

**Membraninsertion des Phagenproteins  
M13 procoat in Lipidvesikel mit  
rekonstituiertem *Escherichia coli* YidC**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**Fakultät Naturwissenschaften  
Universität Hohenheim**

**Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie**

vorgelegt von  
Natalie Nadine Stiegler

aus Stuttgart

2011

Dekan: Herr Prof. Dr. rer. nat. Heinz Breer  
1. berichtende Person: Herr Prof. Dr. rer. nat. Andreas Kuhn  
2. berichtende Person: Herr Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Hanke

Eingereicht am: 28. Januar 2011

Mündliche Prüfung am: 09. Mai 2011

Die vorliegende Arbeit wurde am 04. April 2011 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Die Membran von <i>Escherichia coli</i> .....	1
1.2. Membranproteine.....	4
1.3. Targeting von Präproteinen.....	5
1.4. Translokationsmechanismen in <i>Escherichia coli</i> .....	8
1.4.1. Sec-abhängige Translokation.....	9
1.4.2. Sec-unabhängige Translokation.....	14
1.5. Liposomen.....	21
1.6. Rekonstitution von Membranproteinen.....	23
1.7. M13 procoat.....	24
1.8. proOmpA.....	27
2. Material.....	28
2.1. Geräte.....	28
2.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	33
2.3. Plasmide.....	41
2.4. Bakterienstämme.....	44
2.5. Antikörper.....	45
2.5.1. Primäre Antikörper.....	45
2.5.2. Sekundäre Antikörper.....	47
2.6. Proteinstandards.....	47
2.7. Lösungen, Medien und Puffer.....	49
3. Methoden.....	68
3.1. Herstellung von kompetenten Zellen.....	68
3.2. Transformation.....	68
3.3. Übernachtskultur.....	69
3.4. Expression.....	69
3.5. Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA).....	69
3.6. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	70
3.7. Visualisierung von Proteinen in Polyacrylamidgelen.....	73
3.8. Immunfärbung des Western Blots.....	76
3.9. Entfernung eines Antikörpers von einer Nitrocellulosemembran.....	77
3.10. Quantifizierung der Proteinbanden.....	77
3.11. Mini-Präparation von Plasmid-DNA (für High Copy-Number Plasmide).....	78

3.12.	Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA.....	79
3.13.	DNA-Sequenzierung (Sanger <i>et al.</i> , 1977) .....	79
3.14.	Herstellung von Sequenziergelen.....	81
3.15.	Proteinreinigung mit der Äkta.....	81
3.16.	Dialyse .....	82
3.17.	Proteinreinigung .....	82
3.18.	Proteinkonzentrationsbestimmung .....	95
3.19.	Herstellung von invertierten Cytoplasmamembranvesikeln (INV).....	97
3.20.	Lipidextraktion aus <i>E. coli</i> .....	98
3.21.	Ames Extraktion für Phospholipide .....	98
3.22.	Acetonfällung zur Reinigung von bis zu 100 mg Lipiden (Kuhn <i>et al.</i> , 2010).....	99
3.23.	Lipide mit Diacylglycerin (Kuhn <i>et al.</i> , 2010).....	100
3.24.	Trocknen der Lipide (Kuhn <i>et al.</i> , 2010) .....	102
3.25.	Phosphatbestimmung (Ames, 1966) .....	102
3.26.	Dünnschichtchromatographie (Kuhn <i>et al.</i> , 2010).....	104
3.27.	Herstellung von unilamellaren Vesikeln mit der Extrudermethode (Kuhn <i>et al.</i> , 2010) .....	105
3.28.	Rekonstitution von Membranproteinen in Proteoliposomen .....	106
3.29.	Floaten von (Proteo-) Liposomen .....	109
3.30.	Bestimmung der Topologie von YidC (Kuhn <i>et al.</i> , 2010).....	109
3.31.	Transitionsunkt von Membranen (Anisotropie).....	110
3.32.	Bestimmung des Membranpotentials (Kuhn <i>et al.</i> , 2010) .....	112
3.33.	Translokation in (Proteo-) Liposomen (Kuhn <i>et al.</i> , 2010) .....	115
3.34.	Translokation in SecYEG-Proteoliposomen.....	117
3.35.	Translokation in INV (inverted inner membrane vesicles).....	119
3.36.	Grundlagen der Spektroskopie.....	120
3.37.	Fluoreszenzmarkierung der M13 procoat-Proteine mit Atto520-maleimid.....	124
3.38.	Setup des konfokalen Mikroskops .....	127
3.39.	Fluoreszenzlöschung (Quenching) .....	128
3.40.	Ermittlung der Quencherkonzentration.....	129
3.41.	Diffusionszeit von Atto520-markiertem Procoat H5-M13C und H5EE-M13C .....	130
3.42.	Einzelmoleküldetektion zum Nachweis von Bindung und Einbau von fluoreszenzmarkierten M13 procoat-Proteinen an Lipidvesikel .....	130
3.43.	Auswertung der Daten.....	134
4.	Ergebnisse .....	136



4.1.	Reinigung der Translokationskomponenten der inneren Membran von <i>Escherichia coli</i>	136
4.1.1.	Reinigung der Membraninsertase YidC	136
4.1.2.	Reinigung der ATPase SecA	139
4.1.3.	Reinigung der Translokase SecYEG	140
4.2.	Reinigung von Substratproteinen	141
4.2.1.	Reinigung von Procoatproteinen	142
4.2.2.	Reinigung von Procoat-Hybridproteinen	145
4.2.3.	Reinigung von proOmpA	148
4.3.	Translokation von gereinigten Membranproteinen in invertierte Innenmembranvesikel (INV)	149
4.4.	Herstellung von Phospholipidvesikeln	151
4.5.	Transmembranpotential als Qualitätsnachweis der Liposomen	154
4.6.	Einbau und Topologiebestimmung des gereinigten YidC-Proteins	158
4.7.	Membraninsertion von M13 procoat	160
4.8.	Aggregiert das ungebundene Substratprotein?	162
4.9.	Das gereinigte YidC kann mit verschiedenen Methoden in Liposomen rekonstituiert werden	163
4.10.	Das Membranpotential wird durch die Insertion von M13 procoat nicht beeinflusst	166
4.11.	Diacylglycerin in <i>E. coli</i> Gesamtextraktlipiden verhindert die Spontaninsertion von M13 procoat	168
4.12.	Membraninsertion durch die Translokase SecYEG	178
4.12.1.	Rekonstitution von YidC und SecYEG in Lipidvesikel	178
4.12.2.	Translokation von M13 procoat H5 und H5EE, Procoat-Hybridproteinen und proOmpA in Liposomen und Proteoliposomen mit rekonstituiertem YidC bzw. SecYEG	181
4.13.	Translokation von Procoatproteinen in Lipidvesikel aus DOPG, DOPE und DOPC	187
4.14.	Spektroskopische Messmethoden mit fluoreszenzmarkierten Procoatproteinen	193
4.14.1.	Fluoreszenzmarkierung der Procoatproteine	193
4.14.2.	Translokation der Atto-markierten Procoatproteine in Liposomen und YidC-Proteoliposomen	196
4.14.3.	Stern-Volmer-Plots	197
4.14.4.	Diffusionszeit von Atto520-markiertem Procoat H5-M13C und H5EE-M13C	198
4.14.5.	Einzelmoleküldetektion zur Untersuchung von Bindung und Einbau von fluoreszenzmarkierten Procoatproteinen in Lipidvesikel	200
5.	Diskussion	207
5.1.	Der Einbau von M13 procoat wird durch die Insertase YidC und das Membranpotential katalysiert	208

5.2.	Veränderungen der Ladung im periplasmatischen Bereich führt zu einem anderen Translokationsverhalten bezüglich des elektrochemischen Membranpotentials .....	212
5.3.	Die Insertion von M13 procoat verbraucht das Membranpotential nicht .....	214
5.4.	Das M13 procoat nimmt im rekonstituierten System eine bestimmte Konformation ein .....	214
5.5.	Die Sec-abhängigen Procoatproteine werden mithilfe von SecAYEG in Lipidvesikel inseriert, nicht aber mit YidC .....	215
5.6.	Diacylglycerin stabilisiert die Membranintegrität der Vesikel und verhindert die Spontaninsertion von M13 procoat .....	218
5.7.	Die Topologie von rekonstituiertem YidC in Phospholipidvesikel unterschiedlicher Zusammensetzung beeinflusst dessen katalytische Funktion .....	221
5.8.	Der Translokationsvorgang von M13 procoat kann mithilfe von Einzelmoleküldetektion untersucht werden .....	224
6.	Zusammenfassung .....	228
7.	Summary .....	230
8.	Literaturverzeichnis .....	232
9.	Abkürzungen und Trivialnamen .....	258
10.	Lebenslauf .....	266
11.	Danksagung .....	267

## Abbildungsverzeichnis

Abb1.	Fluid-Mosaik-Modell (Singer & Nicolson, 1972, modifiziert) .....	2
Abb2.	Lipidbestandteile der Cytoplasmamembran von <i>Escherichia coli</i> .....	2
Abb3.	Topologie von Membranproteinen (Kuhn, 1995, modifiziert) .....	5
Abb4.	Schematische Darstellung der N-terminalen Signalpeptide von typischen Sec- und Tat-Substraten .....	6
Abb5.	Verschiedene Translokationsmechanismen an der cytoplasmatischen Membran von <i>Escherichia coli</i> .....	9
Abb6.	Die Sec-Translokase an der cytoplasmatischen Membran von <i>Escherichia coli</i> .....	11
Abb7.	Schematische Darstellung des Tat-Transportsystems .....	16
Abb8.	Topologie der Membraninsertase YidC .....	17
Abb9.	„YidC-only“-Weg .....	21
Abb10.	Schematische Darstellung eines Lipidvesikels .....	21
Abb11.	Schematische Darstellung der Herstellung von unilamellaren Vesikeln .....	22
Abb12.	Aminosäuresequenz des Phagenproteins M13 procoat (hydrophobe Bereich sind hervorgehoben) .....	25

Abb13.	Membraninsertion von M13 procoat (Kuhn <i>et al.</i> , 1990a, modifiziert).....	26
Abb14.	Schematische Darstellung der Translokation von proOmpA (nach Facey & Kuhn, 2004, modifiziert).....	27
Abb15.	Plasmidvektor pET-16b (Novagen) .....	41
Abb16.	Sandwichaufbau für die Durchführung eines semi-dry Western blot.....	75
Abb17.	Diacylglycerin hergestellt aus Ei-Phosphatidylcholin von „Lipid Products“ .....	101
Abb18.	Schematische Darstellung des Extruders von Avanti Lipids, Inc.....	105
Abb19.	Durchschnittliche Liposomengröße der Partikelgrößenbestimmung .....	106
Abb20.	Rekonstitution mittels der Extrudermethode .....	107
Abb21.	Rekonstitution mittels Bio Beads.....	108
Abb22.	Zentrifugation auf einem Saccharosekissen .....	109
Abb23.	Struktur von 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien (Quelle: Sigma-Aldrich).....	110
Abb24.	Struktur von Oxonol VI (1,5-Bis(5-oxo-3-propylisoxazol-4-yl)pentamethine-oxonol, Quelle: Fluka).....	112
Abb25.	Prinzip der Generation eines Membranpotentials mittels Valinomycin .....	113
Abb26.	Schematische Darstellung der Pipettierreihenfolge bei der Translokation.....	115
Abb27.	Schematische Darstellung der unterschiedlichen Ansätze bei der Translokation .....	117
Abb28.	Jablonski-Diagramm.....	120
Abb29.	Diffusionszeit eines Fluorophors .....	122
Abb30.	Schematischer Strahlengang eines konfokalen Mikroskops .....	123
Abb31.	Struktur (A) und Spektrum der Absorptions- und Emissionsmaxima (B) des Atto520-maleimids von ATTO-TEC (Quelle: ATTO-TEC) .....	124
Abb32.	Schematische Aufbauskinne der Einzelmoleküldetektion .....	127
Abb33.	Gaussförmiges Ellipsoid mit einer Begrenzung von $1/e^2$ .....	128
Abb34.	Quenching-Prozess der in das Liposom eingebauten oder nur angelagerten M13 procoat-Proteine .....	132
Abb35.	Beispiel für das Hauptfenster des „Burst Analyzers“.....	135
Abb36.	Reinigung von YidC mit Dodecylphosphocholin (Fos-cholin12).....	137
Abb37.	Reinigung von YidC mit Dodecylmaltosid .....	138
Abb38.	Reinigung von SecA.....	139
Abb39.	Reinigung von SecYEG .....	141
Abb40.	Schematische Darstellung der Varianten an M13 procoat-Proteinen .....	142
Abb41.	Schematische Darstellung der M13 procoat-Proteine .....	143
Abb42.	Reinigung von M13 procoat H5 .....	144
Abb43.	Darstellung der gereinigten M13 procoat-Proteine .....	145

Abb44. Schematische Darstellung der Hybridproteine aus M13 procoat und Teilen der Aminosäuresequenz der Proteine OmpA bzw. Leaderpeptidase (Lep) .....	146
Abb45. Reinigung des Hybridproteins pro80coat.....	147
Abb46. Darstellung der für die weiterführenden Versuche verwendeten Elutionen von PClep und pro828coat .....	147
Abb47. Reinigung von proOmpA .....	148
Abb48. Translokation von M13 procoat H5 bzw. H5EE in invertierte Innenmembranvesikel (INV) .....	150
Abb49. Translokation von proOmpA, sowie der Hybridproteine pro828coat, pro80coat und PClep in invertierte Innenmembranvesikel (INV) .....	151
Abb50. Dünnschichtchromatogramm der <i>E. coli</i> Gesamt- und Polarlipidextrakte.....	152
Abb51. Dünnschichtchromatogramm einer Acetonfällung des <i>E. coli</i> Gesamtextraktes .....	153
Abb52. Die Bildung eines Membranpotentials durch die Fluoreszenz von Oxonol VI war nur über ein Kaliumdiffusionspotential möglich .....	155
Abb53. Bestimmung des Membranpotentials durch Oxonol VI-Fluoreszenz der <i>E. coli</i> Lipidextrakte.....	156
Abb54. Bestimmung des Membranpotentials durch Oxonol VI-Fluoreszenz der Proteoliposomen des <i>E. coli</i> Gesamtextraktes .....	156
Abb55. Das Membranpotential wird durch die Zugabe von Alamethicin zerstört .....	157
Abb56. Anisotropie der <i>E. coli</i> Lipidextrakte .....	158
Abb57. Darstellung der potentiellen Schnittstellen der Protease Trypsin in der Aminosäuresequenz von YidC .....	159
Abb58. Topologiebestimmung von YidC .....	160
Abb59. Temperaturabhängigkeit der Membraninsertion von M13 procoat H5.....	161
Abb60. Membraninsertion von M13 procoat H5 nach verschiedenen Inkubationszeiten .....	162
Abb61. Suche nach Aggregaten von M13 procoat H5 und H5EE.....	163
Abb62. Translokation von M13 procoat H5 in <i>E. coli</i> Gesamtextraktlipidvesikel mit rekonstituiertem YidC.....	165
Abb63. Veränderung des Membranpotentials während der Insertion der Procoatproteine H5-0PC, H5 und H5EE.....	167
Abb64. Dünnschichtchromatogramm zur Konzentrationsbestimmung des <i>E. coli</i> Gesamtextraktes nach erfolgter Acetonfällung .....	169
Abb65. Dünnschichtchromatogramm des <i>E. coli</i> Gesamtextraktes mit unterschiedlichen Konzentrationen an DAG .....	169
Abb66. Die Zugabe von steigenden Konzentrationen an DAG bewirkte die Stabilisierung des Membranpotentials.....	171
Abb67. Anisotropie der <i>E. coli</i> Lipidextrakte mit unterschiedlichen Konzentrationen an DAG .....	172

Abb68. Translokation von M13 procoat H5 in <i>E. coli</i> Gesamtextraktlipidvesikel mit steigender Menge an DAG .....	175
Abb69. Translokation von M13 procoat H5EE in <i>E. coli</i> Gesamtextraktlipidvesikel mit steigender Menge an DAG.....	177
Abb70. Rekonstitution von YidC bzw. SecYEG in <i>E. coli</i> Gesamtextraktlipide mit 3% DAG.....	179
Abb71. Die (Proteo-) Liposomen der Bio Beads-Methode zeigten ein stabiles Membranpotential.....	180
Abb72. Translokation von M13 procoat H5 und H5EE in Liposomen, YidC- bzw. SecYEG-Proteoliposomen mit und ohne SecA/ATP bzw. Membranpotential .....	182
Abb73. Translokation von proOmpA in Liposomen, YidC- und SecYEG-Proteoliposomen mit und ohne SecA/ATP bzw. Membranpotential .....	184
Abb74. Schematische Darstellung der Topologie der M13-OmpA- und M13-Lep-Hybridproteine in Liposomen und YidC- bzw. SecYEG-Proteoliposomen .....	185
Abb75. Translokation der M13-OmpA- und M13-Lep-Hybridproteine in Liposomen, YidC- und SecYEG-Proteoliposomen mit und ohne SecA/ATP.....	186
Abb76. Das Membranpotential der Liposomen aus semi-synthetischen Lipiden.....	188
Abb77. Anisotropie der semi-synthetischen Lipidmembran.....	189
Abb78. Mögliche Topologien von YidC im Lipidvesikel .....	189
Abb79. Translokation von M13 procoat H5 in Liposomen und YidC-Proteoliposomen mit unterschiedlichen Lipidzusammensetzungen .....	192
Abb80. Schematische Darstellung der fluoreszenzmarkierten M13 procoat-Proteine .....	193
Abb81. Fraktionen der Gelfiltration und anschließenden IMAC von Procoat H5EE-M13C zur Entfernung der freien Farbstoffmoleküle.....	195
Abb82. Bestimmung des Membranpotentials durch Oxonol VI-Fluoreszenz der 100% DOPC-Liposomen.....	196
Abb83. Translokation von Procoat H5-M13C und H5EE-M13C in Liposomen und YidC-Proteoliposomen zu 100% aus DOPC.....	197
Abb84. Stern-Volmer-Plot .....	198
Abb85. Diffusionszeiten von Atto520-maleimid, des Atto-markierten Procoatproteins H5EE-M13C und des an ein YidC-Proteoliposom gebundenen H5EE-M13C-Proteins .....	199
Abb86. Unterscheidung von Bindung und Einbau von mit Atto520-maleimid markiertem M13 procoat durch Fluoreszenzquenching mit Kaliumiodid .....	200
Abb87. Konfokale Fluoreszenzdetektion von frei diffundierendem und in die Membran inseriertem M13 procoat-Protein .....	201
Abb88. Bindungs- und Einbauraten des fluoreszenzmarkierten Procoat H5-M13C in Liposomen mittels Zählung der Photonenbursts .....	203
Abb89. Bindungs- und Einbauraten des fluoreszenzmarkierten Procoat H5-M13C in YidC-Proteoliposomen mittels Zählung der Photonenbursts.....	204

Abb90. Bindungs- und Einbauraten des fluoreszenzmarkierten Procoat H5EE-M13C in Liposomen mittels Zählung der Photonenbursts .....	205
Abb91. Bindungs- und Einbauraten des fluoreszenzmarkierten Procoat H5EE-M13C in YidC-Proteoliposomen mittels Zählung der Photonenbursts.....	206

## Tabellenverzeichnis

Tab1. Mark12™ Unstained Standard.....	47
Tab2. Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder (links), Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (Mitte), Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder (rechts).....	48
Tab3. Precision Plus Protein™ Standards All Blue (links), Polypeptide SDS-PAGE Molecular Weight Standards (rechts).....	48
Tab4. Übersicht über die verwendeten Proteine bezüglich SDS-PAGE, Blotzeit und Antikörper..	71
Tab5. Pipettierschema für SDS-PAGE.....	72
Tab6. Pipettierschema für Tricin-SDS-PAGE.....	73
Tab7. Sensitivität und Spezifität der Sichtbarmachung von Proteinen in SDS-PAGE.....	73
Tab.8 Pipettierschema für die DNA-Sequenzierung.....	80
Tab.9 Programmierung der PCR-Maschine.....	80
Tab.10 Orientierung von rekonstituiertem YidC in Lipidvesikel unterschiedlicher Lipidzusammensetzung (Stiegler, 2004).....	190

# 1. Einleitung

## 1.1. Die Membran von *Escherichia coli*

Die Zellmembran des Bakteriums *Escherichia coli* (*E. coli*) erfüllt mehrere Funktionen. Sie stellt eine Permeabilitätsbarriere für zelluläre Komponenten und auch Ionen dar, sie trennt verschiedene Bereiche wie Cytoplasma vom Periplasma und dient Membranproteinen als Anker. Die Membrane eukaryontischer Zellen hingegen bilden zusätzlich noch einzelne Kompartimente, wie Zellkern, Chloroplasten, Mitochondrien, Vakuole, das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat. Die Membrane der Prokaryonten und Eukaryonten sind aber in ihrem Aufbau sehr ähnlich. Die meisten Membrane bestehen aus einer Phospholipiddoppelschicht. Diese Phospholipide sind amphipatische Moleküle, die sowohl hydrophobe als auch hydrophile Eigenschaften vereinen. Sie bestehen aus einem Glycerinskelett, welches mit mehreren Fettsäuren verestert ist. Besitzt das Glycerinmolekül zwei Fettsäuren, so handelt es sich um ein Diglycerid, Triglyceride dagegen besitzen drei Fettsäuren. Die Phospholipide beinhalten zusätzlich eine Phosphorylgruppe anstelle eines Acylrestes an der C<sub>3</sub>-Hydroxygruppe. Neben diesen einfachen Phospholipiden gibt es noch komplexere, die Phosphor-, Schwefel-, Stickstoff- aber auch kleine hydrophile Kohlenstoffverbindungen, wie Ethanolamin, Cholin oder Serin gebunden haben.

