the Sec apparatus is circumferentially distributed." Mol Microbiol 50(1): 45-60.
- BRÜSER, T. und C. SANDERS (2003). "An alternative model of the twin arginine translocation system." Microbiol Res 158(1): 7-17.
- BRÜSER, T., T. YANO, D. C. BRUNE und F. DALDAL (2003). "Membrane targeting of a folded and cofactor-containing protein." Eur J Biochem 270(6): 1211-21.
- CAMPO, N., H. TJALSMA, G. BUIST, D. STEPNIAK, M. MEIJER, M. VEENHUIS, M. WESTERMANN, J. P. MÜLLER, S. BRON, J. KOK, O. P. KUIPERS und J. D. JONGBLOED (2004). "Subcellular sites for bacterial protein export." Mol Microbiol 53(6): 1583-99.
- CARTER, C. W., JR., J. KRAUT, S. T. FREER, X. NGUYEN HUU, R. A. ALDEN und R. G. BARTSCH (1974). "Two-Angstrom crystal structure of oxidized *Chromatium* high potential iron protein." J Biol Chem 249(13): 4212-25.
- CASADABAN, M. J. (1976). "Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu." J Mol Biol 104(3): 541-55.
- CASADABAN, M. J., J. CHOU und S. N. COHEN (1980). "In vitro gene fusions that join an enzymatically active  $\beta$ -galactosidase segment to amino-terminal fragments of exogenous proteins: *Escherichia coli* plasmid vectors for the detection and cloning of translational initiation signals." J Bacteriol 143(2): 971-80.
- CHA, J. H. und G. C. STEWART (1997). "The divIVA minicell locus of *Bacillus subtilis*." J Bacteriol 179(5): 1671-83.
- CHADDOCK, A. M., A. MANT, I. KARNAUCHOV, S. BRINK, R. G. HERRMANN, R. B. KLÖSGEN und C. ROBINSON (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(12): 2715-22.
- CHAN, C. S., M. R. ZLOMISLIC, D. P. TIELEMAN und R. J. TURNER (2007). "The TatA subunit of *Escherichia coli* twin-arginine translocase has an N-in topology." Biochemistry 46(25): 7396-404.
- CHANAL, A., C. SANTINI und L. WU (1998). "Potential receptor function of three homologous components, TatA, TatB and TatE, of the twin-arginine signal sequence-dependent metalloenzyme translocation pathway in *Escherichia coli*." Mol Microbiol 30(3): 674-6.
- CLINE, K., W. F. ETTINGER und S. M. THEG (1992). "Protein-specific energy requirements for protein transport across or into thylakoid membranes. Two luminal proteins are transported in the absence of ATP." J Biol Chem 267(4): 2688-96.
- CLINE, K. und H. MORI (2001). "Thylakoid  $\Delta$ pH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport." J Cell Biol 154(4): 719-29.

- CRISTOBAL, S., J. W. DE GIER, H. NIELSEN und G. VON HEIJNE (1999). "Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in *Escherichia coli*." Embo J **18**(11): 2982-90.
- DABNEY-SMITH, C., H. MORI und K. CLINE (2006). "Oligomers of Tha4 organize at the thylakoid Tat translocase during protein transport." J Biol Chem **281**(9): 5476-83.
- DATSENKO, K. A. und B. L. WANNER (2000). "One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6640-5.
- DE BOER, P. A., R. E. CROSSLEY und L. I. ROTHFIELD (1989). "A division inhibitor and a topological specificity factor coded for by the minicell locus determine proper placement of the division septum in *E. coli*." Cell **56**(4): 641-9.
- DE GIER, J. W., Q. A. VALENT, G. VON HEIJNE und J. LUIRINK (1997). "The *E. coli* SRP: preferences of a targeting factor." FEBS Lett **408**(1): 1-4.
- DE LEEUW, E., T. GRANJON, I. PORCELLI, M. ALAMI, S. B. CARR, M. MÜLLER, F. SARGENT, T. PALMER und B. C. BERKS (2002). "Oligomeric properties and signal peptide binding by *Escherichia coli* Tat protein transport complexes." J Mol Biol **322**(5): 1135-46.
- DE LEEUW, E., I. PORCELLI, F. SARGENT, T. PALMER und B. C. BERKS (2001). "Membrane interactions and self-association of the TatA and TatB components of the twin-arginine translocation pathway." FEBS Lett **506**(2): 143-8.
- DELEPELAIRE, P. (2004). "Type I secretion in gram-negative bacteria." Biochim Biophys Acta **1694**(1-3): 149-61.
- DELISA, M. P., P. LEE, T. PALMER und G. GEORGIOU (2004). "Phage shock protein PspA of *Escherichia coli* relieves saturation of protein export via the Tat pathway." J Bacteriol **186**(2): 366-73.
- DEN BLAAUWEN, T., M. A. DE PEDRO, M. NGUYEN-DISTECHE und J. A. AYALA (2008). "Morphogenesis of rod-shaped sacculi." FEMS Microbiol Rev **32**(2): 321-44.
- DESSVAUX, M., M. HEBRAUD, R. TALON und I. R. HENDERSON (2009). "Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue." Trends Microbiol **17**(4): 139-45.
- DILKS, K., R. W. ROSE, E. HARTMANN und M. POHLSCHRÖDER (2003). "Prokaryotic utilization of the twin-arginine translocation pathway: a genomic survey." J Bacteriol **185**(4): 1478-83.
- DOI, M., M. WACHI, F. ISHINO, S. TOMIOKA, M. ITO, Y. SAKAGAMI, A. SUZUKI und M. MATSUHASHI (1988). "Determinations of the DNA sequence of the *mreB* gene and of the gene products of the *mre* region that function in formation of the rod shape of *Escherichia coli* cells." J Bacteriol **170**(10): 4619-24.
- FILLOUX, A., A. HACHANI und S. BLEVES (2008). "The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes." Microbiology **154**(Pt 6): 1570-83.

- FINAZZI, G., C. CHASEN, F. A. WOLLMAN und C. DE VITRY (2003). "Thylakoid targeting of Tat passenger proteins shows no  $\Delta pH$  dependence in vivo." Embo J **22**(4): 807-15.
- FRIELINGSDORF, S., M. JAKOB und R. B. KLÖSGEN (2008). "A stromal pool of TatA promotes Tat-dependent protein transport across the thylakoid membrane." J Biol Chem **283**(49): 33838-45.
- FRIELINGSDORF, S. und R. B. KLÖSGEN (2007). "Prerequisites for terminal processing of thylakoidal Tat substrates." J Biol Chem **282**(33): 24455-62.
- GERARD, F. und K. CLINE (2006). "Efficient twin arginine translocation (Tat) pathway transport of a precursor protein covalently anchored to its initial cpTatC binding site." J Biol Chem **281**(10): 6130-5.
- GERARD, F. und K. CLINE (2007). "The thylakoid proton gradient promotes an advanced stage of signal peptide binding deep within the Tat pathway receptor complex." J Biol Chem **282**(8): 5263-72.
- GITAI, Z. (2006). "Plasmid segregation: a new class of cytoskeletal proteins emerges." Curr Biol **16**(4): R133-6.
- GITAI, Z., N. DYE und L. SHAPIRO (2004). "An actin-like gene can determine cell polarity in bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(23): 8643-8.
- GOHLKE, U., L. PULLAN, C. A. MCDEVITT, I. PORCELLI, E. DE LEEUW, T. PALMER, H. R. SAIBIL und B. C. BERKS (2005). "The TatA component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(30): 10482-6.
- GRAUMANN, P. L. (2007). "Cytoskeletal elements in bacteria." Annu Rev Microbiol **61**: 589-618.
- GREENE, N. P., I. PORCELLI, G. BUCHANAN, M. G. HICKS, S. M. SCHERMANN, T. PALMER und B. C. BERKS (2007). "Cysteine scanning mutagenesis and disulfide mapping studies of the TatA component of the bacterial twin arginine translocase." J Biol Chem **282**(33): 23937-45.
- GRIFFIN, B. A., S. R. ADAMS, J. JONES und R. Y. TSIEN (2000). "Fluorescent labeling of recombinant proteins in living cells with FLAsH." Methods Enzymol **327**: 565-78.
- GRIFFIN, B. A., S. R. ADAMS und R. Y. TSIEN (1998). "Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells." Science **281**(5374): 269-72.
- GUZMAN, L. M., D. BELIN, M. J. CARSON und J. BECKWITH (1995). "Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter." J Bacteriol **177**(14): 4121-30.
- HALE, C. A., A. C. RHEE und P. A. DE BOER (2000). "ZipA-induced bundling of FtsZ polymers mediated by an interaction between C-terminal domains." J Bacteriol **182**(18): 5153-66.
- HEIDRICH, C., M. F. TEMPLIN, A. URSINUS, M. MERDANOVIC, J. BERGER, H. SCHWARZ, M. A. DE PEDRO und J. V. HOLTJE (2001). "Involvement of N-acetylmuramyl-L-alanine amidases in cell separation and antibiotic-induced autolysis of *Escherichia coli*." Mol Microbiol **41**(1): 167-78.