Lipide haben die Eigenschaft, dass sie sich, wenn sie in wässrige Umgebung gelangen, spontan zu Doppelschichten (englisch: bilayer) assoziieren. Somit sind die hydrophilen Kopfgruppen des Glycerinmoleküls dem wässrigen Medium zugewandt, während die hydrophoben Fettsäuren im Inneren der hydrophoben Lipidschicht vor dem Kontakt mit dem Wasser geschützt sind.

Die bakterielle Innenmembran besteht aus einer symmetrischen Phospholipiddoppelschicht. Um den selektiven Transport über die Cytoplasmamembran zu ermöglichen, ist das Vorhandensein von speziellen Membranproteinen erforderlich. Dabei muss man zwischen integralen und peripheren Membranproteinen unterscheiden (siehe Abb1). Die integralen Membranproteine können die Membran entweder komplett durchqueren, sind also transmembran oder sie liegen nur teilweise in der Membran verankert mit Kontakt zu einer der beiden Seiten. Membranproteine der inneren Membran jedoch werden bevorzugt durch  $\alpha$ -helikale Strukturen in dieser verankert.

# Einleitung

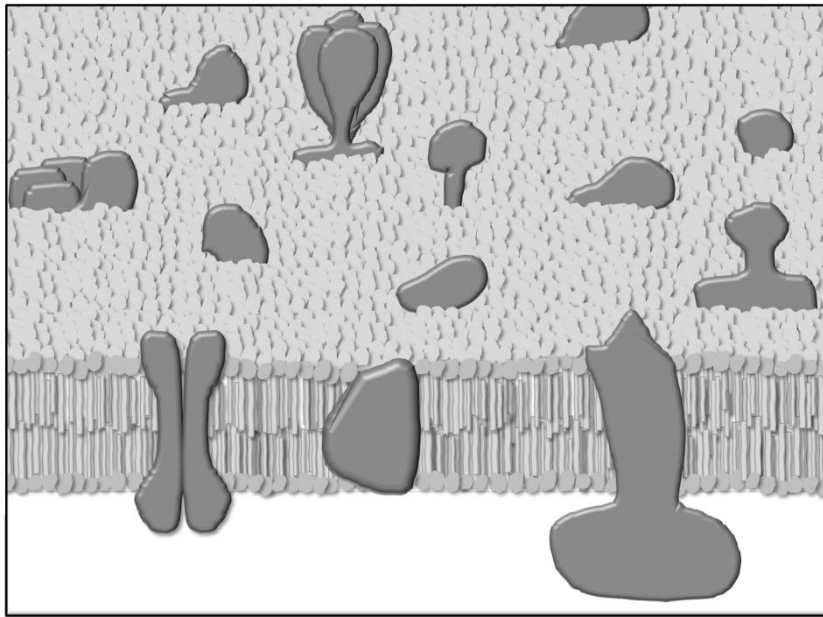


Abb1. Fluid-Mosaik-Modell (Singer & Nicolson, 1972, modifiziert)

Die cytoplasmatische Membran von *E. coli* besteht zu 70-75 mol% aus dem zwitterionischen Lipid Phosphatidylethanolamin (PE), die weiteren Bestandteile sind vor allem die anionischen Lipide Phosphatidylglycerin (PG) zu ca. 20 mol%, sowie mit 5 mol% zu einem geringeren Anteil aus Cardiolipin (CL) (siehe Abb2).

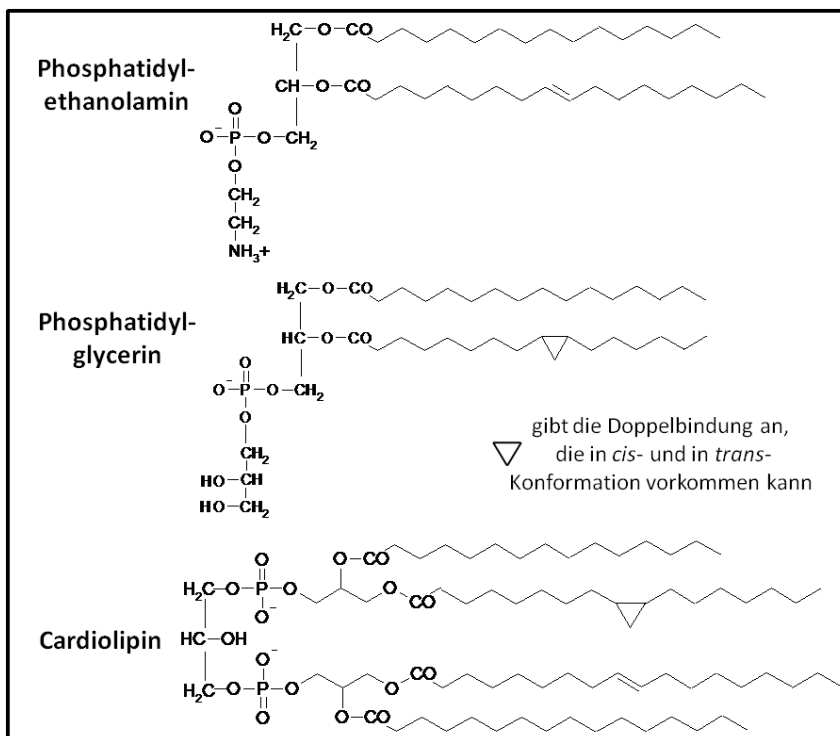


Abb2. Lipidbestandteile der Cytoplasmamembran von *Escherichia coli*



## Einleitung

Die Cytoplasmamembran dient auch dazu, Energie in der Zelle zu speichern, indem sie Protonen (H<sup>+</sup>) und Hydroxylionen (OH<sup>-</sup>) voneinander trennt. Dieser Zustand kann als protonenmotorische Kraft (englisch: **p**roton **m**otive **f**orce, pmf) wirken. Für eine korrekte Topologie von einigen integralen Membranproteinen in *E. coli* ist das Lipid PE von großer Bedeutung (Bogdanov *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003 und 2005; Xie *et al.*, 2006). Das Protein LacY weist, eingebaut in Membranen ohne PE, Defekte in Topologie und Funktion auf. Es besteht aus 12 Transmembranbereichen, wobei die ersten sechs in Abwesenheit von PE eine invertierte Orientierung aufweisen. Auch die Proteine PheP (englisch: **p**henylalanine **p**ermease), sowie GabP (englisch: **γ**-**a**mino**b**utyric acid **p**ermease) weisen diese topologische Inversion in Abwesenheit von PE auf. Andererseits wird der laterale Druck innerhalb der Membran durch einen vermehrten molekularen Anteil an PE erhöht, wodurch möglicherweise der Einbau von Transmembranhelices in diese erschwert wird.

Die asymmetrische Außenmembran von *E. coli* wird neben den Phospholipiden aus **L**ip**o**l**ip**o**s**acchariden (LPS) gebildet. Diese beiden Bestandteile zusammen formen ähnlich der Cytoplasmamembran eine Lipiddoppelschicht, die jedoch nicht nur aus Phospholipiden aufgebaut ist. Den Lipidbestandteil des LPS stellt das Lipid A dar, welches kein Glycerinlipid ist, sondern aus Fettsäuren besteht, welche durch Esterbindungen an ein Disaccharid gebunden sind. Zusätzlich dazu kommen in der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien noch Lipoproteine und Phospholipide vor. Phospholipide befinden sich nur in der Innenseite der Membran. Auf dieser Seite befinden sich Lipoproteinkomplexe, die das Peptidoglykan mit der äußeren Membran verankern. Die Lipoproteine werden unter anderem über ein N-Acyl-Diacylglycerylcystein in die Membran über ihren Lipidanteil eingelagert (Hayachi & Wu, 1990). In der Außenmembran gibt es integrale Außenmembranproteine (englisch: **o**uter **m**embrane **p**rotein, Omp) wie zum Beispiel Porine, die mindestens acht Transmembranbereiche besitzen, die das Protein mithilfe eines amphipatischen β-Faltblatts (englisch: β-barrel) in der Membran verankern. Die Proteine der Außenmembran werden nach Verlassen der Translokase SecYEG von den Chaperonen Skp und SurA in Empfang genommen, um deren Faltung in der hydrophilen Umgebung des Periplasmas zu unterstützen. Das C-terminal gelegene Erkennungsmotiv der Omp-Proteine wird durch das Protein YaeT erkannt. YaeT ist Bestandteil des Multiproteinkomplexes und an der Integration von Membranproteinen in die Außenmembran beteiligt (Bos & Tommassen, 2004; Hagan *et al.*, 2010).

Ein wichtiges Diglycerid ist das Diacylglycerin (DAG), welches aus zwei Acylketten ganz unterschiedlicher Zusammensetzung besteht (siehe Abb17). In Eukaryonten ist es ein „second messenger signaling lipid“ (Botenstoff), welches von der Phospholipase C zusammen mit Inositol-trisphosphat hergestellt wird. Es handelt sich hierbei um einen Vorläufer der

## Einleitung

Triglyceride. In Prokaryonten wird DAG durch eine Phosphatase aus Phosphatidsäure gebildet. Diacylglycerin kommt in wildtypischen *E. coli*-Zellen bis zu 1,3 mol% in der Cytoplasmamembran vor (Raetz *et al.*, 1983).

## 1.2. Membranproteine

Etwa 20-30% der zellulären Proteine sind Membranproteine (Daley *et al.*, 2005) der cytoplasmatischen Membran (siehe Abb1), die essentielle Funktionen erfüllen. Nur ca. 2% sind Membranproteine der Außenmembran. Membranproteine sind involviert in Atmung, Photosynthese, Energetik, Transportvorgänge durch oder in die Membran, sowie an der Chemotaxis, der Zellteilung und an vielen anderen Prozessen. Der Einbau dieser Membranproteine erfolgt wohl in den seltensten Fällen spontan. Einige dieser Membranproteine werden als Präproteine synthetisiert, sie besitzen eine Signalsequenz von 20-30 Aminosäuren Länge. Die Membranproteine werden gemäß der „positive inside rule“ (von Heijne, 1986) mit den positiv geladenen Bereichen ins Cytoplasma ragend in der inneren Membran verankert. Diese Konformation ist die energetisch günstigste, da die innere Membran von Bakterien auf der cytoplasmatischen Seite aufgrund der Phospholipide wie PG und CL, sowie der protonenmotorischen Kraft negativ geladen ist.

Membranproteine können aufgrund ihrer Topologie und Aminosäuresequenz in vier verschiedene Typen (siehe Abb3) eingeteilt werden (von Heijne, 1992). Zu den Typ I-Membranproteinen gehören einspännige Proteine, deren N-Terminus ins Periplasma transloziert wird, die Präsequenz wird nach diesem Vorgang von der Leaderpeptidase abgeschnitten. Ein Beispiel hierfür ist das Phagenhüllprotein M13 procoat. Besitzen solche Membranproteine jedoch keine spaltbare Signalsequenz, gehören sie zu dem Typ II oder III. Die Signalsequenz ist hierbei Bestandteil der späteren Transmembranregion, man nennt sie deshalb auch „signal-anchor“-Proteine. Abhängig von der Orientierung der Membranproteine, die aufgrund der positiven Ladungen meist im N-Terminus gegeben ist, unterscheidet man Typ II oder III. Zum Typ II zählt man Membranproteine, welche die Membran nur einfach durchspannen, keine Präsequenz besitzen und deren N-Terminus im Cytoplasma liegt (Cytochrome  $b_5$ ). Ein Beispiel für ein Typ III-Membranprotein ist das einspännige Pf3 coat-Protein, dessen N-Terminus durch die Membran ins Periplasma transloziert wird (Kiefer *et al.*, 1997). Allgemein können Membranproteine dieses Typs aber auch mehrspännig sein, ein Beispiel hierfür ist die Leaderpeptidase von *E. coli*. Zu den Typ IV-Membranproteinen gehören Proteine, die mehrere Transmembranbereiche besitzen, wie zum Beispiel YidC.

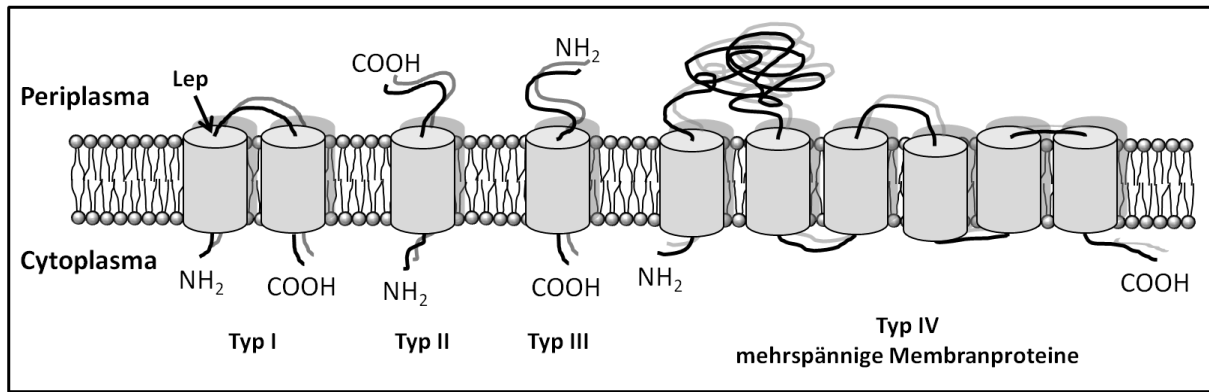


Abb3. **Topologie von Membranproteinen (Kuhn, 1995, modifiziert)**  
Verschiedene Typen der Klassifizierung von Membranproteinen

### 1.3. Targeting von Präproteinen

Damit die Proteine der Zelle ihre eigentliche Funktion erfüllen können, müssen sie nach der Translation im Cytoplasma nicht nur in ihrer nativen Form gefaltet, sondern auch an ihren eigentlichen Bestimmungsort transportiert werden. Die Information für den subzellulären Verbleib eines jeden Proteins wird in der Präsequenz gespeichert. Das Targeting (Zielsteuerung), also das Erkennen des Proteins und Heranleiten an die innere Membran, wird anhand dieser Sequenz bewerkstelligt. Cytoplasmatische Proteine besitzen keine solche Präsequenz, da sie direkt nach der Synthese am Ribosom ihren eigentlichen Wirkungsort schon erreicht haben. Nicht aber die Membranproteine der äußeren Membran, die sekretorischen Proteine, sowie die Proteine des Periplasmas. Diese besitzen N-terminal ein ca. 20-30 Aminosäuren langes Signal- oder Leaderpeptid, welches die Information für das Targeting beinhaltet. Ein solches Signalpeptid (siehe Abb4) besteht N-terminal aus einem positiv geladenen Bereich, der die Bindung an die Membran erleichtert, dieser wird „n-Region“ genannt und hat eine Länge von 1–5 Aminosäureresten (AS-Reste). Daraufhin erstreckt sich ein zentraler hydrophober Teil, die „h-Region“ mit 7–15 Aminosäureresten, sowie eine eher polare Region (von Heijne, 1986), genannt „c-Region“ (5–7 Aminosäurereste), die der Leaderpeptidase (Lep) als Erkennungsstelle dient. Die Substrate der beiden Translokationssysteme Sec und Tat besitzen dabei sehr ähnliche Signalsequenzen. Bei beiden Systemen handelt es sich um generelle Proteintransportsysteme, die nicht auf spezielle Proteine spezialisiert sind, sondern viele verschiedene Proteine zu transportieren vermögen.

## Einleitung

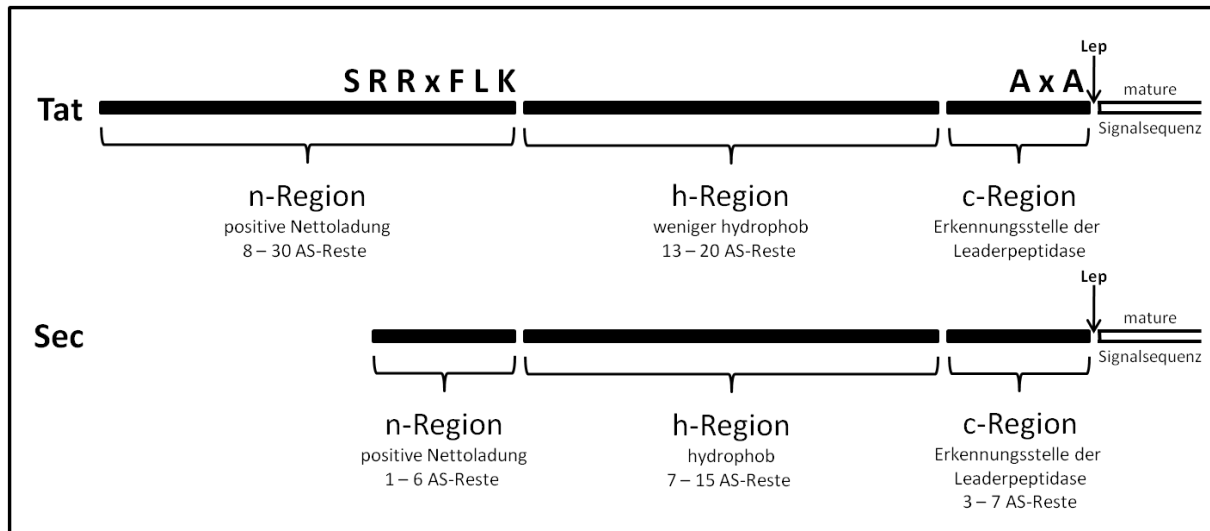


Abb4. Schematische Darstellung der N-terminalen Signalpeptide von typischen Sec- und Tat-Substraten  
x: beliebiger AS-Rest; A x A: zwei kleine, unpolare Reste an den Positionen - 3 und - 1 relativ zur Schnittstelle;  
↓: Schnittstelle der Leaderpeptidase (Lep)

Da alle Proteine an den Ribosomen im Cytoplasma synthetisiert werden, führt die Hydrophobizität der Aminosäuren in Membranproteinen unweigerlich zur Notwendigkeit von Faltungshelfern, sogenannten Chaperonen. Diese Chaperone befinden sich häufig an der Stelle am Ribosom, an der die Polypeptidkette dieses verlässt. Sie verhindern die Aggregation der hydrophoben Bereiche der Membranproteine im hydrophilen Milieu des Cytoplasmas. Einer dieser Faltungshelfer ist der **T**ripper **F**actor (TF), welcher am ribosomalen Protein L23 gebunden ist (Kramer *et al.*, 2002). Der TF interagiert vermutlich mit den meisten hydrophoben Polypeptidketten direkt, wenn diese aus dem Ribosom ragen (Kaiser *et al.*, 2006). Er verhindert deren frühzeitige Faltung, indem er die Substratbindungsstelle besetzt (Ferbitz *et al.*, 2004). Sekretierte Proteine werden im Allgemeinen jedoch nicht vom TF zur Membran begleitet, sondern werden an weitere Chaperone übergeben. Proteine, die über die innere Membran sekretiert werden, interagieren mit den Chaperonen DnaK und GroEL (Bukau *et al.*, 2000). Sekretorische Proteine mit einer spaltbaren Signalsequenz binden an SecB, nachdem sie zunächst mit dem TF komplexiert waren. Ein weiterer Faltungshelfer ist der Signal-Erkennungs-Partikel (englisch: **s**ignal **r**ecognition **p**article, SRP), welcher ebenfalls wie der TF an das ribosomale Protein L23 binden kann (Gu *et al.*, 2003). Er erkennt hydrophobe Sequenzen an den aus dem Ribosom ragenden naszierenden Polypeptidketten von Membranproteinen. Es gibt jedoch auch sekretierte Proteine, die untypischerweise SRP anstelle von SecB für das Targeting verwenden (Sijbrandi *et al.*, 2003; Jong & Luirink, 2008; Jong *et al.*, 2010). Die Bindung von TF initiiert den SecB- vermittelten sekretorischen Weg, während SRP die Insertion in die cytoplasmatische Membran einleitet. Jedoch gibt es bei der Wahl des Interaktionspartners einige

## Einleitung

wenige Ausnahmen, wie zum Beispiel der Autotransporter Hbp, welcher SRP-vermittelt den sekretorischen Weg vollzieht (Sijbrandi *et al.*, 2003; Jong & Luirink, 2008; Jong *et al.*, 2010).