- HENDERSON, I. R., F. NAVARRO-GARCIA, M. DESVAUX, R. C. FERNANDEZ und D. ALA'ALDEEN (2004). "Type V protein secretion pathway: the autotransporter story." Microbiol Mol Biol Rev **68**(4): 692-744.
- HICKS, M. G., P. A. LEE, G. GEORGIOU, B. C. BERKS und T. PALMER (2005). "Positive selection for loss-of-function *tat* mutations identifies critical residues required for TatA activity." J Bacteriol **187**(8): 2920-5.
- HORLER, R. S., A. BUTCHER, N. PAPANGELOPOULOS, P. D. ASHTON und G. H. THOMAS (2009). "EchoLOCATION: an in silico analysis of the subcellular locations of *Escherichia coli* proteins and comparison with experimentally derived locations." Bioinformatics **25**(2): 163-6.
- IWAI, N., K. NAGAI und M. WACHI (2002). "Novel S-benzylisothiourea compound that induces spherical cells in *Escherichia coli* probably by acting on a rod-shape-determining protein(s) other than penicillin-binding protein 2." Biosci Biotechnol Biochem **66**(12): 2658-62.
- IZE, B., F. GERARD, M. ZHANG, A. CHANAL, R. VOULHOUX, T. PALMER, A. FILLOUX und L. F. WU (2002). "In vivo dissection of the Tat translocation pathway in *Escherichia coli*." J Mol Biol **317**(3): 327-35.
- IZE, B., N. R. STANLEY, G. BUCHANAN und T. PALMER (2003). "Role of the *Escherichia coli* Tat pathway in outer membrane integrity." Mol Microbiol **48**(5): 1183-93.
- JACK, R. L., F. SARGENT, B. C. BERKS, G. SAWERS und T. PALMER (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**(5): 1801-4.
- JAKOB, M., S. KAISER, M. GUTENSOHN, P. HANNER und R. B. KLÖSGEN (2009). "Tat subunit stoichiometry in *Arabidopsis thaliana* challenges the proposed function of TatA as the translocation pore." Biochim Biophys Acta **1793**(2): 388-94.
- JANAKIRAMAN, A. und M. B. GOLDBERG (2004). "Evidence for polar positional information independent of cell division and nucleoid occlusion." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(3): 835-40.
- JONGBLOED, J. D., U. GRIEGER, H. ANTELMANN, M. HECKER, R. NIJLAND, S. BRON und J. M. VAN DIJL (2004). "Two minimal Tat translocases in *Bacillus*." Mol Microbiol **54**(5): 1319-25.
- JONGBLOED, J. D., R. VAN DER PLOEG und J. M. VAN DIJL (2006). "Bifunctional TatA subunits in minimal Tat protein translocases." Trends Microbiol **14**(1): 2-4.
- KI, J. J., Y. KAWARASAKI, J. GAM, B. R. HARVEY, B. L. IVERSON und G. GEORGIOU (2004). "A periplasmic fluorescent reporter protein and its application in high-throughput membrane protein topology analysis." J Mol Biol **341**(4): 901-9.
- KLÖSGEN, R. B., I. W. BROCK, R. G. HERRMANN und C. ROBINSON (1992). "Proton gradient-driven import of the 16 kDa oxygen-evolving complex protein as the full precursor protein by isolated thylakoids." Plant Mol Biol **18**(5): 1031-4.

- KOSTAKIOTI, M., C. L. NEWMAN, D. G. THANASSI und C. STATHOPOULOS (2005). "Mechanisms of protein export across the bacterial outer membrane." J Bacteriol 187(13): 4306-14.
- KOUWEN, T. R., R. VAN DER PLOEG, H. ANTELMANN, M. HECKER, G. HOMUTH, U. MADER und J. M. VAN DIJL (2009). "Overflow of a hyper-produced secretory protein from the *Bacillus* Sec pathway into the Tat pathway for protein secretion as revealed by proteogenomics." Proteomics 9(4): 1018-1032.
- KROGH, A., B. LARSSON, G. VON HEIJNE und E. L. SONNHAMMER (2001). "Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes." J Mol Biol 305(3): 567-80.
- KRUSE, T., J. MØLLER-JENSEN, A. LØBNER-OLESEN und K. GERDES (2003). "Dysfunctional MreB inhibits chromosome segregation in *Escherichia coli*." Embo J 22(19): 5283-92.
- LAEMMLI, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature 227(5259): 680-5.
- LEAKE, M. C., N. P. GREENE, R. M. GODUN, T. GRANJON, G. BUCHANAN, S. CHEN, R. M. BERRY, T. PALMER und B. C. BERKS (2008). "Variable stoichiometry of the TatA component of the twin-arginine protein transport system observed by in vivo single-molecule imaging." Proc Natl Acad Sci U S A 105(40): 15376-81.
- LEE, P. A., G. BUCHANAN, N. R. STANLEY, B. C. BERKS und T. PALMER (2002). "Truncation analysis of TatA and TatB defines the minimal functional units required for protein translocation." J Bacteriol 184(21): 5871-9.
- LINDNER, A. B., R. MADDEN, A. DEMAREZ, E. J. STEWART und F. TADDEI (2008). "Asymmetric segregation of protein aggregates is associated with cellular aging and rejuvenation." Proc Natl Acad Sci U S A 105(8): 3076-81.
- LOW, H. H., M. C. MONCRIEFFE und J. LOWE (2004). "The crystal structure of ZapA and its modulation of FtsZ polymerisation." J Mol Biol 341(3): 839-52.
- LUIRINK, J., G. VON HEIJNE, E. HOUBEN und J. W. DE GIER (2005). "Biogenesis of inner membrane proteins in *Escherichia coli*." Annu Rev Microbiol 59: 329-55.
- MAPLE, J., M. T. FUJIWARA, N. KITAHATA, T. LAWSON, N. R. BAKER, S. YOSHIDA und S. G. MOLLER (2004). "GIANT CHLOROPLAST 1 is essential for correct plastid division in *Arabidopsis*." Curr Biol 14(9): 776-81.
- MASCARENHAS, J., M. H. WEBER und P. L. GRAUMANN (2001). "Specific polar localization of ribosomes in *Bacillus subtilis* depends on active transcription." EMBO Rep 2(8): 685-9.
- MATOS, C. F., A. DI COLA und C. ROBINSON (2009). "TatD is a central component of a Tat translocon-initiated quality control system for exported FeS proteins in *Escherichia coli*." EMBO Rep 10(5): 474-9.
- MCDEVITT, C. A., G. BUCHANAN, F. SARGENT, T. PALMER und B. C. BERKS (2006). "Subunit composition and in vivo substrate-binding characteristics of *Escherichia coli* Tat protein complexes expressed at native levels." Febs J 273(24): 5656-68.

- MEHNER, D.: *Untersuchungen zu den Komponenten TatA und TatB des Tat-Translokons von Escherichia coli*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Mikrobiologie, 2006.
- MEILE, J. C., L. J. WU, S. D. EHRLICH, J. ERRINGTON und P. NOIROT (2006). "Systematic localisation of proteins fused to the green fluorescent protein in *Bacillus subtilis*: identification of new proteins at the DNA replication factory." Proteomics 6(7): 2135-46.
- MILEYKOVSKAYA, E. und W. DOWHAN (2000). "Visualization of phospholipid domains in *Escherichia coli* by using the cardiolipin-specific fluorescent dye 10-N-nonyl acridine orange." J Bacteriol 182(4): 1172-5.
- MITCHELL, P. (1966). "Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation." Biol Rev Camb Philos Soc 41(3): 445-502.
- MORI, H. und K. CLINE (2002). "A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid  $\Delta$ pH/Tat translocase." J Cell Biol 157(2): 205-10.
- MORI, H., E. J. SUMMER, X. MA und K. CLINE (1999). "Component specificity for the thylakoidal Sec and Delta pH-dependent protein transport pathways." J Cell Biol 146(1): 45-56.
- MOULD, R. M. und C. ROBINSON (1991). "A proton gradient is required for the transport of two luminal oxygen-evolving proteins across the thylakoid membrane." J Biol Chem 266(19): 12189-93.
- MÜLLER, M. und R. B. KLÖSGEN (2005). "The Tat pathway in bacteria and chloroplasts (review)." Mol Membr Biol 22(1-2): 113-21.
- NATALE, P., T. BRÜSER und A. J. DRIESSEN (2008). "Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane - distinct translocases and mechanisms." Biochim Biophys Acta 1778(9): 1735-56.
- NIVIERE, V., S. L. WONG und G. VOORDOUW (1992). "Site-directed mutagenesis of the hydrogenase signal peptide consensus box prevents export of a beta-lactamase fusion protein." J Gen Microbiol 138(10): 2173-83.
- OATES, J., C. M. BARRETT, J. P. BARNETT, K. G. BYRNE, A. BOLHUIS und C. ROBINSON (2005). "The *Escherichia coli* twin-arginine translocation apparatus incorporates a distinct form of TatABC complex, spectrum of modular TatA complexes and minor TatAB complex." J Mol Biol 346(1): 295-305.
- POP, O. I., M. WESTERMANN, R. VOLKMER-ENGERT, D. SCHULZ, C. LEMKE, S. SCHREIBER, R. GERLACH, R. WETZKER und J. P. MÜLLER (2003). "Sequence-specific binding of prePhoD to soluble TatAd indicates protein-mediated targeting of the Tat export in *Bacillus subtilis*." J Biol Chem 278(40): 38428-36.
- PORCELLI, I., E. DE LEEUW, R. WALLIS, E. VAN DEN BRINK-VAN DER LAAN, B. DE KRUIJFF, B. A. WALLACE, T. PALMER und B. C. BERKS (2002). "Characterization and membrane assembly of the TatA component of the *Escherichia coli* twin-arginine protein transport system." Biochemistry 41(46): 13690-7.
- PUGSLEY, A. P. (1993). "The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria." Microbiol Rev 57(1): 50-108.