Die meisten Membranproteine der inneren Membran besitzen, im Gegensatz zu den sekretorischen Proteinen, keine spaltbare Signalsequenz und werden mit Hilfe des Signal-Erkennungs-Partikels (SRP) zur inneren Membran von *E. coli* transportiert. Die Signal-ankersequenz ist meistens ca. 20 Aminosäuren lang und bildet in der Membran eine  $\alpha$ -Helix (Boyd & Beckwith, 1990). Je hydrophober die erscheinende Signalsequenz ist, desto wahrscheinlicher ist die Bindung von SRP und somit das Einleiten des co-translationalen Integrationsweges (Valent *et al.*, 1995). Der SRP bindet an seinen Rezeptor FtsY (englisch: **f**ilamentous **t**emperature **s**ensitive **Y**) und leitet die Polypeptidkette mit dem gesamten Translationsapparat (Keenan *et al.*, 2001) weiter an die Sec-Translokase (Luirink *et al.*, 2004). Der bakterielle SRP-Rezeptor FtsY bindet während der co-translationalen Proteinintegration an SecYEG (Angelini *et al.*, 2005) und übergibt die Peptidkette GTP-abhängig an die Translokase SecYEG. Die Sec-Translokase integriert hydrophobe Segmente lateral in den Lipidbilayer und transportiert die hydrophilen Ketten über die Membran. Somit ermöglicht die Translokase den Transport und den Membraneinbau der meisten inneren Proteine (Dalbey *et al.*, 2004; Luirink *et al.*, 2005; Rapoport *et al.*, 2004). SecYEG erkennt die Transmembranbereiche eines Proteins allein durch den Kontakt zwischen Protein und Lipid. YidC scheint den Transfer von Sec-unabhängigen Membranproteinen zu bewerkstelligen und stabilisiert das Transmembransegment der Sec-abhängigen Membranproteine, nachdem diese die Sec-Translokase lateral verlassen (Kuhn *et al.*, 2003). Das co-translationale Targeting ist von Vorteil, da die hydrophoben Transmembranbereiche im wässrigen Milieu des Cytoplasmas zur Aggregation neigen und eine Translokation unmöglich würde (Ahrem *et al.*, 1989). Das bakterielle SRP-System stellt eine vereinfachte Form des eukaryontischen SRP-Systems dar und besteht aus einem Komplex aus einer Proteinkomponente und einer RNA. Es besteht aus dem SRP54 Homolog, dem Ffh (englisch: **f**ifty **f**our **h**omologue) mit 48 kDa, einer 4.5 S RNA, sowie dem SRP-Rezeptor FtsY (Römisch *et al.*, 1989). Ein durch die Bindung von SRP ausgelöster Translationsarrest ist bei dem prokaryontischen System nicht vorhanden (Siegel & Walter, 1988), was eventuell auf die kurzen Distanzen und die höhere Translokationsrate als bei Eukaryonten zurückzuführen sein könnte (Pugsley, 1993). Der Ribonukleoproteinkomplex (englisch: **r**ibosome-**n**ascent-**c**hain complex, RNC-Komplex) bindet hydrophobe Signalpeptide, die als naszierende Polypeptidkette aus dem Ribosom ragen. Im SRP-System erfolgt die Translokation meist co-translational, indem der Komplex aus SRP, naszierender Polypeptidkette mit Ribosom und mRNA (genannt RNC-SRP-Komplex) zum SRP-Rezeptor FtsY geleitet wird. Das Protein wird dann direkt an die Translokase SecYEG übergeben, nachdem der FtsY-Ffh-Komplex durch die GTP-Hydrolyse dissoziiert. Das Protein kann dann mithilfe der Translokase eingebaut

## Einleitung

werden. Für große hydrophile periplasmatische Sequenzen der integralen Membranproteine ist zusätzlich SecA für das Passieren der Membran notwendig. Die co-translationale Translokation ist speziell für Proteine mit mehrfachen Membrandurchgängen effizienter, da die Transmembranbereiche dem Cytoplasma dadurch nur sehr kurz ausgesetzt sind. Mittlerweile ist bekannt, dass auch einige sekretorische Proteine mittels des SRP-Systems co-translational zur Membran geleitet werden, wie zum Beispiel der Autotransporter Hbp (Jong *et al.*, 2010).

Die post-translationale Translokation von sekretorischen Proteinen erfolgt hingegen mithilfe des cytoplasmatischen Proteins SecB. SecB ist ein 16 kDa großes lösliches Protein, welches im Cytoplasma als Homotetramer vorkommt (Watanabe & Blobel, 1989) und eine flache, achtsträngige  $\beta$ -Faltblattstruktur darstellt. SecB vermittelt den Sec-abhängigen Transport zum Beispiel des Außenmembranproteins proOmpA (Lecker *et al.*, 1990), prePhoA, sowie des periplasmatischen preMBP (Bassford, 1990). Um eine Fehlfaltungen bis hin zur Aggregation zu verhindern, bindet SecB seine Substrate (Collier *et al.*, 1988; Kusters *et al.*, 1989; Hardy & Randall, 1991). Vermutlich erkennt SecB hierbei die hydrophoben Bereiche des maturen Teils des Proteins nachdem diese zunächst mit dem Trigger Factor (TF) komplexiert waren, das Signalpeptid bleibt ungebunden und kann nach dem Transport zum Sec-Komplex mit SecA interagieren. Durch seine Affinität zu SecA erleichtert SecB den Transport des Proteins zur Translokase SecYEG und wird aus dem Komplex entlassen, nachdem SecA das Präprotein gebunden hat. Die ATPase SecA vollführt eine Konformationsänderung durch die Bindung von ATP und ermöglicht die Übergabe des zu transportierenden Proteins an SecYEG, wodurch die Translokation ausgelöst wird. Die Bindung von SecB an die neu synthetisierten Membranproteine direkt nachdem die Proteinkette das Ribosom verlässt, verhindert somit deren Fehlfaltung aber auch Aggregation.

### **1.4. Translokationsmechanismen in *Escherichia coli***

Alle Proteine einer *E. coli*-Zelle werden im Cytoplasma synthetisiert, haben dieses aber nicht zwingend als letzten Wirkungsort. Membranproteine der inneren und äußeren Membran, sowie periplasmatische und extrazelluläre Proteine, müssen zunächst über die cytoplasmatische Membran transportiert werden. Diese Translokation über oder in die Membran (zusammengefasst in Kuhn, 2009; Facey & Kuhn, 2010) kann auf verschiedenen Wegen erfolgen (siehe Abb5). Die Selektion für das jeweilige Transportsystem geschieht schon sehr früh während der Proteintranslation am Ribosom. Sekretorische Proteine verwenden für ihren Export aus dem Cytoplasma die Translokase SecAYEG. Die Integration von Proteinen in die innere Membran erfordert ebenfalls die Sec-Translokase und zusätzlich YidC für den endgültigen Einbau in den

## Einleitung

Lipidbilayer. Ein weiterer Transportweg über die Cytoplasmamembran ist das Tat-System. Es vermag bereits vollständig gefaltete, mit Cofaktoren verbundene Proteine ins Periplasma zu translokieren. Nur wenige Membranproteine der inneren Membran werden mithilfe der Insertase YidC unabhängig von anderen Proteinkomplexen („YidC-only“-Weg, siehe Abb9) in die Membran inseriert. Diesen speziellen Weg nutzen nur kleine Membranproteine.

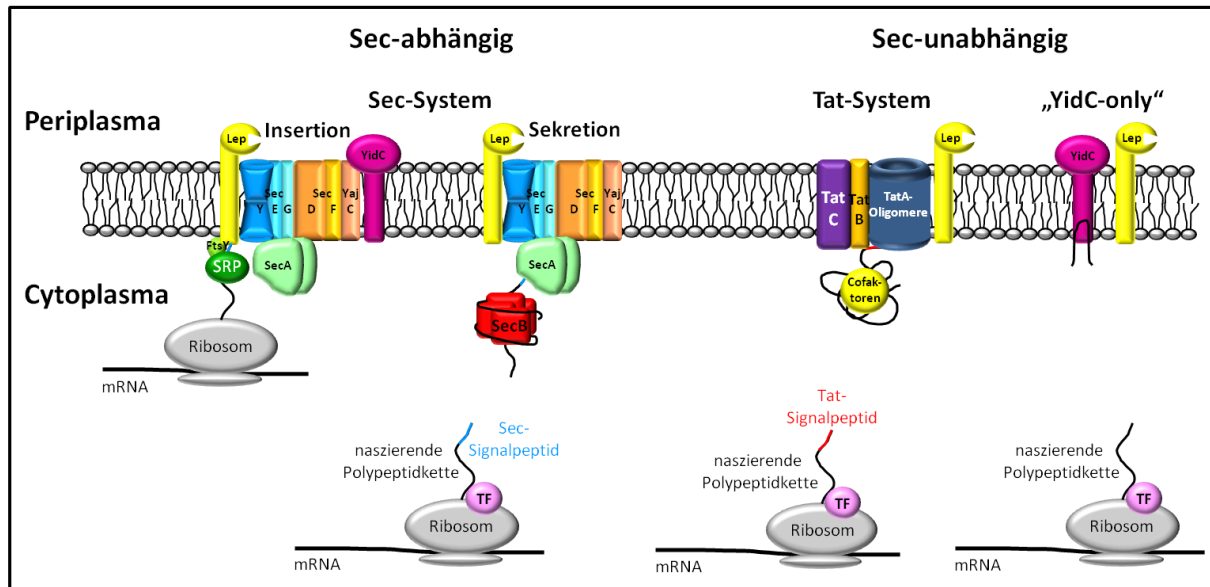


Abb5. **Verschiedene Translokationsmechanismen an der cytoplasmatischen Membran von *Escherichia coli***  
Weitere Erläuterungen zu den einzelnen Systemen folgen in den jeweiligen Abschnitten.

### 1.4.1. Sec-abhängige Translokation

Die Translokase SecYEG (englisch: **secretion**, Sec) besteht aus den drei Proteinkomponenten SecY, SecE und SecG und ist mit dem heterotrimeren Komplex SecDFYajC assoziiert. Sie ist die bedeutendste Translokase für den Transport in und über die cytoplasmatische Membran von *E. coli* (zusammengefasst in du Plessis *et al.*, 2010) und kommt sowohl in Gram-negativen, als auch Gram-positiven Bakterien vor. Sie ist evolutionär hoch konserviert und hat sowohl in den Reichen Bacteria und Archaea, als auch im Reich der Eukarya Homologe. Das eukaryontische Sec61-System ist zum Beispiel für den Proteintransport in das Endoplasmatische Retikulum zuständig. Der Kern der Sec-Translokase wird durch die integralen Membranproteine SecY und SecE gebildet, durch welche die Proteine transloziert oder sekretiert werden (van den Berg *et al.*, 2004; Osborne *et al.*, 2005). Abhängig vom Substrat könnte sich ein Kanal lateral in die Membran öffnen (siehe Abb6 Insertion) oder die Proteine werden transversal zum Periplasma transportiert (siehe Abb6 Sekretion). Peripher an den Proteinkomplex ist SecA angelagert (Zimmer & Rapoport, 2009), hierbei handelt es sich um eine ATPase, die die Energie für die Initiation der Translokation liefert. Hat die Translokation der Polypeptidkette einmal ATP-

## Einleitung

abhängig begonnen, vermag die protonenmotorische Kraft (englisch: **p**roton **m**otive **f**orce, pmf) den Transport SecA-unabhängig zu vollenden (Santini *et al.*, 1998). Das Targeting (siehe 1.3) und die Translokation (siehe Abb6) über oder in die Membran werden noch während der Translation am Ribosom eingeleitet. Die Signalsequenz (siehe Abb4) der naszierenden Polypeptidkette wird beim Heraustreten aus dem Ribosom entweder durch den ribosomenassoziierten Trigger Factor (TF) erkannt und gebunden, dann wird der sekretorische Transportweg mittels SecB und SecA eingeschlagen. Handelt es sich um ein Membranprotein der cytoplasmatischen Membran, so erkennt der Signal-Erkennungs-Partikel (SRP) die entsprechende Signalsequenz. Die Bindung verhindert die weitere Interaktion mit dem jeweils anderen Partner, wodurch die folgenden Schritte festgelegt sind (Koch *et al.*, 1999).

Besitzt die aus dem Ribosom heraustretende Signalsequenz stark hydrophoben (von Heijne, 1985) und helikalen (Bruch *et al.*, 1989) Charakter, so kann SRP den Ribonukleoproteinkomplex (RNC) binden. Der Komplex aus RNC-SRP wird zum Rezeptor FtsY geleitet, welcher an die Sec-Translokase gebunden vorliegt (Ng *et al.*, 1996). SRP und FtsY bilden einen heterodimeren Komplex, wodurch die GTP-Hydrolyse beider Proteine stimuliert wird und der RNC zur Translokase gelangt (Beckmann *et al.*, 2001). Die Elongation der Polypeptidkette am Ribosom stellt die Energie für die co-translationale Insertion in die Membran.

Da der Transport durch die Sec-Translokase einen ungefalteten Status der Peptidkette erfordert, bindet das cytoplasmatische Protein SecB post-translational an weniger hydrophobe Sequenzen (siehe 1.3). Vermutlich liegt das Protein um das tetramere SecB herum gewunden vor und kann somit an der vorzeitigen Faltung gehindert werden. Durch die elektrostatische Interaktion von SecB mit membranständigem SecA wird das Protein an die Membran geleitet (Wickner & Leonard, 1996). SecA bindet die Signalsequenz des Proteins und stimuliert die Übergabe des Proteins von SecB zu SecY (Akita *et al.*, 1990). Die Hydrolyse von ATP initiiert den Transport des Proteins in die Pore SecY hinein, während dann die Sekretion mithilfe der protonenmotorischen Kraft erfolgt. Die Signalsequenz des Proteins wird durch die Leaderpeptidase (Lep) prozessiert und das Protein wird ins Periplasma entlassen. Möglicherweise ist YidC auch an der Sec-abhängigen Sekretion von Proteinen ins Periplasma beteiligt (Froderberg *et al.*, 2004; Pradel *et al.*, 2005; Jong *et al.*, 2010).



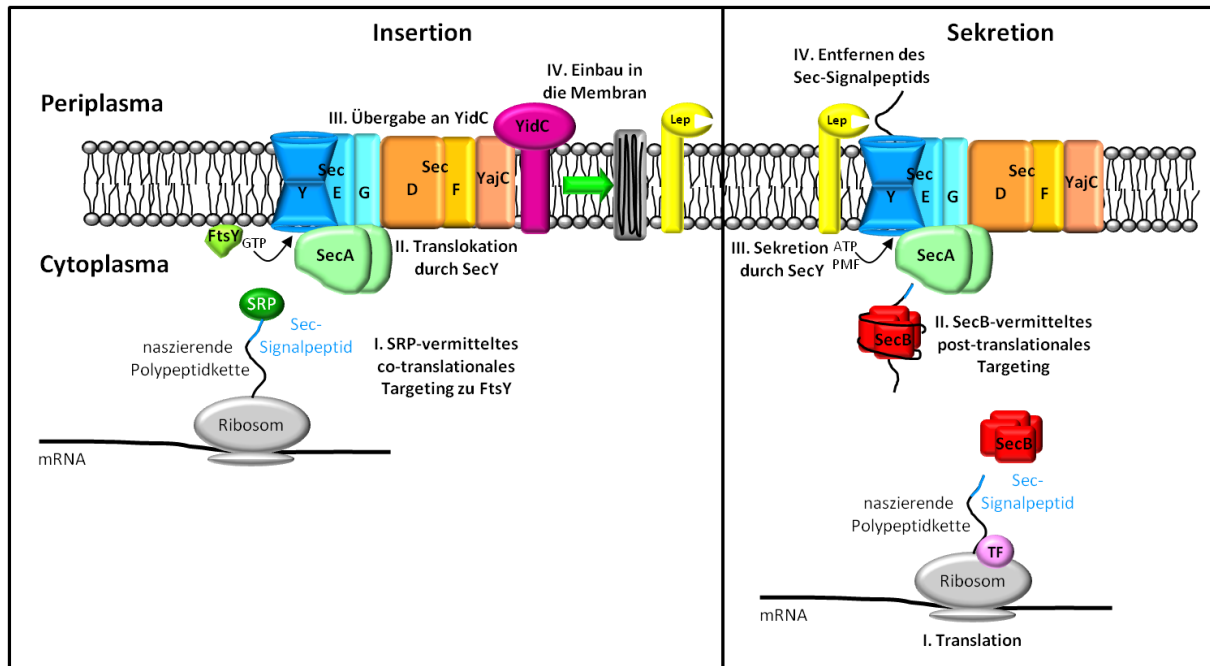


Abb6. Die Sec-Translokase an der cytoplasmatischen Membran von *Escherichia coli*

Die naszierende Polypeptidkette des Membranproteins (Insertion) wird von dem cytoplasmatischen SRP gebunden und co-translationally zur Membran an den SRP-Rezeptor FtsY geleitet (I.). Die Translation ermöglicht die Insertion durch die Translokase (II.). SecA wird nur für den Transport von großen periplasmatischen Bereichen mit mehr als 60 Aminosäureresten benötigt. Das Protein wird im Bilayer lateral an die Insertase YidC weitergeben (III.), welche den Einbau in die Membran katalysiert (IV.). Nach der Insertion in die Membran wird die Signalsequenz gegebenenfalls durch die Leaderpeptidase (Lep) prozessiert.

Die Sekretion verläuft post-translationally. Das SecB erkennt die Sec-Signalsequenz und transportiert die Polypeptidkette (II.) nach Vollendung der Translation (I.) zur Membran. SecB-gebundene Präproteine interagieren mit SecA und werden mithilfe der Hydrolyse von ATP durch die Translokase SecYEG sekretiert (III.).

Ein kontrovers diskutierter Punkt ist der oligomere Status der Sec-Translokase während des aktiven Proteintransports. Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Translokase als ringförmige Struktur vorliegt, die aus drei bis vier Protomeren besteht (Meyer *et al.*, 1999). Rekonstituiert in Proteoliposomen bildet SecYEG nach der Interaktion mit SecA Tetramere (Manting *et al.*, 2000). Diese Ergebnisse würden sich mit denen des eukaryontischen Sec61-Translokationskomplexes ergänzen, der ebenfalls eine multimere, ringähnliche Struktur aufweist (Hanein *et al.*, 1996). Biochemische Untersuchungen hingegen mit **B**lue **N**ative-PAGE (BN-PAGE), **F**luoreszenz-**R**esonanz-**E**nergie-**T**ransfer (FRET) und chemischem Cross-linking haben gezeigt, dass SecYEG als Monomer oder Dimer vorliegen könnte (Yahr & Wickner, 2000; Bessoneau *et al.*, 2002; Mori *et al.*, 2003). Man geht davon aus, dass in SecYEG-Dimeren jeweils ein Komplex als Bindungsstelle für SecA dient, während der andere als Pore fungiert (Osborne & Rapoport, 2007). Die beiden SecYEG-Komplexe nehmen hierbei vermutlich eine Orientierung ein, bei der jeweils die Rückseiten einander zugewandt sind (Kaufmann *et al.*, 1999; Veenendaal *et al.*, 2001; Deville *et al.*, 2010). Der Kontakt wird über die Transmembransegmente der beiden SecE-Proteine hergestellt, die die jeweiligen SecY-Untereinheiten als molekulare Klammer

## Einleitung

umgeben. Möglicherweise ist aber die Orientierung der Dimere auch umgekehrt mit den Fronten zu einander, wobei das laterale Tor einander zugewandt ist (Mitra *et al.*, 2005). SecYEG stellt den eigentlichen Proteinkanal dar, der den Transport durch und in die cytoplasmatische Membran durchführt (van den Berg *et al.*, 2004). SecDFYajC ist ein trimerer Komplex, der die Translokation von sekretorischen Proteinen und den Einbau von Membranproteinen *in vivo* verbessert (Chen *et al.*, 2005). Das errechnete Molekulargewicht von monomerem SecYEG liegt bei 75 kDa. SecY hat ein errechnetes Molekulargewicht von 48 kDa, während es auf SDS-PAGE bei 37 kDa läuft, SecE und SecG laufen bei ca. 15 kDa und sollten ein Molekulargewicht von 14 kDa beziehungsweise 11,4 kDa haben. Untersuchungen auf BN-PAGE zeigen, dass ein Komplex von 200 kDa von den jeweiligen Antikörpern gegen SecY, SecE und SecG erkannt wird. Dieser Komplex kann durch die Zugabe von Natrium-Dodecyl-Sulfat (englisch: **s**odium **d**odecyl sulfate, SDS) aufgelöst werden, wodurch ein weiterer Komplex entsteht, der eine Größe von 100 kDa aufweist. Die Diskrepanz zwischen der errechneten Größe des Komplexes von ca. 150 kDa für ein SecYEG-Dimer und der tatsächlichen von 200 kDa könnte auf der Bindung von Detergenz und Coomassie Brilliant Blau durch das Blue Native-PAGE beruhen. YidC scheint kein Bestandteil der ruhenden Sec-Translokase zu sein und bildet einen homodimeren Komplex in wildtypischen *E. coli*-Zellen (Boy *et al.*, 2009).

SecY ist mit 48 kDa die größte Untereinheit des Komplexes und essentiell für *E. coli*. Es besteht aus zehn Transmembransegmenten (Akiyama, 1987) und bildet als integrales Membranprotein eine fassartige Struktur, die als zentraler Kanal angesehen wird (van den Berg *et al.*, 2004). Dieser Kanal wird zur Hälfte durch die **T**rans**m**embran**s**egmente (TMS) 1-5 und die andere Hälfte durch TMS 6-10 gebildet. Die Öffnung in der Mitte von SecY stellt die zentrale, wässrige Pore dar, durch welche die hydrophilen Regionen der zu exportierenden Proteine oder der Membranproteine während des Translokationsvorganges geleitet werden. Die Pore wird durch einen hydrophoben Ring, der vier Isoleucine, ein Valin und ein Leucin enthält, gesäumt. Die Kanalpore scheint aus einer Kopie von SecY zu bestehen, die eine sanduhrähnliche Gestalt annimmt, mit einer zentralen Verengung in der Mitte der Membran. Diese Verengung hat eine Öffnung von 5-8 Å und scheint von der periplasmatischen Seite durch eine kleine Helix verschlossen zu sein (TMS 2a), welche auch Plug-Domäne genannt wird. Die Helix bildet eine Art Stopfen, wodurch der Kanal versiegelt wird (van den Berg *et al.*, 2004). Diese Plug-Domäne gewährleistet, dass im inaktiven Zustand der Kanal verschlossen bleibt und Ionen oder kleinere Moleküle nicht durch diesen hindurch gelangen können. Im geschlossenen Zustand befindet sich die Plug-Domäne der TMS 2a in Interaktion mit TMS 10 (Lycklama a Nijeholt *et al.*, 2010), im geöffneten stehen TMS 2b und TMS 7 in Kontakt (Bonardi *et al.*, 2010). Während des Translokationsvorganges verbreitert sich der Abstand zwischen TMS 2b und TMS 7, was für den Transportprozess essentiell ist (Bonardi *et al.*, 2010). Der Translokationskanal öffnet sich dabei

## Einleitung

lateral (du Plessis *et al.*, 2009). SecY grenzt mit seiner Frontseite direkt an die Lipidschicht, während die anderen Seiten von SecE und SecG umgeben sind. Es wird angenommen, dass sich der Kanal lateral zu den Lipiden der Membran hin öffnen kann und die einzelnen Transmembransegmente in die Membran entlassen werden (Rapoport, 2007; Clemons *et al.*, 2004). Die Aktivierung der Translokase erfolgt durch den Kontakt zur Signalsequenz, wobei sich diese haarnadelförmig zwischen TMS 2b und 7 schiebt. Durch diesen Vorgang erfährt SecY eine Konformationsänderung, die Plug-Domäne wird ins Periplasma verlagert, wodurch die durchgängige Pore gebildet wird (van den Berg *et al.*, 2004).

SecE ist 14 kDa groß, besitzt drei Transmembranbereiche (Schatz *et al.*, 1989) und ist ebenfalls essentiell für die Lebensfähigkeit von *E. coli*. Es bildet zusammen mit SecY den eigentlichen Kern der Translokationspore (Brundage *et al.*, 1990) und stabilisiert den Komplex (Kihara *et al.*, 1995) als molekulare Klammer. Zusätzlich schützt es SecY vor dem proteolytischen Abbau durch die membrangebundene Protease FtsH (Kihara *et al.*, 1995).

Das dritte Protein des Komplexes ist SecG; hierbei handelt es sich um ein Membranprotein mit 11,4 kDa Größe und zwei Transmembranbereichen. Es ist nicht essentiell für das Bakterium und nur lose mit SecYE verbunden. Es stabilisiert *in vivo* die SecYE-vermittelte Proteintranslokation bei niedrigen Temperaturen (Nishiyama *et al.*, 1994) oder wenn die protonenmotorische Kraft reduziert ist (Hanada *et al.*, 1996). Es wird vermutet, dass es das Eintauchen von SecA in die Membran bei niedrigen Temperaturen erleichtert (Nishiyama *et al.*, 1996). Da es auf der cytoplasmatischen Seite einen hydrophoben Bereich besitzt, der kurzzeitig in die Membran integriert, kann es zu einer topologischen Inversion führen (Nishiyama *et al.*, 1996).

SecD (65 kDa), SecF (35 kDa) und YajC (12 kDa) bilden zusammen einen zusätzlichen Komplex, der die Insertion und Translokation von Proteinen erleichtert, für das Überleben jedoch nicht essentiell ist (Luirink *et al.*, 2005; Xie & Dalbey, 2008). Vermutlich wird der Kontakt zwischen YidC und SecYEG über den Zugangskomplex SecDFYajC vermittelt (Nouwen & Driessen, 2002). SecD und SecF besitzen beide sechs Transmembranbereiche und verstärken die Translokation sekretorischer Proteine *in vivo* (Pogliano *et al.*, 1994). Ebenfalls verbessern sie die Insertion von Membranproteinen (Chen *et al.*, 2005) und üben regulatorische Funktion aus, indem sie SecA in seiner inserierten Form stabilisieren (Economou *et al.*, 1995). Zusätzlich scheinen SecDF das Zurückfallen der Präproteine aus der Membran zu verhindern, sie regulieren den Zyklus von SecA und entlassen die translozierten Proteine aus der Translokationspore (Nouwen & Driessen, 2002). YajC besitzt nur einen Membrandurchgang und hat für den Translokationsvorgang keine nachgewiesene Funktion. Es scheint für den Export von Proteinen oder den Einbau von Membranproteinen von Bedeutung zu sein. Da es ebenfalls als Komplex mit dem Protein AcrB

## Einleitung

vorkommt, welches eine Komponente des *multidrug efflux system* AcrAB-TolC darstellt, ist die funktionelle Beteiligung an der Sec-Translokase fraglich.

SecA (102 kDa) ist der molekulare Motor, der die Hydrolyse von ATP dazu verwendet, die Bewegung von jeweils 20-30 Aminosäureresten der Polypeptidkette voranzutreiben (zusammengefasst in Vrontou & Economou, 2004). Durch die wiederholte Bindung und Hydrolyse von ATP, als auch das mehrfache Binden und Entlassen der Polypeptidkette, erfolgt die Translokation über die Membran. Für die effiziente Translokation werden zwei Protomere von SecA benötigt, welche mit dem an SecB gebundenen Substrat verbunden sind (Mao *et al.*, 2009). Der tetramere Komplex aus SecB-Untereinheiten bindet über seine C-Termini an den Carboxy- (Zhou & Xu, 2003) und den Aminoterminus von SecA (Randall & Henzl, 2010). Das Protein SecA interagiert noch über die PPXD (englisch: **pre**protein **cross**-linking **d**omain) mit Präproteinen (Kimura *et al.*, 1991; Papanikou *et al.*, 2005), C-terminal mit Lipiden (Breukink *et al.*, 1993 und 1995; Cooper *et al.*, 2008) und SecYEG (Cooper *et al.*, 2008; Bauer & Rapoport, 2009), weshalb die Bindung von SecB zunächst aufgehoben werden muss, so dass die Bindungstasche für andere Partner frei wird. SecA besitzt zwei Nukleotid-Bindedomänen (NBD1 und NBD2) zur ATP-Bindung, eine weitere Domäne für die Substratspezifität und eine regulatorische, carboxyterminale Region (zusammengefasst in Vrontou & Economou, 2004). Die verlängerte Grube, die für die Substrat-Erkennung zuständig ist, besteht aus unpolaren Aminosäureresten, die von sauren umgeben werden (Gelis *et al.*, 2007). Das Protein SecA wird für die Translokation von Membranproteinen mit großen periplasmatischen Loops mit mehr als 60 hydrophilen Aminosäureresten benötigt (Kuhn, 1988; Andersson & von Heijne, 1993) und in seltenen Fällen auch für kürzere (Cao *et al.*, 1995). SecA bindet wie FtsY an die Phospholipide der Membran (Breukink *et al.*, 1992) und an den Translokationskomplex über das Protein SecY (Karamanou *et al.*, 2008). Wie jedoch die Lieferung der Energie für den Translokationsvorgang bewerkstelligt wird, ist noch ungeklärt. Das Ribosom und SecA binden während der co-translationalen Translokation an dieselbe Bindungsstelle von SecY (Zito & Oliver, 2003). Deshalb könnte SecA die Translokation vorantreiben, nachdem das Ribosom SecYEG verlassen hat.

## 1.4.2. Sec-unabhängige Translokation

### 1.4.2.1. Tat-Transportsystem

Der Tat-Transportweg gehört zu den Sec-unabhängigen Transportsystemen (siehe Abb7). Er ist an der Translokation von Präproteinen beteiligt, die in ihrer Signalsequenz ein Doppel-Arginin-Motiv besitzen (Berks *et al.*, 2000) mit der Consensus-Sequenz **SRRxFLK** (siehe Abb4), wobei die beiden Argininreste (R) invariant sind (Berks, 1996). Mithilfe des Tat-Systems (englisch:

## Einleitung

twin arginine translocation, Tat) können native, schon gefaltete Proteine transportiert werden. Homologe zu diesem Transportsystem kommen in Prokaryonten, sowie in der Thylakoidmembran der Chloroplasten vor (Robinson *et al.*, 2000), nicht hingegen in tierischen Zellen. Das N-terminal gelegene Tat-Signalpeptid ist dem des Sec-Systems sehr ähnlich, scheint aber weniger hydrophob zu sein (siehe Abb4).

Es wird angenommen, dass das Tat-Translokationssystem, wie andere Transportsysteme, einen wässrigen Kanal bildet. Um die Ionenpermeabilitätsbarriere zur Aufrechterhaltung des transmembranen Protonengradienten zu gewährleisten, muss das Öffnen des Kanals Substrat-induziert sein. Diese Substrate können sehr unterschiedlich in ihrer Form und Größe sein. Die Größe des Kanals wird an den Umfang des zu transportierenden Proteins angepasst. Somit wird erreicht, den Kanal möglichst weit zu schließen, um das Austreten von Ionen zu verhindern.

In *E. coli* wurden vier Gene entdeckt, die für Proteine des Tat-Komplexes kodieren. Dazu gehören *tatA*, *tatB* und *tatC*, die sich auf einem Operon befinden, sowie das getrennt liegende *tatE* (Weiner *et al.*, 1998; Sargent *et al.*, 1998; Bogsch *et al.*, 1998). Ein cytoplasmatisches Protein, TatD, liegt ebenfalls auf dem *tatABCD*-Operon, hat aber für die Exportfunktion keine Bedeutung. Die Proteine TatA (9,6 kDa), TatB (18,4 kDa) und TatE (28,9 kDa) sind sequenzähnlich und membranassoziiert, während das TatC sechs Transmembranbereiche besitzt, wobei der N- und der C-Terminus im Cytoplasma lokalisiert sind (Sargent *et al.*, 1998). TatA bildet vermutlich den eigentlichen Transportkanal (Line & Mori, 2001) und scheint eine Donut-ähnliche Struktur aufzuweisen (Gohlke *et al.*, 2005). TatA und TatB sind beide Bestandteil eines ringförmigen Komplexes (Sargent *et al.*, 2001). Sie sind zu 50% homolog in ihrer Sequenz, während TatB eine verlängerte C-terminale Region besitzt. Cross-linking-Experimente haben gezeigt, dass TatA zumindest Homotrimere und TatB Homodimere bilden können (de Leeuw *et al.*, 2001). Das molare Verhältnis der Proteine TatA:TatB:TatC scheint in der *E. coli*-Membran bei 40:2:1 zu liegen (Jack *et al.*, 2001). Die Anpassung des Durchmessers des Kanals erfolgt durch das Hinzufügen oder Entfernen von TatA-Untereinheiten, was einen sehr dynamischen Packmechanismus der Protomere erfordert. Die Polymerisation der TatA-Untereinheiten wird durch die Bindung des Substrates an den Komplex TatBC initiiert (Cline & Theg, 2007). Der TatBC-Komplex scheint eine Konformationsänderung nach der Substratbindung zu durchlaufen, welcher die Komplexierung mit TatA (siehe Abb7 IV) ermöglicht (Tarry *et al.*, 2009). Das Substrat wird dann unmittelbar vor der Translokation an TatA weitergegeben (Alami *et al.*, 2003). TatBC kann somit als Rezeptorelement des Translokationsweges angesehen werden (de Leeuw *et al.*, 2002; Cline & Mori, 2001; Alami *et al.*, 2003), während TatC die primäre Bindungsstelle für das Signalpeptid darstellt. Der Tat-Transport ist abhängig von der Energie des elektrochemischen Protonengradienten über die Membran (Yahr & Wickner, 2001). Die Tat-Substrate werden entweder durch ein am C-Terminus gelegenes Transmembransegment in der

## Einleitung

Cytoplasmamembran verankert oder ins Periplasma entlassen. Die sekretierten Proteine werden dann durch die Leaderpeptidase (Lep) prozessiert, wobei das Tat-Signalpeptid abgeschnitten wird. Anders als bei der Translokation via SecAYEG, benötigt die Zelle für den Transport durch den Tat-Transportweg keine Energie in Form von ATP durch SecA, sondern ist von der protonenmotorischen Kraft abhängig.

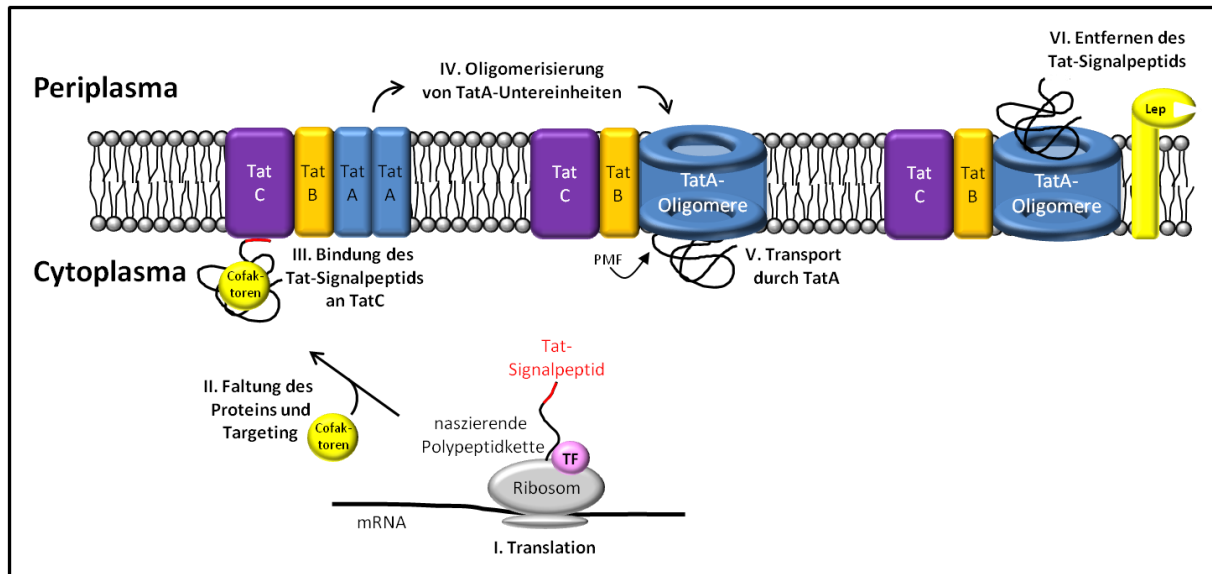


Abb7. **Schematische Darstellung des Tat-Transportsystems**

Nach der Translation (I.) des Tat-Substrates binden Cofaktoren an die Polypeptidkette und das Protein wird nativ gefaltet (II.). Das gefaltete Protein gelangt an die Membran und bindet mit der Tat-Signalsequenz an TatC, wodurch der Komplex TatBC gebildet wird. Die Bindung des Substrates initiiert die spezifische Oligomerisierung von unterschiedlich vielen Protomeren von TatA (IV.), somit entsteht der eigentliche Transportkanal. Das Protein wird abhängig von der protonenmotorischen Kraft durch die Membran transportiert (V.). Nach dem Heraustreten des Proteins aus dem Tat-Komplex wird das Protein durch die Leaderpeptidase (Lep) prozessiert (VI.).

### 1.4.2.2. Die Membraninsertase YidC von *Escherichia coli* ("YidC-only"-Weg)

Die Membraninsertase YidC aus dem Gram-negativen Bakterium *Escherichia coli* ist das am besten charakterisierte Mitglied der YidC/Oxa1/Alb3-Proteinfamilie (zusammengefasst in Funes *et al.*, 2011). Das 61 kDa große Protein besitzt sechs **T**rans**m**embran**s**eg**m**ente (TMS), wobei die N- und C-Termini auf der cytoplasmatischen Seite lokalisiert sind (siehe Abb8). Zwischen den ersten beiden Transmembranbereichen befindet sich eine große periplasmatische Domäne aus 320 Aminosäureresten. Das Membranprotein YidC wird SRP-vermittelt an die Membran geleitet und mit der Hilfe von SecA und dem Translokationskomplex SecYEG in die cytoplasmatische Membran von *E. coli* inseriert (Koch *et al.*, 2002). YidC ist in allen Eubakterien vorhanden und besitzt Homologe in Mitochondrien und Chloroplasten (Kuhn *et al.*, 2003). Im Unterschied zu den beiden Homologen Oxa1 und Alb3 besitzt YidC keine spaltbare Signalsequenz (Sääf *et al.*, 1998).

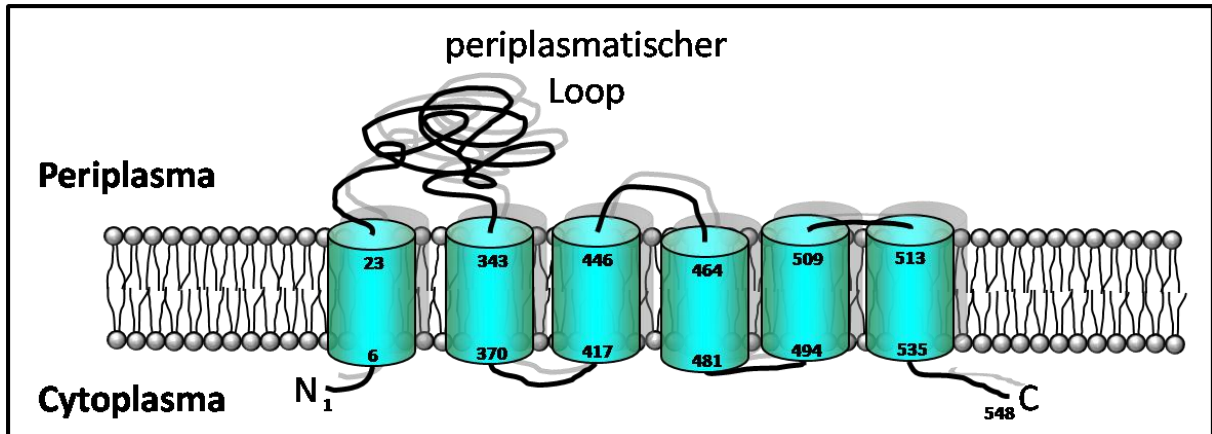


Abb8. Topologie der Membraninsertase YidC

Mitglieder der YidC-Proteinfamilie, die fünf Transmembransegmente besitzen, weisen eine signifikante Sequenzhomologie im C-Terminus auf (Yen *et al.*, 2001). Auch die Transmembranbereiche TMS 2, TMS 3 und TMS 5 sind homolog (Yen *et al.*, 2001). Die Vertreter der YidC/Oxa1/Alb3-Familie besitzen alle einen konservierten Kern aus fünf Transmembranbereichen, welcher die Insertasefunktion erfüllt. Bei diesen Proteinen handelt es sich um eine evolutionär hoch konservierte Membranproteinfamilie, deren Funktion darin liegt, Membranproteine in der Membran von Mitochondrien, Chloroplasten und Bakterien zu verankern. YidC ist für das Wachstum von *E. coli* essentiell (Samuelson *et al.*, 2000), vermutlich da es an der Membraninsertion der Untereinheit c der  $F_1F_0$  ATP-Synthase (van der Laan *et al.*, 2004) und der Untereinheit II der Ubiquinoloxidase beteiligt ist (Celebi *et al.*, 2006).

Oxa1 ist in der Innenmembran der Mitochondrien lokalisiert und an der Insertion der Proteine in die mitochondriale Membran beteiligt. Es besitzt fünf Transmembransegmente und zusätzlich am N-Terminus eine spaltbare Signalsequenz. Oxa1 von *Saccharomyces cerevisiae* besitzt 402 Aminosäurereste und hat nach der Prozessierung eine Größe von 36 kDa. C-terminal befindet sich eine Domäne, die als Ribosomen-Bindestelle dient (Jia *et al.*, 2003; Preuss *et al.*, 2005). Wenn es aus *Neurospora crassa* gereinigt wird (Nargang *et al.*, 2002) liegt es in tetramerer Form vor. Der Name Oxa1 (englisch: **ox**idase **a**ssembly) rührt daher, dass zunächst Mutanten isoliert wurden, die einen Defekt der Cytochrom c Oxidase zeigten (Bauer *et al.*, 1994; Bonnefoy *et al.*, 1994). Die Mitochondrien besitzen selbst keine homologen Proteine zum Sec-Komplex, somit ist Oxa1 die einzige Proteintranslokase und vermutlich noch bedeutsamer (Glick & von Heijne, 1996).

Das YidC-Homolog Alb3 ist ebenfalls ein integrales Membranprotein und liegt in der Thylakoidmembran der Chloroplasten. Zuerst entdeckt wurde es in der Thylakoidmembran einer Chlorophyll-Mangelmutante von *Arabidopsis thaliana*. Es besitzt wie Oxa1 fünf

## Einleitung

Transmembranbereiche, wodurch sich der N-Terminus im Thylakoidlumen und der C-Terminus im Stroma befinden. Alb3 vermag die Funktion von YidC in *E. coli* zu ersetzen (Kuhn *et al.*, 2003). Der Name Alb3 rührt daher, dass es bei Mangelmutanten zu einer Reduktion der Pigmente kommt, welche daher als **Alb**ino bezeichnet wurden (Sundberg *et al.*, 1997). Die Chloroplasten dieser Alb3-Mutante besitzen eine anormale Form und nur wenige Thylakoidmembranen. Alb3 ist ähnlich der anderen Familienmitgliedern an der Insertion von Membranproteinen in die Thylakoidmembran beteiligt, unter anderem an der Biogenese des LHCP (englisch: **l**ight **h**arvesting **ch**lorophyll **b**inding **p**rotein).