- RAY, N., A. NENNINGER, C. W. MULLINEAUX und C. ROBINSON (2005). "Location and mobility of twin arginine translocase subunits in the *Escherichia coli* plasma membrane." J Biol Chem **280**(18): 17961-8.
- RICHTER, S.: *Untersuchung der für einen Tat-Transport in E. coli erforderlichen Substrateigenschaften*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biologie, Fachbereich Mikrobiologie, 2009.
- RICHTER, S. und T. BRÜSER (2005). "Targeting of unfolded PhoA to the TAT translocon of *Escherichia coli*." J Biol Chem **280**(52): 42723-30.
- RICHTER, S., U. LINDENSTRAUß, C. LUCKE, R. BAYLISS und T. BRÜSER (2007). "Functional Tat transport of unstructured, small, hydrophilic proteins." J Biol Chem **282**(46): 33257-64.
- RIDDER, A. N., E. J. DE JONG, J. D. JONGBLOED und O. P. KUIPERS (2009). "Subcellular localisation of TatAd of *Bacillus subtilis* depends on the presence of TatCd or TatCy." J Bacteriol **191**(13): 4410-8.
- ROMANTSOV, T., S. HELBIG, D. E. CULHAM, C. GILL, L. STALKER und J. M. WOOD (2007). "Cardiolipin promotes polar localization of osmosensory transporter ProP in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **64**(6): 1455-65.
- ROMANTSOV, T., L. STALKER, D. E. CULHAM und J. M. WOOD (2008). "Cardiolipin controls the osmotic stress response and the subcellular location of transporter ProP in *Escherichia coli*." J Biol Chem **283**(18): 12314-23.
- ROSCH, J. und M. CAPARON (2004). "A microdomain for protein secretion in Gram-positive bacteria." Science **304**(5676): 1513-5.
- ROSE, R. W., T. BRÜSER, J. C. KISSINGER und M. POHLSCHRÖDER (2002). "Adaptation of protein secretion to extremely high-salt conditions by extensive use of the twin-arginine translocation pathway." Mol Microbiol **45**(4): 943-50.
- SAIER, M. H., C. H. MA, L. RODGERS, D. G. TAMANG und M. R. YEN (2008). "Protein secretion and membrane insertion systems in bacteria and eukaryotic organelles." Adv Appl Microbiol **65**: 141-97.
- SALJE, J., B. ZUBER und J. LÖWE (2009). "Electron cryomicroscopy of *E. coli* reveals filament bundles involved in plasmid DNA segregation." Science **323**(5913): 509-12.
- SAMBROOK, J. und D. W. RUSSELL (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 3. Auflage.
- SANGER, F., S. NICKLEN und A. R. COULSON (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.
- SANTINI, C. L., A. BERNADAC, M. ZHANG, A. CHANAL, B. IZE, C. BLANCO und L. F. WU (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**(11): 8159-64.
- SANTINI, C. L., B. IZE, A. CHANAL, M. MÜLLER, G. GIORDANO und L. F. WU (1998). "A novel sec-independent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli*." Embo J **17**(1): 101-12.