YidC besitzt im Gegensatz zu Oxa1 und Alb3 einen zusätzlichen N-terminalen Transmembranbereich und eine 320 Aminosäuren (AS 24-342) lange periplasmatische Domäne (~ 35 kDa) zwischen der TMS 1 und TMS 2 (Sääf *et al.*, 1998). Es konnte nachgewiesen werden, dass speziell die Aminosäuren 215 bis 265 im periplasmatischen Loop von YidC an SecF binden (Xie *et al.*, 2006). Für die Bindung allgemein an die Sec-Translokase scheinen aber auch andere Sequenzen von YidC verantwortlich zu sein. Eine Deletion von selbst großen Bereichen dieses Loops, beeinträchtigt die Funktion der Insertase nicht gravierend. Diese Tatsache scheint plausibel, wenn man betrachtet, dass sowohl Oxa1 als auch Alb3 diese große periplasmatische Domäne (P1D) fehlt. Mitochondriales Oxa1 kann den Teil TMS 2 bis TMS 6 von YidC in *E. coli* ersetzen (Preuss *et al.*, 2005), während YidC für Oxa1 die Integration von Membranproteinen in die mitochondriale Innenmembran komplementiert (van Bloois *et al.*, 2005). Die periplasmatische Domäne von YidC nimmt eine Struktur ein, bei der der N-terminale Teil als  $\beta$ -Supersandwich gefaltet vorliegt, auf welches eine eher flexible,  $\alpha$ -helikale Verbindungsregion C-terminal folgt. Der N-terminale Teil der periplasmatischen Domäne ist eher flexibel an die Transmembranhelix 1 gebunden. Das Oxa1-Protein hingegen besitzt C-terminal eine Verlängerung, die als Ribosomen-Bindestelle dient. Erstaunlicherweise hat das Ersetzen von TMS 1 und 90% der P1-Domäne des YidC-Proteins durch eine andere TMS keine nennenswerten Auswirkungen auf die Insertase-Funktion (Jiang *et al.*, 2003). Die Region der Aminosäuren 323-346 sind aber für das Zellwachstum und die Membraninsertion von sowohl Sec-abhängigen als auch Sec-unabhängigen Substraten essentiell (Jiang *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2006). Die Transmembranhelix 3 konnte mit dem ersten Transmembranbereich von sowohl Sec-abhängigen als auch Sec-unabhängigen Substraten während oder kurz nach deren Synthese vernetzt werden (Klenner *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2008).

YidC wurde als Chaperon oder als Kanal beschrieben (Kuhn *et al.*, 2003; Dalbey & Kuhn, 2004, Kohler *et al.*, 2009). Es ist noch ungeklärt, wie das Targeting via SRP bewerkstelligt wird, da YidC, die bei dem mitochondrialen Protein Oxa1 C-terminal gelegene Verlängerung, fehlt, die als Ribosomen-Bindestelle dient (Jia *et al.*, 2003; Szyrach *et al.*, 2003). Der Kontakt zwischen YidC



## Einleitung

und dem Transmembranbereich der naszierenden Polypeptidkette ist abhängig vom Zusammenhang des Polypeptids mit dem Ribosom (van Bloois *et al.*, 2008). Studien an der Untereinheit c der  $F_1F_0$  ATP-Synthase ( $F_0c$ ) haben gezeigt, dass zwei der drei positiven Ladungen im cytoplasmatischen Loop (M-Region) für die Erkennung durch YidC ausreichen. Werden jedoch zwei oder alle drei positiven Aminosäurereste deletiert, so ist die Erkennung durch YidC gänzlich unterbunden. Bei diesen Studien wurde ebenfalls bewiesen, dass die beiden negativ geladenen Aminosäurereste am N-Terminus der M-Region keine Auswirkung auf die YidC-abhängige Erkennung haben (Kol *et al.*, 2008). Der Zuckertransporter LacY durchspannt die Membran zwölfmal und benötigt YidC für die richtige Faltung. Durch die Depletion von YidC wird der Membraneinbau von LacY nicht gestört, da das Protein Sec-abhängig inseriert, die korrekte Konformation in der Membran wird jedoch nicht erreicht (Nagamori *et al.*, 2004). YidC scheint somit einen Montageort für die Faltung der Transmembranbereiche darzustellen.

Aus Cryo-Elektronen-Mikroskopie-Untersuchungen wird vermutet, dass das Monomer YidC eine Membranpore bilden kann, wenn es mit einem translatierenden Ribosom assoziiert vorliegt. Das YidC-Protein ist dann in der Lage, mit einem anderen YidC-Molekül Homodimere zu bilden (Kohler *et al.*, 2009) oder mit der Sec-Translokase zu assoziieren, je nachdem um welches Substrat es sich handelt (Lotz *et al.*, 2008). Ob YidC nun in monomerer Form oder als Dimer vorliegt, ist noch nicht abschließend geklärt. Studien von Nouwen und Driessen (2002) zeigen, dass YidC auf einem nativen Polyacrylamidgel zum Teil als Dimer ( $\sim 140$  kDa) läuft. Wenn man SDS zu diesem Komplex gibt, so zerfällt er zu den 60 kDa großen Monomeren, was auch bei der Solubilisierung des Proteins mit Detergenz geschieht (Boy & Koch, 2009).

Viele Membranproteine benötigen SRP und SecYEG für ihren Membraneinbau. Die Insertion der meisten Proteine der Atmungskettenkomplexe und ATP-Synthasen in die Bakterienmembran, aber auch in die Membranen der Mitochondrien und Chloroplasten sind abhängig von funktionierenden Insertionsmaschinerien wie YidC, Oxa1 und Alb3. Die Depletion von YidC führt zum Absinken der protonenmotorischen Kraft (pmf) der Zelle, aufgrund der gestörten Membraninsertion der Cytochrom  $bo_3$  Oxidase und der  $F_1F_0$  ATP-Synthase (van der Laan *et al.*, 2003), einige Komplexe der Elektronentransportketten werden gestört und diverse Stressantworten der Zelle eingeleitet (Wang *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2011). Im Sec-abhängigen Translokationsweg (siehe Abb6) interagiert YidC mit den Transmembranhelices der Substrate nach dem Verlassen der Translokase SecYEG. Man vermutet, dass YidC dann als Membranchaperon dient. Die Sec-abhängige Insertion von Membranproteinen vollzieht sich vermutlich meistens co-translational, da man YidC gebunden an naszierenden Polypeptidketten Sec-abhängiger Proteine gefunden hat (Froderberg *et al.*, 2004). YidC könnte somit an der Proteinfaltung, am Assembly (Zusammenbau) und an der Qualitätskontrolle beteiligt sein. Es

## Einleitung

katalysiert den endgültigen Verankerungsprozess der Sec-abhängigen Substrate wie FtsQ, Lep, MtlA und LacY (Urbanus *et al.*, 2001; Beck *et al.*, 2001; van den Berg *et al.*, 2004; van Bloois *et al.*, 2006). YidC kann jedoch auch stromaufwärts bezüglich der Sec-Translokase arbeiten, wie eine Beteiligung an der beginnenden Translokation der N-terminalen Region der naszierenden Polypeptidkette des Lipoproteins CyoA zeigt. Erst nach der Interaktion mit YidC wird der C-Terminus von CyoA mithilfe von SecYEG transloziert (van Bloois *et al.*, 2006; du Plessis *et al.*, 2006; Celebi *et al.*, 2006). Da YidC zahlenmäßig viel häufiger in der Membran vorkommt als SecYEG (Driessen, 1994), ist anzunehmen, dass es sowohl in assoziierter Form mit SecYEG, aber auch in ungebundener Form vorkommt. Es konnte mit SecYEG co-gereinigt werden (Scotti *et al.*, 2000), scheint aber auch als Sec-unabhängige Membraninsertase zu fungieren (Serek *et al.*, 2004). Weitere Studien haben ergeben, dass YidC nicht nur an der Sec-abhängigen und -unabhängigen Membraninsertion beteiligt ist, sondern auch an der Sekretion von Proteinen via SecYEG in das Periplasma (Froderberg *et al.*, 2004; Pradel *et al.*, 2005; Jong *et al.*, 2010). Der Autotransporter **H**emoglobin **P**rotease (Hbp) wird mithilfe von SecYEG über die Membran transloziert und scheint *in vitro* zu einem späten Stadium des Transports mit YidC zu interagieren (Jong *et al.*, 2010). Hbp wird im Gegensatz zu anderen sekretierten Proteinen nicht von SecB zur Translokase geleitet, sondern ist SRP-abhängig (Sijbrandi *et al.*, 2003; Jong & Luirink, 2008), wodurch es zu einer untypischen Verwendung der Sec-Translokase kommt. Eventuell benötigt Hbp das Membranprotein YidC anschließend im Periplasma als Faltungshelfer.

Im Sec-unabhängigen „YidC-only“-Weg (siehe Abb9) ist YidC in die Membran eingelagert und an der Insertion zum Beispiel von MscL (Samuelson *et al.*, 2000; Price *et al.*, 2011), der c-Untereinheit der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase (van der Laan *et al.*, 2004), sowie einiger kleiner Phagenproteine wie Pf3 coat und M13 procoat beteiligt. Substrate des „YidC-only“-Weges sind meist eher kleine Proteine, die häufig aus nur zwei durch einen „helical hairpin“ verbundenen Transmembranbereichen bestehen (Kiefer & Kuhn, 2007). Noch nicht abschließend geklärt ist, ob der Sec-unabhängige Weg bevorzugt post-translational oder co-translational abläuft. Diese Frage stellt sich bei kurzen Proteinen nicht, da deren Synthese beendet ist, bevor eine lange hydrophobe Region das Ribosom (Exportkanal) verlassen hat. Während die YidC-Substrate, wie Pf3 coat und M13 procoat post-translational ohne die Beteiligung eines anderen Proteins zur Membran gelangen (Abb9 IIa), ist der SRP am co-translationalen Targeting des Sec-unabhängigen Substrates MscL (Facey *et al.*, 2007) und der c-Untereinheit der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase (F<sub>0</sub>c) (van Bloois *et al.*, 2004) beteiligt (Abb9 IIb). Das Substrat wird an die Insertase gebunden und sodann in die Membran entlassen. Die korrekte Faltung in der Membran könnte ebenfalls mithilfe von YidC erfolgen.

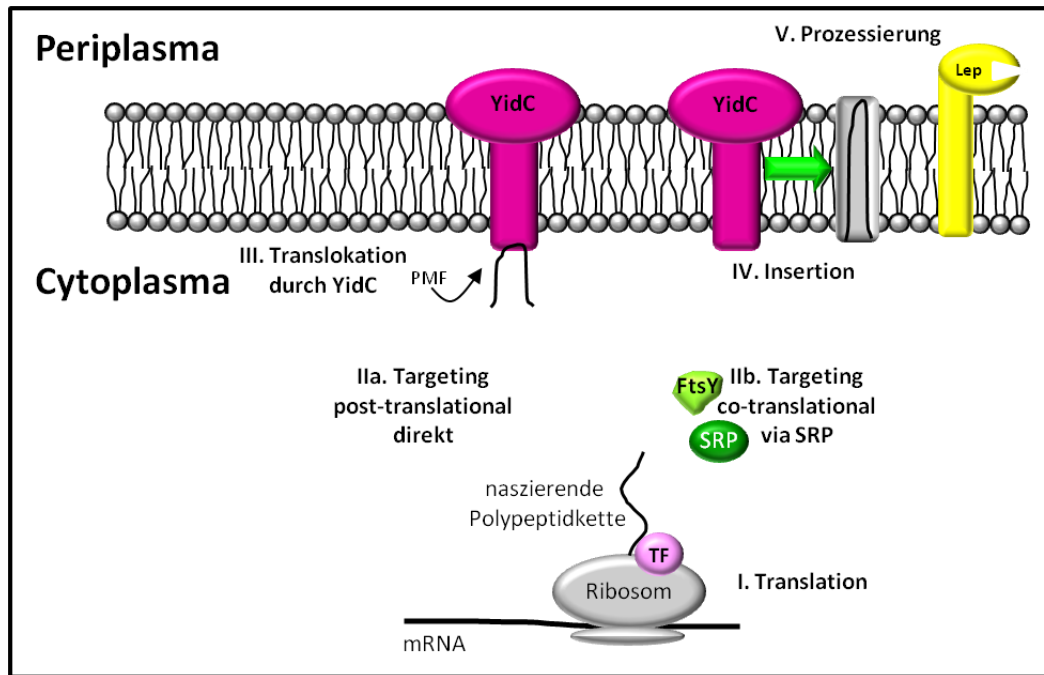


Abb9. „YidC-only“-Weg

Die naszierende Polypeptidkette gelangt nach der Translation am Ribosom (I.) entweder post-translational direkt (IIa.) ohne Beteiligung von anderen Proteinen (Pf3 coat, M13 procoat) oder aber co-translational mithilfe des SRP (MscL, c-Untereinheit der  $F_1F_0$ -ATP-Synthase) an die Membran (IIb.). Das Substrat wird durch die Insertase YidC in die Membran hinein transportiert und lateral in den Lipidbilayer abgegeben (IV.). Nach dem Einbau wird gegebenenfalls die Signalsequenz durch die Leaderpeptidase (Lep) abgespalten (V.).

## 1.5. Liposomen

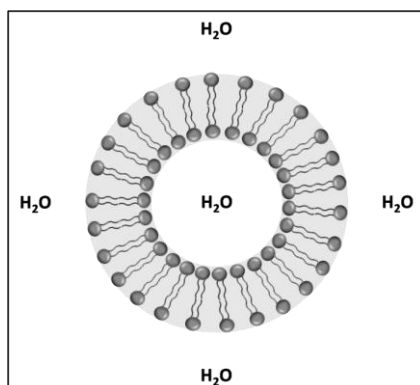


Abb10. Schematische Darstellung eines Lipidvesikels

Liposomen („lipos“ = griech. Fett und „soma“ griech. Körper) sind künstlich hergestellte, in sich geschlossene Phospholipidvesikel. Es handelt sich hierbei um kugelförmige Gebilde (siehe Abb10), die einen mit wässrigem Medium gefüllten Innenraum besitzen, welcher durch eine Lipiddoppelschicht umgeben ist (Eytan *et al.*, 1982).

Diese künstlichen Membransysteme ähneln in ihren physikochemischen Eigenschaften den biologischen Membranen, weshalb sie als deren Modellsystem verwendet werden können. Man kann mithilfe von Liposomen verschiedene membranphysiologische Prozesse wie die Zell-Zell-Wechselwirkungen, Interaktionen von Membranproteinen und Transportvorgänge in oder über die Membran studieren. Zusätzlich können die Integration von Membranproteinen in die

## Einleitung

Lipiddoppelschicht, die topologischen Eigenschaften der integrierten Proteine und deren Funktionstüchtigkeit nach der Rekonstitution untersucht werden.

Diese künstlichen Lipidvesikel entstehen, wenn man die gewünschten Lipide in einem Lösungsmittel wie Chloroform löst und diese dann durch Entfernen des Lösungsmittels unter Vakuum trocknet. Dabei entsteht ein möglichst dünner, trockener Lipidfilm (siehe Abb11), der anschließend in einem wässrigen Medium resuspendiert werden kann. Bei diesem Vorgang entstehen so genannte **multi**lamellare **V**esikel (MLV), da die Lipidfilme beim Kontakt mit Wasser aufschwellen und sich dann zu kugelartigen Gebilden verbinden. Die dabei entstehenden MLV bestehen aus mehreren übereinander angeordneten Bilayern, die in konzentrischen Schichten, zwiebelartig übereinander gelagert sind. Liposomen, die von nur einer Lipiddoppelschicht umgeben sind, nennt man unilamellar. Dabei unterscheidet man abhängig von der Größe große und kleine unilamellare Vesikel. Große unilamellare Vesikel (englisch: **l**arge **u**nilamellar **v**esicles, LUV) besitzen einen Durchmesser von 100 nm bis 10 µm, kleine unilamellare Vesikel (englisch: **s**mall **u**nilamellar **v**esicles, SUV) hingegen sind nur zwischen 10 nm bis 100 nm groß. SUV können durch verschiedene Verfahren hergestellt werden, wie etwa der Dispergierung durch Ultraschall von Phospholipiden in Wasser oder mittels der Extrudermethode, LUV hingegen können nur mithilfe des Extruders gewonnen werden. Hierbei wird die Lipidsuspension durch einen Filter mit einer definierten Porengröße gedrückt. Dabei werden die multilamellaren Vesikel durch die Öffnungen in der Membran gepresst und somit an deren Größe angepasst.

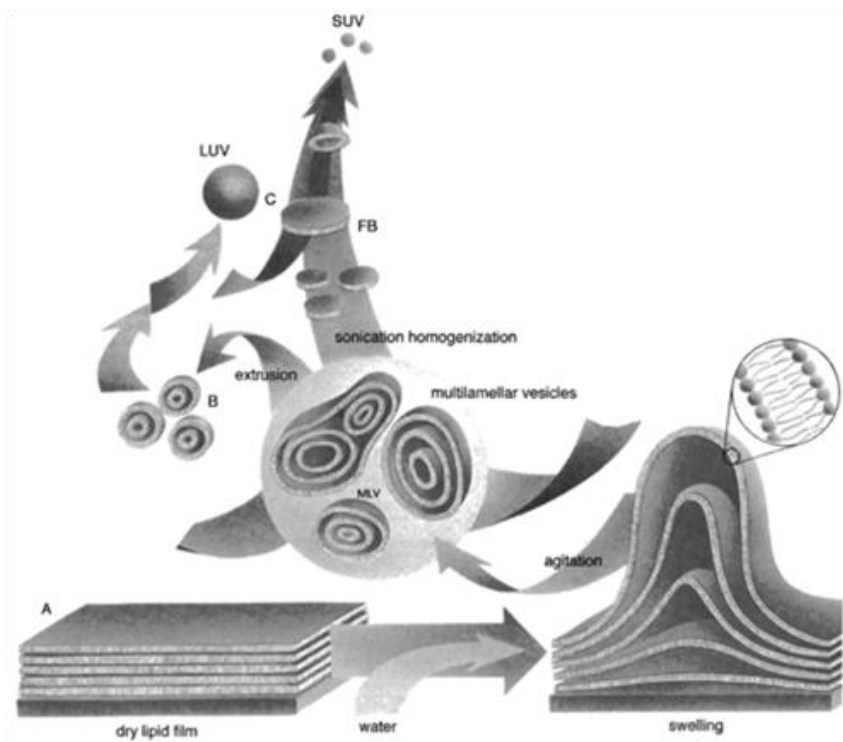


Abb11. Schematische Darstellung der Herstellung von unilamellaren Vesikeln (Quelle: [www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com); Avanti Polar Lipids, Inc.)

## Einleitung

Die Liposomen können bezüglich ihrer Lipidzusammensetzung, der Pufferbedingungen wie pH-Wert oder Ionenkonzentration im Innenraum des Vesikels, aber auch durch die Rekonstitution von Membranproteinen variiert werden. Liposomen, in die Membranproteine eingebaut wurden, nennt man Proteoliposomen. Sie können ebenfalls in Form von MLV, LUV oder SUV hergestellt werden.

## 1.6. Rekonstitution von Membranproteinen

Unter Rekonstitution versteht man den funktionstüchtigen Einbau eines Membranproteins in ein Membransystem (Eytan *et al.*, 1982). Diese Membransysteme können zum Beispiel Liposomen oder auch andere Formen von Membranen sein.

Für die Rekonstitution erforderlich ist ein nativ gefaltetes Membranprotein, welches in Detergenz gereinigt vorliegt. Um ein Membranprotein möglichst nativ in großen Mengen aus Bakterien zu reinigen, muss es zunächst in einem geeigneten Bakterienstamm überproduziert werden. Das Membranprotein muss dann aus der Membran herausgelöst werden, indem es mithilfe von Detergenzmolekülen solubilisiert wird. Hierbei geht das Protein in einem wässrigen Medium in Lösung, da es sich in die Detergenzmizellen einlagern kann. Für diesen Vorgang ist die Wahl des richtigen Detergenzes von großer Bedeutung. Detergenzien sind Seifen, die als molekulare Zwitter sowohl hydrophile als auch hydrophobe Eigenschaften vereinen. In wässrigem Medium bilden die Detergenzmoleküle sogenannte Mizellen aus. Hierbei handelt es sich um Aggregate aus Seifenmolekülen, die sich oberhalb der kritischen mizellären Konzentration (englisch: **c**ritical **m**icelar **c**oncentration, cmc) der jeweiligen Seife bilden. Liegt die Konzentration unterhalb der cmc, so liegen die Detergenzmoleküle in monomerer Form vor. Erst nach dem Überschreiten der kritischen Konzentration lagern sich die Seifenmoleküle zu Mizellen zusammen. Diese Mizellen sind zirkulär angeordnete Monolayer aus Detergenzmolekülen, bei denen die hydrophoben Bereiche im Inneren der Mizellen angeordnet sind und die hydrophilen Teile dem äußeren wässrigen Medium zugewandt liegen. Die Größe der Mizellen, also die durchschnittliche Anzahl an Detergenzmolekülen pro Mizelle, und deren Form sind von dem verwendeten Detergenz abhängig. Die Größe der Mizellen wird zusätzlich von der Temperatur, dem pH-Wert des Puffers und der Anwesenheit von Lipiden bestimmt. Diese Mizellen können den Membranproteinen eine neue Umgebung bieten. Beim Solubilisieren lagern sich die Seifenmoleküle mit den hydrophoben Bereichen an die Transmembranbereiche des Proteins an und verdrängen dabei die Phospholipide. Das Protein geht in Lösung und bildet Komplexe aus Detergenz, Protein und Lipidmolekülen.

## Einleitung

Das zu rekonstituierende Membranprotein kann in vorgefertigte Membranen mittels verschiedener Techniken eingebaut werden. Die Rekonstitution kann grundsätzlich in zwei verschiedene Richtungen erfolgen, was Einfluss auf die Funktionalität des Proteins nimmt. Das Membranprotein kann „cytoplasmic-out“ oder „periplasmic-out“ eingebaut werden. Hierfür verwendet werden kann die Extrudermethode (siehe 6.27), wobei das solubilisierte Membranprotein direkt zu der zu extrudierenden Lipidsuspension gegeben wird. Ebenfalls möglich ist eine spätere Rekonstitution in bestehende Lipidvesikel (LUV oder SUV) mithilfe von Detergenz. Hierbei wird das Detergenz in Überschuss (10-fach) zu den Liposomen gegeben. Die Detergenzmoleküle werden in die Liposomen eingelagert, wobei diese ihren Durchmesser vergrößern. Nach dem Einbau des zu rekonstituierenden Membranproteins, kann das Detergenz durch Zugabe von hydrophoben Matrices (wie zum Beispiel die Harzkügelchen Bio Beads von Bio Rad) entfernt werden, die über hydrophobe Wechselwirkungen das Detergenz adsorbieren, so dass das Protein möglichst nicht mehr von Detergenzmolekülen umgeben ist. Auch durch Verdünnen der Suspension aus Lipid, Protein und Detergenz oder Dialyse kann die Konzentration der Seife so weit reduziert werden, dass das Membranprotein fest in der Membran verankert wird.

### 1.7. M13 procoat

Das Protein M13 procoat ist eines der ersten Modellproteine, das zur Untersuchung von *in vitro*-Translokationsstudien herangezogen wurde (Watts *et al.*, 1981; Ohno-Iwashita & Wickner, 1983). M13 procoat ist das Vorläuferprotein des Hauptkapsidproteins des Phagens M13 und hat mit 73 Aminosäuren (AS) ein Molekulargewicht von 7,63 kDa. Das mature Protein M13 coat besitzt nach der Spaltung der Signalsequenz durch die Leaderpeptidase ein Molekulargewicht von 5,28 kDa. Der Phage M13 zählt zu den filamentösen Phagen und enthält ein einzelsträngiges, ringförmiges DNA-Molekül mit 6407 Nukleotiden. Die reifen Phagenpartikel werden aus der Wirtszelle sekretiert ohne den Wirt zu lysieren. Der Zusammenbau des Phagenpartikels erfolgt an der inneren Membran von *E. coli*. Hierbei werden die Proteine gp1, gp3, gp6, gp7, gp8, gp9 und gp11 in die cytoplasmatische Membran integriert, während gp4 einen Komplex aus 10-12 Untereinheiten in der Außenmembran bildet (Linderoth *et al.*, 1997), der dem assemblierten Phagenpartikel als Kanal aus der Zelle dient. Während des Zusammenbaus des Phagens bindet M13 coat (gp8) das positiv geladene C-terminale Ende der Einzelstrang-DNA (Hunter *et al.*, 1987; Greenwood *et al.*, 1991). Das fertige Kapsid von M13 ist ca. 900 nm lang und besitzt einen Durchmesser von ca. 7 nm (Ploss & Kuhn, 2010). Das Genprodukt gp8 kodiert für das Haupt-hüllprotein M13 coat und bildet mit 2800 Kopien den Großteil des Kapsids. An den Enden des Partikels sind Kopien von gp3 und gp6 (distal) bzw. gp7 und gp9 (proximal) lokalisiert.

## Einleitung

Das Protein M13 procoat (siehe Abb12) weist eine N-terminale Signalsequenz auf, die 23 Aminosäuren lang ist (Wickner, 1979). Sie besteht aus einem acht Aminosäuren langen hydrophilen Bereich, der durch drei Lysinreste (K) eine positive Ladung besitzt. Darauf folgt eine 15 Aminosäuren lange hydrophobe Region, die in der cytoplasmatischen Membran liegt und die Erkennungsstelle für die Leaderpeptidase enthält. Das mature Protein M13 coat besteht aus 50 Aminosäuren und kann in drei Abschnitte unterteilt werden. Aminoterminal ist eine 20 Aminosäuren lange hydrophile Region, die im Periplasma lokalisiert ist. Dieser periplasmatische Bereich besitzt durch vier negativ und einen positiv geladenen Aminosäurerest eine Nettoladung von minus drei. Daraufhin folgt ein 19 Aminosäuren langer, hydrophober Bereich, der dem Protein vorübergehend bis zur Assemblierung als Membrananker dient. Am Carboxyterminus befindet sich ein 11 Aminosäuren langer, durch vier Lysinreste positiv geladener Bereich.

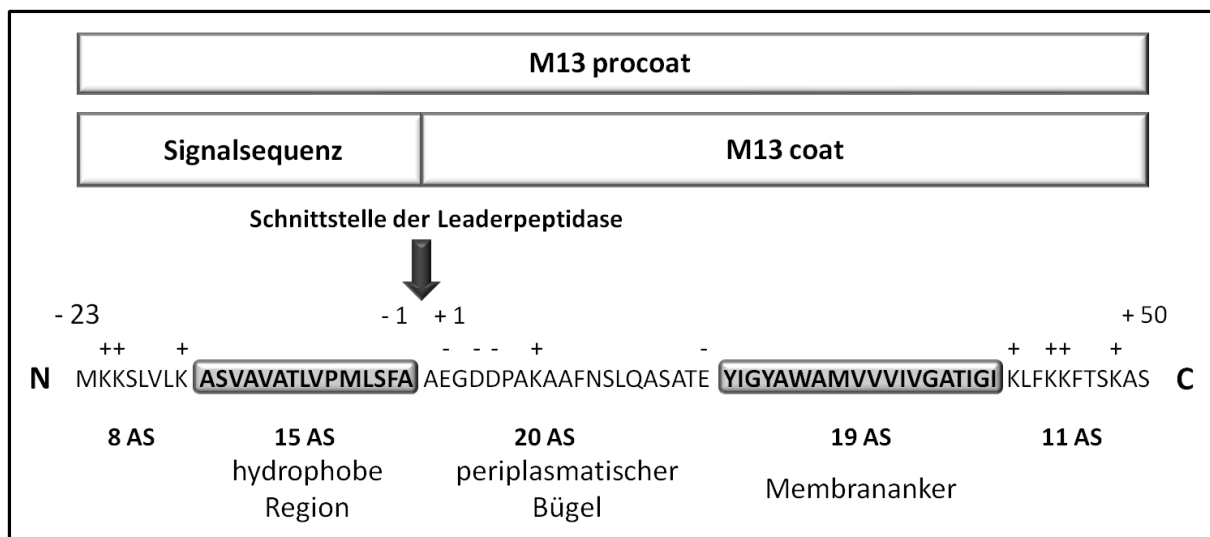


Abb12. Aminosäuresequenz des Phagenproteins M13 procoat (hydrophobe Bereiche sind hervorgehoben)

Rekonstitutionsstudien haben gezeigt, dass M13 procoat, wie auch Pf3 coat, SRP-unabhängig zu YidC gelangen (de Gier *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2003). Für die effiziente Integration von M13 procoat in die Cytoplasmamembran (siehe Abb13) wird die Membraninsertase YidC (Samuelson *et al.*, 2000) und das Membranpotential (Date *et al.*, 1980) benötigt. Die Sec-Translokase ist für diesen Vorgang nicht notwendig. Die positiv geladenen Aminosäuren der N- und C-Termini binden elektrostatisch an die auf der cytoplasmatischen Seite negativ geladenen Kopfgruppen der Phospholipide (Gallusser & Kuhn, 1990). Die hydrophoben Transmembranbereiche des Proteins können nun mit dem hydrophoben Kern der Cytoplasmamembran interagieren (Kuhn *et al.*, 1986a; Samuelson *et al.*, 2001) und unter Ausbildung von  $\alpha$ -helikalen Strukturen in die Membran inserieren (siehe Abb13 II). Diese  $\alpha$ -helikalen Strukturen werden auch als „helical hairpin“ bezeichnet und sind für den korrekten Einbau notwendig (Kiefer & Kuhn, 2007), für

## Einleitung

diesen Vorgang benötigt M13 procoat beide hydrophoben Domänen (Kuhn *et al.*, 1986b). Der negativ geladene Loop wird mithilfe des Membranpotentials (Date *et al.*, 1980) und YidC (Samuelson *et al.*, 2001) durch die Membran transloziert. Das Präprotein M13 procoat wird nach der Insertion in die Membran von der Leaderpeptidase (Lep) zum murenen Protein M13 coat prozessiert und steht für die Zusammensetzung der Phagenpartikel bereit (siehe Abb13 IV).

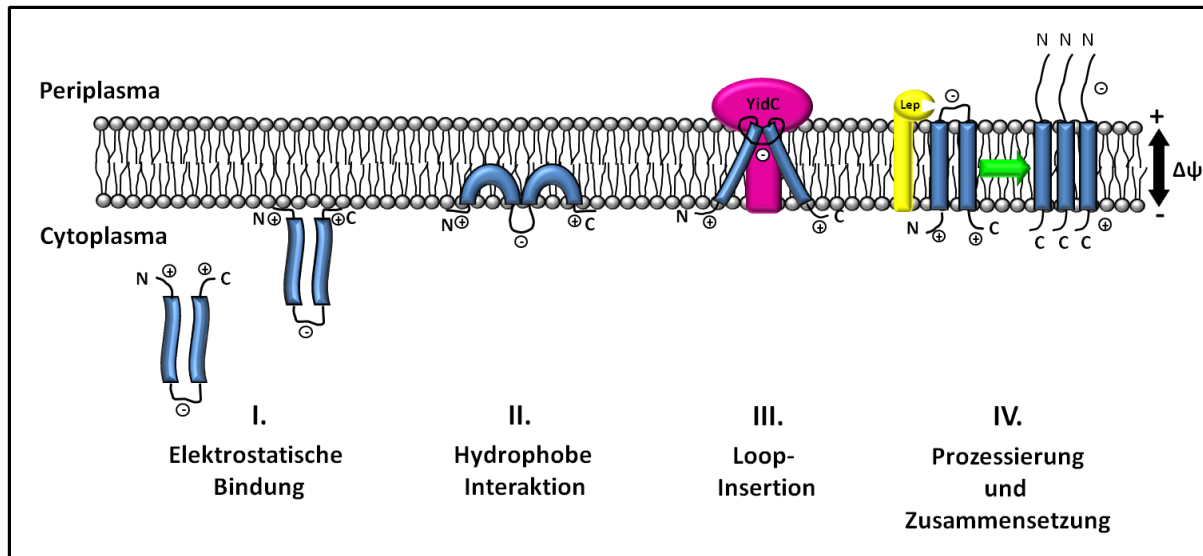


Abb13. Membraninsertion von M13 procoat (Kuhn *et al.*, 1990a, modifiziert)

Die negativen Ladungen im periplasmatischen Loop scheinen nur für den von der protonenmotorischen Kraft abhängigen Einbau notwendig zu sein. Es ermöglicht somit dem zu translozierenden Protein seine endgültige Konformation einzunehmen (Cao *et al.*, 1994). Allerdings scheinen diese negativen Aminosäuren nicht für den Einbau selbst erforderlich zu sein (Kuhn *et al.*, 1990). Auch wenn diese Ergebnisse zeigen, dass M13 procoat eine Tendenz zur elektrostatischen Interaktion zwischen positiven Ladungen und der Membranoberfläche aufweist, ist es noch ungeklärt, in wieweit diese membrangebundene Form ein wirklicher Zwischenschritt im „YidC-only“-Weg (siehe Abb9) darstellt. Möglicherweise bindet Procoat direkt an YidC. Die effiziente Verankerung von M13 procoat in der Membran erfordert eine 19 Aminosäuren lange transmembrane Region, die auch aus 3 Leucinen und 16 Alaninen bestehen kann (Xie *et al.*, 2007). Eine Zusammensetzung aus nur 19 Alaninen hingegen erlaubt nicht die Verankerung des Proteins in der Membran (Xie *et al.*, 2007).



## 1.8. proOmpA

Das Protein OmpA (**Q**uter **m**embrane **p**rotein **A**) ist 37 kDa groß und liegt in der äußeren Membran des Bakteriums *E. coli*. Es wird als 346 Aminosäuren langes Präprotein synthetisiert, wobei die Signalsequenz 21 Aminosäuren lang ist. Es besitzt acht  $\beta$ -Faltblattstrukturen, gefolgt von einem langen periplasmatischen Bereich C-terminal (Stathopoulos, 1996). Es ist das Hauptprotein der Außenmembran und fungiert auch als Rezeptor für Bakteriophagen (Morona *et al.*, 1984 und 1985). Es besitzt strukturelle Ähnlichkeit mit Porinen. Die Translokation von proOmpA (siehe Abb14) über die cytoplasmatische Membran von *E. coli* geschieht schrittweise (Economou & Wickner, 1994). Das Protein wird zunächst von SecB erkannt und zur SecA-ATPase an der Innenmembran geleitet. Ein Komplex aus SecA, proOmpA und SecYEG wird gebildet, welcher nach der Hydrolyse von ATP eine Konformationsänderung erfährt. Diese bewirkt die Bewegung einer 30 kDa großen SecA-Domäne, wodurch eine ca. 20 Aminosäuren lange Sequenz des proOmpA (Finger-Loop) mit in die Membran eingebracht wird. Die ATP-Hydrolyse ermöglicht nun die Freigabe des translozierten Präproteins und die Rückbewegung von SecA aus der Membran. Durch mehrmaliges Wiederholen der SecA-ATP-Bindung und Hydrolyse von ATP wird das proOmpA schrittweise transloziert. Vor Verlassen der Translokationspore wird das Präprotein von der Leaderpeptidase prozessiert und das mature OmpA ins Periplasma entlassen.

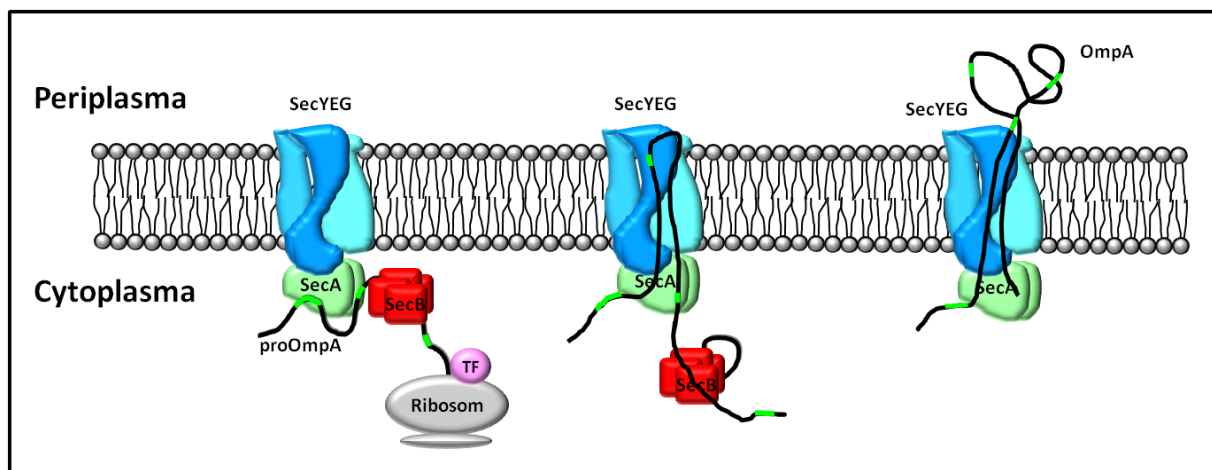


Abb14. Schematische Darstellung der Translokation von proOmpA (nach Facey & Kuhn, 2004, modifiziert)

## 2. Material

### 2.1. Geräte

#### **Äkta:**

pH/C-900, UV-900, P-900, Amersham Biosciences, San Francisco, CA, USA

#### **Autoklaven:**

H+P Varioklav® Dampfsterilisator 75S, H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, D

H+P Varioklav® Dampfsterilisator 135S, H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, D

Sanoclav, Adolf Wolf SANOclav, Bad Überkingen-Hausen, D

#### **Bilddokumentation:**

Digitales Aufnahmesystem, Digital Science™ Kodak Image Station 440 CF mit Software

1 D Version 3.5, Eastman Kodak Company, New York, NY, USA

Image Scanner, Amersham Biosciences Pharmacia Biotech, UK

Typhoon Trio Plus Scanner, Amersham Biosciences, Freiburg, D

#### **Blotkammer:**

semi-dry Blotkammer, Owl Separation Systems, Schleicher & Schuell, Dassel, D

semi-dry Transfer Cell, TRANS-BLOT® SD, Bio Rad Life Sciences, Richmond, CA, USA

TRANS-BLOT® CELL Naßblotkammer, Electrophoretic Transfer Cell, Bio Rad Life Sciences, USA

#### **Brutraumschüttler:**

Rundschüttler, Adolf Kühner AG, Basel, CH

#### **Brutschrank:**

Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, D

#### **Dünnschichtchromatographiekammer:**

Glaskammer, DESAGA, Heidelberg, D

mit TLC Platten aus Silicagel 60 F<sub>254</sub>, E. Merck, Darmstadt, D

Glaskapillaren aus Sodaklarglas, ø 1 mm, Länge 80 mm, Hilgenberg, Malsfeld, D

Whatmann 3 mm Chromatographiepapier, Whatman GmbH, Dassel, D

Material

**Eismaschine:**

Scotsman® AF20, Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, Illinois, USA

**Extruder:**

Mini Extruder Set bestehend aus Mini Extruder, 2 Spritzen (1 000 µl), 2 Dichtungen, Filter und Polycarbonatmembran mit 0,4 µm Porengröße, Avanti Polar-Lipids, Inc., Alabama, USA

**Feinwaage:**

Sartorius Competence CP 224 S, Sartorius Werke GmbH, Göttingen, D

**FPLC:**

Liquid Chromatography Controller LCC-500 mit Fraction Collector FRAC-100, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, S

**Fluorolog:**

Jobin Yvon HORIBA, HORIBA Jobin Yvon GmbH, Unterhaching, D

**Geltrockner:**

BioRad Gel Dryer Model 583, Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

**Gerät zur Bestimmung der Partikelgröße:**

Sub-Micron Particle Analyzer Model N4 SD, Coulter Electronics, Inc., Hialeah, Florida, USA

**Heizblock:**

Unitek HB-130, Miyachi Unitek, Monrovia, CA, USA

**Heißluftpistole:**

Braun, Kronberg, D

**Inkubationsschüttler:**

HAT Aquatron, Infors AG, Bottmingen, CH

IKA KS 126 basic, IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D

Polymax 1040, Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim, D

**Konfokales Mikroskop:**

Olympus IX71, Olympus, Hamburg, D

Detektionsphotodiode, Avalanche Photodiode, APD, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA

Dioden-Laser, Picoquant, PicoTA 490, Berlin, D

Wasserimmersions-Objektiv, UPlanSApo 60xW, 1.2 N.A., Olympus, Hamburg, D

## Material

Filter 532/70, AHF, Tübingen, D

Messkarte SPC150, Becker & Hickl GmbH, Berlin, D

### **Kühlschrank:**

Kühlaggregat, Kältetechnik U. Stürzenhofecker, Leinfelden-Echterdingen, D

### **Magnetrührer:**

Magnetrührer MR 2000, Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim, D

Magnetrührer IKAMAG Reo Drehzahl Electronic, IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D

### **Mikrowelle:**

Constructa-energy, Constructa-Neff-Vertriebs GmbH, München, D

### **Netzgerät:**

Bio Rad Power Pac 300, BioRad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA

Bio Rad Power Pac3000, BioRad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA

Biometra Standard Power Pack P25, Biometra Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, D

### **Peristaltische Pumpe:**

Pharmacia LKB Peristaltic Pump P1, Pharmacia, Uppsala, S

### **pH-Meter:**

Metrohm 620 pH-Meter, Metrohm, Herisau, CH

### **Photometer:**

Perkin-Elmer Inc., Lambda 15 UV/VIS Spectrophotometer, Waltham, MA, USA

Dr. Lange, Digital-Photometer LP2W, HACH LANGE GmbH, Düsseldorf, D

Novaspec II Plus visible spectrophotometer, GE Healthcare UK Ltd. Buckinghamshire, UK

CO8000 Cell Density Meter, WPA Biowave, Cambridge, UK

### **Quantifizierung:**

Digitales Aufnahmesystem, Digital Science™ Kodak Image Station 440 CF mit Software

1 D Version 3.5, Eastman Kodak Company, New York, New York, USA

Programm Image Quant, Kodak 1.4 für Digital Science™ Kodak Image Station 440 CF

### **SDS-PAGE:**

Elektrophoresekammer für Minigele, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D

## Material

Laufkammer Model E 5889, Sigma Chemical Co., St.Louis, Montana, USA

Mini Preotean® Tetra System, Bio Rad Life Sciences, Richmond, CA, USA

### **Sequenziergerät:**

DNA Sequencer, Long ReadIR 4200 mit e-Seq 2.0 DNA-Sequencing und Analysis Software, LI-COR Corporate, Lincoln, NE USA

### **Spectrofluorometer:**

FP-750 Spectrofluorometer, Jasco, Tokyo, J

### **Sterilisation:**

gebrauchsfertige Filtereinheit, Filtration Life Science Diagnostic Components, Schleicher & Schuell, Dassel, D

### **Sterilbank:**

Sterilbank, BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen, D

### **Thermocycler:**

T3 Thermocycler und TGradient, Biometra bio-medizinische Analytik

### **Thermoschüttler:**

Thermomixer 5436, Eppendorf AG, Hamburg, D

### **Thermoschüttelbad:**

HAT Infors AG, Bottmingen, CH

### **Tiefkühlschrank:**

Öko Super, Liebherr, D

Linde AG, München, D

### **Tiefkühltruhe:**

-85°C Ultra Low Freezer, C54285, New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, New Jersey, USA