- SARGENT, F., B. C. BERKS und T. PALMER (2006). "Pathfinders and trailblazers: a prokaryotic targeting system for transport of folded proteins." *FEMS Microbiol Lett* 254(2): 198-207.
- SARGENT, F., E. G. BOGSCH, N. R. STANLEY, M. WEXLER, C. ROBINSON, B. C. BERKS und T. PALMER (1998). "Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway." *Embo J* 17(13): 3640-50.
- SARGENT, F., U. GOHLKE, E. DE LEEUW, N. R. STANLEY, T. PALMER, H. R. SAIBIL und B. C. BERKS (2001). "Purified components of the *Escherichia coli* Tat protein transport system form a double-layered ring structure." *Eur J Biochem* 268(12): 3361-7.
- SARGENT, F., N. R. STANLEY, B. C. BERKS und T. PALMER (1999). "Sec-independent protein translocation in *Escherichia coli*. A distinct and pivotal role for the TatB protein." *J Biol Chem* 274(51): 36073-82.
- SCHATZ, G. und B. DOBBERSTEIN (1996). "Common principles of protein translocation across membranes." *Science* 271(5255): 1519-26.
- SCHREIBER, S., R. STENGEL, M. WESTERMANN, R. VOLKMER-ENGERT, O. I. POP und J. P. MÜLLER (2006). "Affinity of TatCd for TatAd elucidates its receptor function in the *Bacillus subtilis* twin arginine translocation (Tat) translocase system." *J Biol Chem* 281(29): 19977-84.
- SCHRÖDINGER, E. (1967). *What is Life? The Physical Aspect of the living Cell*. Cambridge, Cambridge University Press.
- SETTLES, A. M., A. YONETANI, A. BARON, D. R. BUSH, K. CLINE und R. MARTIENSEN (1997). "Sec-independent protein translocation by the maize Hcf106 protein." *Science* 278(5342): 1467-70.
- SHIH, Y. L., I. KAWAGISHI und L. ROTHFIELD (2005). "The MreB and Min cytoskeletal-like systems play independent roles in prokaryotic polar differentiation." *Mol Microbiol* 58(4): 917-28.
- SHIOMI, D., M. YOSHIMOTO, M. HOMMA und I. KAWAGISHI (2006). "Helical distribution of the bacterial chemoreceptor via colocalization with the Sec protein translocation machinery." *Mol Microbiol* 60(4): 894-906.
- SIMEONE, R., D. BOTTAI und R. BROSCHE (2009). "ESX/type VII secretion systems and their role in host-pathogen interaction." *Curr Opin Microbiol* 12(1): 4-10.
- STANDAR, K.: *Untersuchungen zur Struktur und Funktion von PspA aus Escherichia coli*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Mikrobiologie, 2005.
- STANDAR, K., D. MEHNER, H. OSADNIK, F. BERTHELMANN, G. HAUSE, H. LUNSDORF und T. BRÜSER (2008). "PspA can form large scaffolds in *Escherichia coli*." *FEBS Lett* 582(25-26): 3585-9.
- STANLEY, N. R., T. PALMER und B. C. BERKS (2000). "The twin arginine consensus motif of Tat signal peptides is involved in Sec-independent protein targeting in *Escherichia coli*." *J Biol Chem* 275(16): 11591-6.

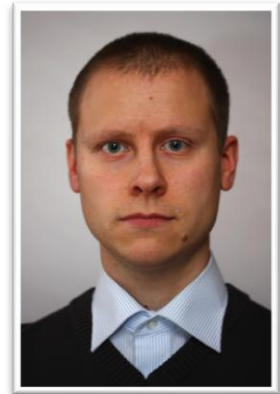
- STEPANENKO, O. V., V. V. VERKHUSHA, I. M. KUZNETSOVA, V. N. UVERSKY und K. K. TUOVEROV (2008). "Fluorescent proteins as biomarkers and biosensors: throwing color lights on molecular and cellular processes." Curr Protein Pept Sci 9(4): 338-69.
- THANASSI, D. G., C. STATHOPOULOS, A. KARKAL und H. LI (2005). "Protein secretion in the absence of ATP: the autotransporter, two-partner secretion and chaperone/usher pathways of gram-negative bacteria (review)." Mol Membr Biol 22(1-2): 63-72.
- THEG, S. M., K. CLINE, G. FINAZZI und F. A. WOLLMAN (2005). "The energetics of the chloroplast Tat protein transport pathway revisited." Trends Plant Sci 10(4): 153-4.
- THIEM, S., D. KENTNER und V. SOURJIK (2007). "Positioning of chemosensory clusters in *E. coli* and its relation to cell division." Embo J 26(6): 1615-23.
- THOMAS, J. D., R. A. DANIEL, J. ERRINGTON und C. ROBINSON (2001). "Export of active green fluorescent protein to the periplasm by the twin-arginine translocase (Tat) pathway in *Escherichia coli*." Mol Microbiol 39(1): 47-53.
- TOWBIN, H., T. STAEBELIN und J. GORDON (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A 76(9): 4350-4.
- VAN DEN ENT, F., L. A. AMOS und J. LOWE (2001). "Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton." Nature 413(6851): 39-44.
- VAN DONGEN, W., W. HAGEN, W. VAN DEN BERG und C. VEEGER (1988). "Evidence for an unusual mechanism of membrane translocation of the periplasmic hydrogenase of *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough), as derived from expression in *Escherichia coli*." FEMS Microbiol Lett 50(1): 5-9.
- VON HEIJNE, G. (1983). "Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites." Eur J Biochem 133(1): 17-21.
- VON HEIJNE, G. (1990). "The signal peptide." J Membr Biol 115(3): 195-201.
- WANG, H., N. S. WINGREEN und R. MUKHOPADHYAY (2008). "Self-organized periodicity of protein clusters in growing bacteria." Phys Rev Lett 101(21): 218101.
- WARREN, G., J. OATES, C. ROBINSON und A. M. DIXON (2009). "Contributions of the Transmembrane Domain and a Key Acidic Motif to Assembly and Function of the TatA Complex." J Mol Biol 388(1): 122-32.
- WEINER, J. H., P. T. BILOUS, G. M. SHAW, S. P. LUBITZ, L. FROST, G. H. THOMAS, J. A. COLE und R. J. TURNER (1998). "A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins." Cell 93(1): 93-101.
- WEXLER, M., F. SARGENT, R. L. JACK, N. R. STANLEY, E. G. BOGSCH, C. ROBINSON, B. C. BERKS und T. PALMER (2000). "TatD is a cytoplasmic protein with DNase activity. No requirement for TatD family proteins in *sec*-independent protein export." J Biol Chem 275(22): 16717-22.
- WICKNER, W. und R. SCHEKMAN (2005). "Protein translocation across biological membranes." Science 310(5753): 1452-6.