### **Ultrafiltration:**

Centricon : Zentrifugen-Röhrchen, Centrifugal Devices, Pall Life Sciences Sigma 3 MK

### **Ultraschallbad:**

Sonorex Super RK 103H, Bandelin Electronic GmbH, Berlin, D

Material

**Vacuumkonzentration:**

SpeedVac Concentrator, Savant Instruments Inc. Model RH40-11 mit Refrigerated Condensation Trap (Kühlfalle) und High Vacuum Pump, Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen, D

Rotationsverdampfer Rotavapor-R, Büchi AG, Flawil, CH

**Vacuumpumpe:**

Edwards 5 Two Stage, GEC Machines LTD., Staff, UK

**Vortexer:**

Vortex genie 2, Scientific Industries, bender & Hobein AG, Zürich, CH

**Waagen:**

Sartorius 1264 MP 2444, Sartorius Werke GmbH, Göttingen, D

Sartorius Basic BA 2100 S, Sartorius Werke GmbH, Göttingen, D

Sartorius Basic BA 3100 P, Sartorius Werke GmbH, Göttingen, D

Sartorius MC1 LC 820, Sartorius Werke GmbH, Göttingen, D

Sartorius Competence CP 224 S, Sartorius Werke GmbH, Göttingen, D

**Wärmeschränke:**

Heraeus Electronic, Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, D

Heraeus Instruments, Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, D

Memmert Thermoschrank, Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, D

**Wasseraufbereitungsanlage:**

Milli-Q® Water Purification System, Q-Garde® 2, Millipore GmbH, Eschborn, D

**Zellaufschluss:**

French Pressure Cell Press, American Instrument Company, Inc., Silver, Spring, Maryland, USA

zugehörige Zelle: SLMO Amicon® French® Pressure Cell

Ultraschalldesintegrator Branson Sonifier 450, Branson Inc., Danbury, USA und Kryomat

KS 01, MHW, Lauda, D

**Zentrifugen:**

**-Tischzentrifuge:**

Hermle Z 200 M/H, HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen, D

## Material

Hermle Z 233 MK, HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen, D

### -Kühlzentrifuge:

Hermle ZK 630 Processor, HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen, D

### -Ultrazentrifuge:

Beckman Optima™ LE-80K, Beckman Instruments GmbH, Fullerton, CA, USA

→ Rotoren : 50Ti, 60Ti, SW28

Beckman TL-100 Ultracentrifuge, Beckman Instruments GmbH, Fullerton, CA, USA

→ Rotoren : TLA 120.2

### -Kühlzentrifuge:

Model J2-21, Beckman Instruments GmbH, USA

→ Rotoren: JA10, JA14, JA20, JA21

Avanti™ J25 High Performance Centrifuge, Beckman Coulter, Inc. Fullerton, California, USA

→ Rotoren: JLA25.50, JLA10.500, JLA16.250

### -Airfuge:

Air-Driven-Ultracentrifuge, Beckman Instruments GmbH, USA

→ Rotor : A 100/18

## 2.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

### A

Aceton	Carl Roth KG, Karlsruhe, D
Acrylamid, Long Ranger	FMC BioProducts, Rockland, ME, USA
Adenosin-5'-triphosphat (ATP), Na <sub>2</sub> -Salz	E. Merck, Darmstadt, D
Agar	GERBU Biotechnik GmbH, Gaiberg, D
Agarose Ultrapure	USB, United States Biochemical Corporation, Cleveland, OH, USA
Aktivkohle	1,5 mm reinst Lebensmittelqualität, Merck, Darmstadt, D
Åkta-Säule (Ø 1,5 cm)	Amicon, Schorndorf, D

## Material

Alamethicin (aus <i>Trichoderma viride</i> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Ammoniummolybdän Tetrahydrat	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	E. Merck, Darmstadt, D
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
L(+)-Arabinose	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, D
L(-)Ascorbinsäure	E. Merck, Darmstadt, D
Atto520-maleimide (powder)	ATTO-TEC GmbH, Siegen, D
<b>B</b>	
Bactotrypton	Oxoid, Besingstoke, Hamshire, UK
BCA-Farbreagenz-Kit	BCA™ Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Benzonase® Nuclease	Novagen, WI, USA
Bio Beads	Bio Beads® SM-2 Adsorbent, Bio Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Bisacrylamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Borsäure	E. Merck, Darmstadt, D
Bradford-Reagenz	Bio Rad Laboratories, Richmond, CA, USA
Bromphenolblau	Bio Rad Laboratories, CA, USA
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
BugBaster® Master Mix	Novagen, WI, USA
<b>C</b>	
Caesiumchlorid, CsCl	USB, United States Biochemical Corporation, Cleveland, OH, USA
Calciumchlorid, CaCl <sub>2</sub> Dihydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Carbonatdehydrogenase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
4-Chlor-1-naphthol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
<b>D</b>	
2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat (dNTP)	USB, United States Biochemical Corporation,



## Material

	Cleveland, OH, USA
Diacylglycerol (DAG)	Lipid Products, Redhill, Surrey, UK
Dialyseschlauch	Spectra/Por® Membrane MWCO 1-30 kDa, SPECTRUM®, Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA, USA
Dichlormethan	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, D
Di-2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat (ddNTP)	USB, United States Biochemical Corporation, Cleveland, OH, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	E. Merck, Darmstadt, D
Dikaliumhydrogenphosphat, $K_2HPO_4$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Dinatriumhydrogencarbonat, $Na_2HCO_3$	E. Merck, Darmstadt, D
Dinatriumhydrogenphosphat, $Na_2HPO_4$	J. T. Baker, Deventer, NI
1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin (DOPC)	Avanti Polar Lipids, Inc., Alabama, USA
1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidyl- ethanolamin (DOPE)	Avanti Polar Lipids, Inc., Alabama, USA
1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-[phospho- <i>rac</i> - (1-glycerol)] (DOPG)	Avanti Polar Lipids, Inc., Alabama, USA
1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycerol	Avanti Polar Lipids, Inc., Alabama, USA
1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Dithiotreitol, DTT	GERBU Biotechnik GmbH, Gaiberg, D
DNaseII	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid (DDM) 99,7% HPLC	GERBU Biotechnik GmbH, Gaiberg, D
Dodecylphosphocholin (Fos-cholin12 )	Anatrace Inc., Maumee, OH, USA
D-Tube™ Dialyzer Maxi	MWCO 3,5 kDa, Novagen, Madison, WI, USA
<b>E</b>	
ECL™ Western Blotting Detection Reagents and Analysis System	Amersham, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK

## Material

<i>E. coli</i> Polar Lipid Extract	Avanti Polar Lipids, Inc., Alabama, USA
<i>E. coli</i> Total Lipid Extract	Avanti Polar Lipids, Inc., Alabama, USA
Entwickler (ECL)	Entwickler, Eukobrom TETENAL AG & Co. KG, Norderstedt, D
Eisessig	E. Merck, Darmstadt, D
Eppendorfgefäße	Mikroröhre 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, Sarstedt, Nümbrecht, D
Eppendorfgefäße mit Schraubdeckel	Mikroröhre 1,5 ml mit Verschluss, Sarstedt, Nümbrecht, D
Essigsäure, 100%	Eisessig E. Merck, Darmstadt, D
Ethanol	E. Merck, Darmstadt, D
Ethidiumbromid	E. Merck, Darmstadt, D
Ethylendiamintetraessigsäure(EDTA)	USB Corporation, Cleveland, OH; USA
<b>F</b>	
Ficoll (Typ 400)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Film	Valmex Blue sensitive X-Ray VA 711B, valmex photographische Produkte, Augsburg, D
Filterpapier (1 mm und 3 mm)	Whatman GB 004 Gel Blotting paper GmbH, Schleicher & Schuell, Dassel D
Fixierer (ECL)	Superfix Plus, Eukobrom TETENAL AG & Co. KG, Norderstedt, D
Formaldehyd 36,5%	Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH
Fos-cholin12	Anatrace Inc., Maumee, OH, USA
<b>G</b>	
Gelfiltrationssäule	High Resolution Column HR 10/30, Pharmacia, Uppsala, S
Glaskammer für DC	DESAGA, Heidelberg, D
Glaskapillaren für DC (ø 1mm)	Hilgenberg, Malsfeld, D
Glasmurmeln	Spielwarenkurz, Stuttgart, D
Glasperlen (5 mm)	Baack Laborbedarf, Bedarf und Technik für Labor und Medizin, Schwerin, Deutschland

## Material

Glaswaren	Schott AG, Jena, D
Glutaraldehyd 25%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
D(+)-Glucose	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
Glycerin wasserfrei	Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH
Glycin	USB, United States Biochemical Corporation, Cleveland, OH, USA
Glysantin (Frostschutzmittel)	BASF, Ludwigshafen, D
Guanidiniumhydrochlorid	Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH
<b>H</b>	
Harnstoff, Licor-Qualität	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Hefeextrakt	Oxoid LTD., Basingstone, Hampshire, UK
Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure (HEPES )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
<b>I</b>	
Imidazol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Iod, elementar	E. Merck, Darmstadt, D
Isopropanol	Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH
Isopropyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (IPTG)	Gerbu Biotechnik GmbH, Gaiberg, D
<b>K</b>	
Kaliumacetat, $\text{CH}_3\text{COOK}$	E. Merck, Darmstadt, D
Kaliumchlorid, KCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Kaliumhydroxid	E. Merck, Darmstadt, D
Kaliumiodid, KI	E. Merck, Darmstadt, D
Kaliumsulfat, $\text{K}_2\text{SO}_4$	E. Merck, Darmstadt, D
Kaliumdihydrogenphosphat, $\text{KH}_2\text{PO}_4$	Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH
Kochtopf (5 l)	Silit, Riedlingen, D
Kupfer-II-sulfat 5 $\text{H}_2\text{O}$	Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH
<b>L</b>	
n-Lauroylsarcosin, $\text{Na}_2$ -Salz	USB, United States Biochemical Corporation,

## Material

	Cleveland, OH, USA
Long Ranger™ Gel Lösung	FMC BioProducts, Rockland, ME, USA
Luminol	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Lysozym	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
<b>M</b>	
Magermilchpulver	Heirler Cenovis GmbH, Radolfzell, D
Magnesiumchlorid, MgCl <sub>2</sub> 6 H <sub>2</sub> O	E. Merck, Darmstadt, D
Mangan(II)-chlorid, MnCl <sub>2</sub> 4 H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Magnesiumnitrat, MgNO <sub>3</sub>	E. Merck, Darmstadt, D
Membran für Wester-Blot	Hybond ECL Nitrocellulose Membrane, Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK
Membran für Extruder	Nucleopore Polycarbonatmembran (0,4 µm), Schleicher & Schuell, Dassel, D
Methanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, D
Mini-Prep-Kit	Peq-Lab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit, Zymo Research, Freiburg, D
Minisäule	BD Plastipak™, 5 ml-Spritze, Becton Dickinson, Heidelberg, D
Monomerlösung (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, D
Morpholinopropansulfonsäure, MOPS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
<b>N</b>	
Natriumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Natriumchlorid, NaCl	USB Corporation, Cleveland, OH, USA
Natriumdihydrogenphosphat, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	E. Merck, Darmstadt, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Natriumhydroxid	E. Merck, Darmstadt, D
Natriumhydrogencarbonat	E. Merck, Darmstadt, D
Natriumsulfat, Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Riedel-de Haën, Seelze, D

## Material

Natriumthiosulfat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, D
Nickel-II-sulfat 6 H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Ninhydrin	E. Merck, Darmstadt, D
Nukleotidmix, 4dNTP	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
<b>O</b>	
Oxonol VI	Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH
n-Octyl-β-D-glucopyranosid	Appli Chem, VLM GmbH, Leopoldshöhe, D
<b>P</b>	
Phenylmethansulfonsäurefluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Protease Inhibitor Cocktail Set III	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
Polyethylenglycol 4000	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
Ponceau S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Primer	Biomers, The Biopolymer Factory, Ulm, D
Proteinase K	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Proteinstandard	Mark12™ Unstained Standard, Invitrogen Corporation, Darmstadt, D
	Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas Life Sciences, GmbH, St. Leon-Rot, D
	Page Ruler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas Life Sciences GmbH, St. Leon-Rot, D
	Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder, Fermentas Life Sciences GmbH, St. Leon-Rot, D
	Precision Plus Protein™ Standards All Blue, Bio Rad Life Sciences, Richmond, CA, USA
	Polypeptide SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Bio Rad Life Sciences, Richmond, CA, USA
<b>R</b>	
Rubidiumchlorid, RbCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D

## Material

### S

Saccharose	E. Merck, Darmstadt, D
Salzsäure rauchend, HCl konz.	E. Merck, Darmstadt, D
Säulenmaterial	Ni-NTA-Agarose: Ni-NTA-Superflow, Bindungs- kapazität 50 mg/ml, 6% Agarose, 50% Suspension in 30% EtOH, Ni <sup>2+</sup> -beladen, max. Druck 140 psi, Qiagen, Hilden, D  Ni-Sepharose™ 6 Fast Flow, Bindungskapazität 40 mg/ml, 6% Agarose, 50% Suspension in 20% EtOH Ni <sup>2+</sup> -beladen, max. Druck 0,3 MPa, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK  Sephadex200, Amicon, Schorndorf, D  Sephadex G25, Amersham, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Schwefelsäure, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	E. Merck, Darmstadt, D
Silbernitrat	E. Merck, Darmstadt, D
Sodium-N-Lauroylsarcosine	USB, United States Biochemical Corporation, Cleveland, OH, USA
Spritzen	BD Plastipak™, 5 ml, Becton Dickinson, Heidelberg, D  Omnifix®-F, 1 ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Spritzenfilter	Fisherbrand, ø 25 mm Syringe Filter 0,22 µm, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
Stickstoffgas 4.6 (99.996 Vol. %)	SWF, Friedrichshafen, D
<b>T</b>	
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Thermo Sequenase™ Cycle Sequencing Kit	USB, Biochemical Corporation, Cleveland, OH, USA
Transfermembran	PROTRAN® Nitrocellulose Transfer Membrane, Whatman GmbH, Dassel, D
Trichloressigsäure, TCA	E. Merck, Darmstadt, D
TCEP (T-2556)	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
TLC Platten aus Silicagel 60 F <sub>254</sub> für DC	Kieselgelplatten, E. Merck, Darmstadt, D

## Material

Tricin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan, Tris	USB, United States Biochemical Corporation, Cleveland, OH, USA
TritonX-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Trypsin (from bovine pancrease)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Trypsin Inhibitor (from soy bean)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Trypton	Oxoid LTD., Basingstone, Hampshire, UK
<b>U</b>	
Urea	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
<b>V</b>	
Valinomycin (Cyclo(L-Val-D-Hylva-D-Val-L-Lac-) <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
<b>W</b>	
Wasserstoffperoxid	Carl Roth KG, Karlsruhe, D

## 2.3. Plasmide

### pET-16b

Der Plasmidvektor pET-16b (siehe Abb15) codiert für einen 10-fachen Histidin-tag, auf den eine Factor Xa site und drei cloning sites folgen. Er besitzt einen T7-Promotor. In dieses Plasmid wurde das *yidC*-Gen in die multiple cloning site zwischen die Schnittstellen Nde I und BamH I kloniert.

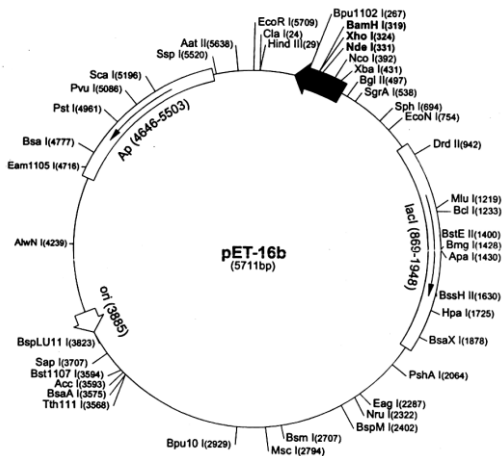


Abb15. Plasmidvektor pET-16b (Novagen)

## Material

**pET-16b IM60 N-His<sub>10</sub>** (YidC) Referenz: A. Kuhn

*E. coli* YidC mit N-terminaler Hexahistidiny-Modifikation

## pJQ

Der Plasmidvektor pJQ enthielt einen 6-fachen His-tag

**pJQ H5 C-His<sub>6</sub>** (M13 procoat H5) Referenz: T. Roos

*E. coli* M13 procoat, Austausch Ser3 gegen Phe in der M13 procoat-Sequenz (Kuhn et al., 1990b), C-terminale Hexahistidiny-Modifikation

**pJQ H5M13C C-His<sub>6</sub>** (Procoat H5-M13C) Referenz: A. Kuhn

*E. coli* M13 procoat, Austausch Ser3 gegen Phe in der M13 procoat-Sequenz, Austausch von Ser13 in Cys, C-terminale Hexahistidiny-Modifikation

**pJQ H5EE C-His<sub>6</sub>** (M13 procoat H5EE) Referenz: A. Kuhn

*E. coli* M13 procoat, Austausch Ser3 gegen Phe, zwei Aspartate an Pos2 (Cao et al., 1995), C-terminale Hexahistidiny-Modifikation

**pJQ H5EEM13C C-His<sub>6</sub>** (Procoat H5EE-M13C) Referenz: A. Kuhn

*E. coli* M13 procoat, Austausch Ser3 gegen Phe in der M13 procoat-Sequenz, zwei Aspartate an Pos2, Austausch von Ser13 in Cys, C-terminale Hexahistidiny-Modifikation

**pJQ H5 AQGNN C-His<sub>6</sub>** (M13 procoat H5-OPC) Referenz: A. Kuhn

*E. coli* M13 procoat, Austausch Ser3 gegen Phe, Austausch von Glu2 gegen Gln, Austausch von Asp4 und Asp5 gegen Asn, C-terminale Hexahistidiny-Modifikation



## Material

### **pET22**

N-terminale *pelB* Signalsequenz, C-terminaler His-tag, reversierte T7 Expressionsregion

**pET22 H5-OmpA C-His<sub>6</sub>** (pro828coat) Referenz: T. Roos

*E. coli* M13 procoat, Austausch Ser3 gegen Phe, Insertion von 174 Aminosäuren der kompletten OmpA-Sequenz +67 bis +240 nach der M13 procoat-Signalsequenz (Kuhn, 1988), C-terminale Hexahistidinyl-Modifikation

### **pQN8**

pIng-1 mit *SmaI*-Fragment, welches das *M13-Gen 8* enthält (Kuhn & Wickner, 1985b) unter der Kontrolle des Ara BAD-Promotors

**pQN Δ80 C-His<sub>6</sub>** (pro80coat) Referenz: T. Roos

*E. coli* M13 procoat, Austausch Ser3 gegen Phe, Insertion von 80 Aminosäuren der teilweisen OmpA-Sequenz 67 bis 240 (+67 bis +76, +171 bis +240) nach der M13 procoat-Signalsequenz, C-terminale Hexahistidinyl-Modifikation

**pMS H5-Lep C-His<sub>6</sub>** (PClep) Referenz: T. Roos

*E. coli* M13 procoat, Austausch Ser3 gegen Phe, Insertion von 103 Aminosäuren der Lep-Sequenz 221 – 323 nach dem C-Terminus von M13 procoat, C-terminale Hexahistidinyl-Modifikation

**pHis-EYG** (SecYEG) Referenz: W. Kühlbrandt

Max-Planck-Institut Physik

Die Proteine SecYEG waren unter der Kontrolle des *araBad*-Promotors, eine Hexahistidinyl-Modifikation befindet sich am Protein SecE (Collinson *et al.*, 2001)

### **pZH52**

Dieser Plasmidvektor enthält das Gen für wildtypisches SecA

## Material

### **pZ52 SecA N-His<sub>6</sub>**

(SecA)

Referenz: T.Roos

*E. coli* SecA in pET5 unter T7-Promotor (Schmidt et al., 1988), N-terminale Hexahistidinyl-Modifikation (Karamanou et al., 1999)

### **pTYE009-proOmpA-C-His<sub>6</sub>**

(proOmpA)

Referenz: Yoshihisa & Ito

ProOmpA His<sub>6</sub> Myc, proOmpA mit C-terminalem c-Myc und His-tag unter der Kontrolle des Lac-Promotors (Yoshihisa & Ito, 1996)

## **2.4. Bakterienstämme**

### ***Escherichia coli* BL21(DE3)** (Studier & Moffatt, 1986)

Institutsbestand

*hsdS gal* ( $\lambda$ c Its857 *ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1*)

In diesem Stamm befindet sich die RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 auf dem Bakteriophagen  $\lambda$  DE3, welcher in das Chromosom von BL21 integriert ist. Dieser Stamm wurde für die starke Expression von Genen verwendet, die in Expressionsvektoren kloniert wurden, die einen T7-Promotor enthalten (Sambrook, 1989). Die Expression ist durch IPTG induzierbar.

### ***Escherichia coli* C41 (DE3)** (Miroux & Walker, 1996)

Institutsbestand

Spontanmutation von *E. coli* BL21 (DE3). Der Genotyp ist nicht näher bestimmt worden.