- WICKNER, W. T. (1994). "How ATP drives proteins across membranes." Science 266(5188): 1197-8.
- WIEGERT, T., H. SAHM und G. A. SPRENGER (1996). "Export of the periplasmic NADP-containing glucose-fructose oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*." Arch Microbiol 166(1): 32-41.
- WILMS, B., A. HAUCK, M. REUSS, C. SYLDATK, R. MATTES, M. SIEMANN und J. ALTENBUCHNER (2001). "High-cell-density fermentation for production of L-N-carbamoylase using an expression system based on the *Escherichia coli rhaBAD* promoter." Biotechnol Bioeng 73(2): 95-103.
- WU, H. und P. M. FIVES-TAYLOR (2001). "Molecular strategies for fimbrial expression and assembly." Crit Rev Oral Biol Med 12(2): 101-15.
- WU, L. F., B. IZE, A. CHANAL, Y. QUENTIN und G. FICHANT (2000). "Bacterial twin-arginine signal peptide-dependent protein translocation pathway: evolution and mechanism." J Mol Microbiol Biotechnol 2(2): 179-89.
- YAHR, T. L. und W. T. WICKNER (2001). "Functional reconstitution of bacterial Tat translocation in vitro." Embo J 20(10): 2472-9.
- YEN, M. R., Y. H. TSENG, E. H. NGUYEN, L. F. WU und M. H. SAIER, JR. (2002). "Sequence and phylogenetic analyses of the twin-arginine targeting (Tat) protein export system." Arch Microbiol 177(6): 441-50.

## 7 ANHANG

### 7.1 LEBENSLAUF

Name: Felix Berthelmann  
 Geburtsdatum: 25. November 1978  
 Geburtsort: Halle (Saale)  
 Staatsangehörigkeit: deutsch  
 Familienstand: verheiratet



- ◉ Schulausbildung:

---

1985-1991 **Grundschule** in Halle (Saale)  
 1991-1997 **Gymnasium** Europaschule August-Hermann-Francke in Halle (Saale)

- ◉ Hochschulausbildung:

---

1998-2004 **Studium** an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (MLU) in der Fachrichtung Biologie  
 2000 **Vordiplom**  
 2004-2005 **Diplomarbeit** mit dem Thema „Lokalisation der Komponenten des *twin-arginine translocation*-Systems in *Escherichia coli*“ in der Arbeitsgruppe von PD Dr. habil. Thomas Brüser  
 2005-2008 **Doktorand** in der Arbeitsgruppe von PD Dr. habil. Thomas Brüser, Entstehung dieser Arbeit

- ◉ sonstige Tätigkeiten und Stipendien:

---

1997-1998 **Zivildienst** im Paul-Riebeck-Stift in Halle (Saale)  
 2000-2003 **Stipendiat** bei e-fellows.net  
 2000-2004 Häufige Tätigkeit als **wissenschaftliche Hilfskraft** im Institut für Mikrobiologie der MLU  
 2003 dreimonatiger **Auslandsaufenthalt** im Rahmen eines Betriebspraktikums bei der Firma Scanbec Oy in Oulu (Finnland)  
 2005 für drei Monate **Stipendiat** des DFG Graduiertenkollegs 1026 "*Conformational transitions in macromolecular interactions*"  
 2005-2008 **Assoziierter** des DFG Graduiertenkollegs 1026 "*Conformational transitions in macromolecular interactions*" der MLU  
 2008-2009 Abfassung der vorliegenden Arbeit während elfmonatiger **Elternzeit**

## 7.2 PUBLIKATIONSLISTE

- BERTHELMANN, F. und T. BRÜSER (2004). "Localization of the Tat translocon components in *Escherichia coli*." FEBS Lett **569**(1-3): 82-8.
- BERTHELMANN, F. (2004). "Lokalisation der Komponenten des *twin-arginine translocation*-Systems in *Escherichia coli*." Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- BERTHELMANN, F., D. MEHNER, S. RICHTER, U. LINDENSTRAUß, H. LÜNSDORF, G. HAUSE und T. BRÜSER (2008). "Recombinant Expression of *tatABC* and *tatAC* Results in the Formation of Interacting Cytoplasmic TatA Tubes in *Escherichia coli*." J Biol Chem **283**(37): 25281-9.
- STANDAR, K., D. MEHNER, H. OSADNIK, F. BERTHELMANN, G. HAUSE, H. LÜNSDORF und T. BRÜSER (2008). "PspA can form large scaffolds in *Escherichia coli*." FEBS Lett **582**(25-26): 3585-9.

### 7.3 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation selbstständig ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Alle den benutzten Quellen wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stellen sind als solche einzeln kenntlich gemacht.

Diese Arbeit ist keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt worden und auch nicht veröffentlicht worden.

---

Unterschrift

## 7.4 DANKSAGUNG

Ich möchte allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Hervorzuheben sind dabei Prof. Dr. J. R. Andreesen und sein Nachfolger Prof. Dr. Gary Sawers, die mir die Möglichkeit gaben, diese Arbeit an ihrem Institut durchzuführen.

Ganz besonderer Dank geht natürlich an meinen Betreuer PD Dr. habil. Thomas Brüser, in dessen Arbeitsgruppe ich arbeiten durfte und der mir das überaus interessante Thema überließ. Ihm danke ich auch für die stete Diskussionsbereitschaft und das ständige Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Den jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Tat-Arbeitsgruppe Jana Behrendt, Ute Lindenstrauß, Wenke Graubner, Denise Mehner, Hendrik Osadnik, Silke Richter, Ines Runge, Kerstin Standar, Alexander Sturm und Antje Vogel gilt ebenfalls meine Dankbarkeit für das immer gute Laborklima, die Hilfsbereitschaft und den Spaß an der Arbeit, den wir gemeinsam hatten.

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne interne und externe Kooperationen. So danke ich allen Mitgliedern des Institutes für Mikrobiologie sowie den Betreuern, Stipendiaten und Assoziierten des Graduiertenkollegs 1026 für vielfältige Diskussionen und Hilfestellungen. Von den externen Kooperationen ist allen voran Dr. Gerd Hause vom Biozentrum der MLU zu nennen, der mich nicht nur in die Geheimnisse der Elektronenmikroskopie einwies, sondern mir auch in vielen anderen Dingen mit Rat und Tat zur Seite stand. Weitere elektronenmikroskopische Arbeiten wurden mit viel Einsatz von Dr. Heinrich Lünsdorf vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig durchgeführt. Dr. Holger Stark vom Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen führte freundlicherweise die Rückprojektion der Röhrenquerschnitte durch. Die Abteilung Mikrobielle Biotechnologie des Institutes für Biochemie und Biotechnologie der MLU unter der Leitung von Prof. Dr. Sven-Erik Behrens ermöglichte mir den unkomplizierten Zugang zu einem modernen konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. Meine sehr zuvorkommende und immer hilfsbereite Ansprechpartnerin war dabei Dr. Sylke Meyer. Ihnen allen gilt mein Dank.

Natürlich danke ich von ganzem Herzen auch meiner Familie: allen voran meiner Frau Theresa, meinem kleinen Sohn Carl (ohne dessen tägliche Kindergartenaufenthalte diese Arbeit noch nicht fertig wäre) und ganz besonders meinen Eltern für ihre lebenslange Unterstützung und das fleißige Setzen von Kommata in dieser Arbeit.

Und ganz zum Schluss möchte ich dem Leser danken, der es interessiert bis auf diese letzte Seite geschafft hat.

Diese Arbeit wurde finanziell gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG (BR 2285/2-2).