### ***Escherichia coli* C43 (DE3)** (Miroux & Walker, 1996)

Institutsbestand

*E. coli* F- *ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm* (DE3)

Dieser Bakterienstamm wurde aus *E. coli* BL 21 (DE3) gewonnen. Dieser Stamm hat mindestens eine nicht charakterisierte Mutation, die den Zelltod verhindert, der durch die Expression von toxischen rekombinanten Proteinen verbunden wäre. Dieser Stamm wurde des Weiteren aus dem Stamm C41 (DE3) gewonnen, in den das Gen für eine F-ATPase-Untereinheit transformiert wurde. Die Transformation wurde rückgängig gemacht, so dass der Stamm kein Plasmid mehr trägt. C43 besitzt, wie der Elternstamm BL21, das Lambda DE3 Lysogen, das die Bakteriophagen T7 RNA-Polymerase exprimiert, die unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors steht. Er wurde

## Material

für die Expression von Genen verwendet, die in Expressionsvektoren mit dem Bakteriophagen T7 Promotor kloniert wurden (Sambrook *et al.*, 1989).

***Escherichia coli* HB101** (Bolivar *et al.*, 1977; Boyer & Roulland-Dussoix, 1969) Institutsbestand

*supE44 hsdS20(r<sub>B</sub>m<sub>B</sub>) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1*

DMS 1607 (Catalog of strains 1993)

Bei diesem Stamm handelt es sich um einen gut transformierbaren *E. coli* K12 x *E. coli* B Hybrid.

***Escherichia coli* MRE600** (Salaj-Šmic, 1978)

Institutsbestand

Dieser *E. coli*-Stamm besitzt keine Ribonuklease I und kann das Colicin E1 und Spuren anderer Colicine produzieren.

***Escherichia coli* XL1-Blue** (Bullock, 1987)

Amersham

*supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46thi relA1 lac'F' [proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZΔM15 Tn10(tet<sup>r</sup>)]*

Hierbei handelt es sich um einen rekombinationsdefizienten *E. coli*-Stamm, der das Wachstum von amber-Mutanten unterstützt. Die durch Transfektion eingebrachte DNA wurde modifiziert, jedoch nicht geschnitten.

## 2.5. Antikörper

### 2.5.1. Primäre Antikörper

#### a) Primäre Antikörper spezifisch gegen YidC gerichtet:

gegen den C-Terminus von YidC gerichtet:

polyklonal, isoliert aus Kaninchen, Arbeitskonzentration 1:10 000 in 1 x TBS, Institutsbestand

Der polyklonale C-Antikörper wurde mithilfe des synthetischen Peptids (CLEKRGLHSREKKK) generiert.

## Material

gegen den periplasmatischen Loop von YidC gerichtet:

polyklonal, isoliert aus Kaninchen, Arbeitskonzentration 1:5 000 in 1 x TBS, Institutsbestand

Der polyklonale P1-Antikörper wurde mithilfe des synthetischen Peptids (DEKYEKYKTIADNEC) generiert.

### **b) Primärer Antikörper spezifisch gegen M13 procoat gerichtet:**

gegen das Protein M13 procoat des Bakteriophagens M13 gerichtet: AI, AII, AIII, RZ

Das Epitop befindet sich in der Loop-Region im Bereich der Aminosäurereste +1 bis +15 (Rohrer & Kuhn, 1990), polyklonal, isoliert aus Kaninchen, Arbeitskonzentration 1:2 500 in 1 x TBS, Institutsbestand

### **c) Primärer Antikörper spezifisch gegen SecA gerichtet:**

Polyklonal, Arbeitskonzentration 1:10 000 in 1 x TBS, Institutsbestand

### **d) Primärer Antikörper spezifisch gegen SecY gerichtet:**

Polyklonal, Arbeitskonzentration 1:2 500 in 1 x TBS, Institutsbestand

### **e) Primärer Antikörper spezifisch gegen SecE gerichtet:**

Polyklonal, Arbeitskonzentration 1:10 000 in 1 x TBS, Institutsbestand

### **f) Primärer Antikörper spezifisch gegen proOmpA gerichtet:**

Das Epitop befindet sich vermutlich in der maturen OmpA-Aminosäuresequenz, polyklonal, Arbeitskonzentration 1:10 000 in 1 x TBS, Institutsbestand

### **g) Primärer Antikörper gegen His-tag gerichtet:**

gegen den klonierten His-tag gerichtet:

monoklonal, isoliert aus Maus, Arbeitskonzentration 1:5 000 in 1 x TBS, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK

## 2.5.2. Sekundäre Antikörper

### a) Sekundärer Antikörper gegen die primären Antikörper aus Kaninchen gerichtet:

Anti rabbit IgG whole molecule peroxidase conjugate (konjugiert mit Peroxidase), monoklonal, isoliert aus Ziege, Arbeitskonzentration 1:10 000 – 1:20 000 in 1 x TBS, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D

### b) Sekundärer Antikörper gegen den primären Antikörper aus Maus gerichtet:

Anti mouse IgG whole molecule horseradish peroxidase conjugate (konjugiert mit Meerrettichperoxidase), monoklonal, isoliert aus Schaf, Arbeitskonzentration 1:5 000 in 1 x TBS, Amersham, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK

## 2.6. Proteinstandards

### a) Mark12™ Unstained Standard; Invitrogen Corporation, Darmstadt, D

Mark12™ Unstained Standard	Protein
200 kDa	Myosin
116,3 kDa	β-Galactosidase
97,4 kDa	Phosphorylase B
66,3 kDa	BSA
55,4 kDa	Glutamic dehydrogenase
36,5 kDa	Lactate dehydrogenase
31 kDa	Carbonic anhydrase
21,5 kDa	Trypsin inhibitor
14,4 kDa	Lysozyme
6 kDa	Aprotinin
3,5 kDa	Insulin B chain
2,5 kDa	Insulin A chain

Tab1. Mark12™ Unstained Standard

Material

**b) Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder, Page Ruler™ Prestained Protein Ladder, Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder;** Fermentas Life Sciences GmbH, St. Leon-Rot, D

<b>Page Ruler™ Plus Prestained</b>	<b>Page Ruler™ Prestained</b>	<b>Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder</b>
250 kDa	170 kDa	<b>40</b> kDa
130 kDa	130 kDa	25 kDa
95 kDa	95 kDa	15 kDa
<b>72</b> kDa	<b>72</b> kDa	<b>10</b> kDa
55 kDa	55 kDa	4,6 kDa
36 kDa	43 kDa	1,7 kDa
<b>28</b> kDa	34 kDa	
17 kDa	26 kDa	
<b>11</b> kDa	17 kDa	
	<b>10</b> kDa	

**Tab2. Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder (links), Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (Mitte), Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder (rechts)**

**c) Precision Plus Protein™ Standards All Blue, Polypeptide SDS-PAGE Molecular Weight Standards;** Bio Rad Life Sciences, Richmond, CA, USA

<b>Precision Plus Protein™ Standards</b>	<b>Polypeptide Molecular Weight Standards</b>	<b>Protein</b>
250 kDa	26,6 kDa	Triosephosphat isomerase
150 kDa	16,9 kDa	Myoglobin
100 kDa	14,4 kDa	A-Lactalbumin
75 kDa	6,5 kDa	Aprotinin
50 kDa	3,5 kDa	Insulin B chain, oxidized
37 kDa	1,4 kDa	Bacitracin
25 kDa		
20 kDa		
15 kDa		
10 kDa		

**Tab3. Precision Plus Protein™ Standards All Blue (links), Polypeptide SDS-PAGE Molecular Weight Standards (rechts)**



## Material

### a) für kleine SDS-Gele (Minigele)

Trennbereich: 10% für Proteine von 80 kDa bis 150 kDa

12% für Proteine von 40 kDa bis 80kDa

15% für Proteine von 15 kDa bis 40 kDa

SDS-Laufpuffer	27 mM Tris 192 mM Glycin 0,05% (w/v) SDS
Trenngel (10%)	für 30 ml Gelgießkammer 10 ml Monomerlösung 5,62 ml 2 M Tris/HCl pH 8.8 14,1 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> 120 µl 25% (w/v) SDS + 150 µl 10% (w/v) APS + 10 µl TEMED
Trenngel (12%)	für 30 ml Gelgießkammer 12 ml Monomerlösung 5,62 ml 2 M Tris/HCl pH 8.8 12,1 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> 120 µl 25% (w/v) SDS + 150 µl 10% (w/v) APS + 10 µl TEMED
Trenngel (15%)	für 30 ml Gelgießkammer 15 ml Monomerlösung 5,62 ml 2 M Tris/HCl pH 8.8 9,1 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> 120 µl 25% (w/v) SDS + 150 µl 10% (w/v) APS + 10 µl TEMED



## Material

Sammelgel (3%) für 30 ml Gelgießkammer  
2,66 ml Monomerlösung  
2,5 ml 1 M Tris/HCl pH 6.8  
14,6 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>  
80 µl 25% (w/v) SDS  
+ 100 µl 10% (w/v) APS  
+ 10 µl TEMED

### **b) für kleine Tricin-SDS-Gele (Minigele)**

Trennbereich: für Peptide von 1 kDa bis 10 kDa (nach Schägger)

Kathodenpuffer 100 mM Tris/HCl pH 8.25  
100 mM Tricin  
0,1% (w/v) SDS

Anodenpuffer 200 mM Tris/HCl pH 8.9

Gelpuffer 3 M Tris/HCl pH 8.45  
0,3% (w/v) SDS

Trenngel (15%) für 30 ml Gelgießkammer  
15 ml Monomerlösung  
10 ml Gelpuffer  
4 g Glycerin  
1 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>  
+ 100 µl 10% (w/v) APS  
+ 10 µl TEMED

Spacer-Gel (3%) für 30 ml Gelgießkammer  
3,3 ml Monomerlösung  
4 ml Gelpuffer  
4,8 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>  
+ 40 µl 10% (w/v) APS

## Material

	+ 10 µl TEMED
Sammelgel (1%)	für 30 ml Gelgießkammer
	1,1 ml Monomerlösung
	2,5 ml Gelpuffer
	6,5 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
	+ 100 µl 10% (w/v) APS
	+ 10 µl TEMED

### Western-Blotting (Semi-dry und Nassblot)

Transferpuffer (semi-dry)	50 mM Tris
	200 mM Glycin
	5% (v/v) MeOH
Transferpuffer (Nassblot)	25 mM Tris
	192 mM Glycin
	0,01% (w/v) SDS
	20% (v/v) MeOH
Ponceau S-Lösung	0,2% (w/v) Ponceau S-Farbstoff
	5% (v/v) HAc
1 x TBS	20 mM Tris/HCl pH 7.4
	150 mM NaCl
	2,7 mM KCl

### Entfernung eines Antikörpers von einer Nitrocellulosemembran (Stripping)

Stripping-Puffer	200 mM Glycin
	500 mM NaCl
	pH 2.8

## Material

### Coomassie-Färbung

Färbelösung	0,1% (w/v) Coomassie-Brilliant-Blau R250 40% (v/v) MeOH 10% (v/v) HAc
Entfärbelösung	20% (v/v) MeOH 7% (v/v) HAc

### Silberfärbung (pro zu färbendes Gel je 50 ml der Lösungen verwenden)

Fixierlösung	40% (v/v) EtOH (200 ml) 10% (v/v) HAc (50 ml) <i>ad</i> 500 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Sensitivierungslösung	30% (v/v) EtOH (15 ml) 0,125% (v/v) Glutaraldehyd (62,5 µl) 0,2% (w/v) Natriumthiosulfat (0,1 g) 6,8% (w/v) Natriumacetat (3,4 g) <i>ad</i> 50 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> ; immer frisch herstellen
Silberlösung	0,25% (w/v) Silbernitrat (1,25 g) <i>ad</i> 500 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> zu 50 ml wurden vor Gebrauch 20,5 µl 37% (w/v) Formaldehyd gegeben
Entwicklerlösung	2,5% (w/v) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (12,5 g) <i>ad</i> 500 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> zu 50 ml wurden vor Gebrauch 10,5 µl 37% (w/v) Formaldehyd gegeben
Stopplösung	1,46% (w/v) Na <sub>2</sub> -EDTA (7,3 g) <i>ad</i> 500 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Konservierungslösung	30% (v/v) EtOH (150 ml) 4% (v/v) Glycerin (20 ml) <i>ad</i> 500 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>

## Material

### Kompetente Zellen, Sequenzierung, Transformation, Übernachtskultur, Proteinexpression

TFB1 Puffer	100 mM RbCl 50 mM MnCl <sub>2</sub> 30 mM Kaliumacetat 10 mM CaCl <sub>2</sub> 15% (w/v) Glycerin pH 5.8
TFB2 Puffer	10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM CaCl <sub>2</sub> 15% (w/v) Glycerin pH 8.0
LB-Medium	1% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) NaCl 0,5% (w/v) Hefeextrakt
2xYT-Medium	1,6% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) NaCl 1% (w/v) Hefeextrakt
LB-Agar	LB-Medium 1,5% (w/v) Agar
LB-Amp-Platten	LB-Medium 1,5% (w/v) Agar 200µg/ml Ampicillin
Amp-Stammlösung	20 mg/ml
1M IPTG-Stammlösung	11,9 g IPTG <i>ad</i> 50 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Aarabinose-Stammlösung	25% (w/v)
500 mM Tris-Stammlösung	30,25 g Tris/HCl pH 8.0

## Material

1 M NaCl-Stammlösung	58,44g NaCl <i>ad</i> 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
TSB-Puffer	20 mM Tris/HCl pH 8.0 300 mM NaCl 10% (v/v) Glycerin
Sequenzierreaktion	Didesoxynukleotide (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) Didesoxyribunukleotidtriphosphaten (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) Thermo Sequenase™ Cycle Sequencing Kit Sequenzierprimer
10 x TBE-Puffer	2,2 M Tris 1,8 M Borsäure 50 mM EDTA pH 8.3
Sequenziergel	21 g Harnstoff (Licor-Qualität) 6 ml Acrylamid LongRanger™ 6 ml 10 x TBE-Puffer <i>ad</i> 50 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> + 250 µl 10% (w/v) APS + 25 µl TEMED

## Proteinreinigung

Benzonase® Nuclease	in 20 mM Tris/HCl pH 8.0, 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 20 mM NaCl, 50% Glycerin, > 90% purity
BugBaster® Master Mix	Benzonase® Nuclease mit rLysozyme
DNase II	25 mg/ml
Lysozym	20 mg/ml
1 M MgCl <sub>2</sub>	
100 mM PMSF	in 98% (v/v) Ethanol
Protease Inhibitor Cocktail Set III in DMSO	

## Material

Dialyseschlauchpuffer      2% (w/v) Natriumhydrogencarbonat  
   1mM EDTA

### a<sub>1</sub>) Proteinreinigung von YidC mit Dodecylphosphocholin (Fos-cholin12)

Puffer TSB (20 ml)            20 mM Tris/HCl pH 8.0  
   300 mM NaCl  
   10% (v/v) Glycerin

Extraktionspuffer (20 ml)    1% (w/v) Fos-cholin12  
   20 mM Tris/HCl pH 8.0  
   300 mM NaCl  
   10% (v/v) Glycerin

Puffer S (20 ml)              0,1% (w/v) Fos-cholin12  
   20 mM Tris/HCl pH 8.0  
   300 mM NaCl  
   10% (v/v) Glycerin  
   30 mM Imidazol

Puffer A (30 ml)              0,2% (w/v) Fos-cholin12  
   20 mM Tris/HCl pH 8.0  
   300 mM NaCl  
   10% (v/v) Glycerin  
   40 mM Imidazol

Puffer B (20 ml)              0,2% (w/v) Fos-cholin12  
   20 mM Tris/HCl pH 8.0  
   300 mM NaCl  
   10% (v/v) Glycerin  
   300 mM Imidazol

Dialysepuffer (200 ml)      0,2% (w/v) Fos-cholin12  
   20 mM Tris/HCl pH 8.0

## Material

300 mM NaCl  
10% (v/v) Glycerin

### a<sub>2</sub>) Proteinreinigung von YidC mit Dodecylmaltosid

Puffer TSB (20 ml)	20 mM Tris/HCl pH 8.0 300 mM NaCl 10% (v/v) Glycerin
Extraktionspuffer (20 ml)	20 mM Tris/HCl pH 8.0 1% (w/v) Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid (DDM) 300 mM NaCl 10% (v/v) Glycerin
Puffer S (20 ml)	20 mM Tris/HCl pH 8.0 0,2% (w/v) Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid 300 mM NaCl 10% (v/v) Glycerin 10 mM Imidazol
Puffer A (30 ml)	20 mM Tris/HCl pH 8.0 0,2% (w/v) Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid 300 mM NaCl 10% (v/v) Glycerin 40 mM Imidazol
Puffer B (20 ml)	20 mM Tris/HCl pH 8.0 0,2% (w/v) Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid 300 mM NaCl 10% (v/v) Glycerin 300 mM Imidazol
Dialysepuffer (200 ml)	20 mM Tris/HCl pH 8.0 0,2% (w/v) Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid

## Material

300 mM NaCl  
10% (v/v) Glycerin

### b) Proteinreinigung von SecA

Puffer TSB (20 ml) 20 mM Tris/HCl pH 8.0

300 mM NaCl  
10% (v/v) Glycerin

Puffer B1 (20 ml) 50 mM Tris/HCl pH 8.0

50 mM KCl  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
5 mM Imidazol/HCl pH 8.0

Puffer B2 (40 ml) 50 mM Tris/HCl pH 8.0

50 mM KCl  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM Imidazol/HCl pH 8.0

Puffer B3 (30 ml) 50 mM Tris/HCl pH 8.0

50 mM KCl  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
150 mM Imidazol/HCl pH 8.0

Dialysepuffer (500 ml) 50 mM Tris/HCl pH 8.0

50 mM KCl  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM Mercaptoethanol

### c) Proteinreinigung von SecYEG

Puffer TSG (200 ml) 20 mM Tris/HCl pH 8.0

300 mM NaCl  
10% (v/v) Glycerin



## Material

Puffer TSG1 (50 ml)	20 mM Tris/HCl pH 8.0 1,25% (w/v) n-Octyl- $\beta$ -D-glucoopyranosid (OG) 300 mM NaCl 10% (v/v) Glycerin
Puffer TSG2 (50 ml)	20 mM Tris/HCl pH 8.0 0,05% (w/v) Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid (DDM) 300 mM NaCl 10% (v/v) Glycerin 30 mM Imidazol pH 8.0
Puffer TSG3 (30 ml)	20 mM Tris/HCl pH 8.0 0,05% (w/v) Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid 300 mM NaCl 10% (v/v) Glycerin 330 mM Imidazol pH 8.0
Puffer TSG4 (200 ml)	20 mM Tris/HCl pH 8.0 0,05% Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid 300 mM NaCl 10% Glycerin

### d<sub>1</sub>) Proteinreinigung von M13 procoat H5, Procoat H5 M13C, M13 procoat H5EE, Procoat H5EE M13C, M13 procoat-Lep 830 (PClep)

Puffer Z (20 ml)	50 mM Tris/HCl pH 7.6 10% (w/v) Saccharose
Puffer T (40 ml)	10 mM Triethanolamin/HCl pH 7.5 10% (v/v) Glycerin
Puffer S (20 ml)	1% (w/v) Lauroylsarcosin
(Extraktionspuffer)	20 mM Tris/HCl pH 7.9 500 mM NaCl 10% (v/v) Glycerin

## Material

Puffer A (200 ml)                    1% (w/v) Lauroylsarcosin  
   20 mM Tris/HCl pH 7.9  
   500 mM NaCl

Puffer B (100 ml)                    1% (w/v) Lauroylsarcosin  
   20 mM Tris/HCL pH 7.9  
   500 mM NaCl  
   500 mM Imidazol

Dialysepuffer (500 ml)            50 mM Tris/HCl pH 7.9  
   1% (w/v) Lauroylsarcosin

### d<sub>2</sub>) Proteinreinigung von M13 procoat H5-0PC

Puffer Z (20 ml)                    50 mM Tris/HCl pH 7.6  
   10% (w/v) Saccharose  
   1 mM PMSF

Denaturierungspuffer  
(30 ml)                                50 mM Tris/HCl pH 7.9  
   500 mM NaCl  
   8 M Urea

Resuspensionspuffer  
(100 ml)                              20 mM Tris/HCl pH 7.9  
   10% (w/v) Saccharose

Puffer 1 (50 ml)                    10 mM Triethanolamin pH 7.5  
   10% (v/v) Glycerin

Solubilisierungspuffer  
(50 ml)                                20 mM Tris/HCl pH 7.9  
   1% (w/v) Lauroylsarcosin  
   500 mM NaCl  
   6 M Urea  
   10% (v/v) Glycerin

Äquilibrierungspuffer  
(30 ml)                                20 mM Tris/HCl pH 7.9  
   1% (w/v) Lauroylsarcosin

## Material

	500 mM NaCl
	6 M Urea
	10% (v/v) Glycerin
	5 mM Imidazol
Waschpuffer 1 (10 ml)	20 mM Tris/HCl pH 7.9
	0,5% (w/v) Lauroylsarcosin
	500 mM NaCl
	6 M Urea
	10% (v/v) Glycerin
	5 mM Imidazol
Waschpuffer 2 (10 ml)	20 mM Tris/HCl pH 7.9
	0,5% (w/v) Lauroylsarcosin
	500 mM NaCl
	10% (v/v) Glycerin
	5 mM Imidazol
Waschpuffer 3 (20 ml)	20 mM Tris/HCl pH 7.9
	0,5% (w/v) Lauroylsarcosin
	10% (v/v) Glycerin
	15 mM Imidazol
Elutionspuffer (4 ml)	20 mM Tris/HCl pH 7.9
	0,5% (w/v) Lauroylsarcosin
	10% (v/v) Glycerin
	300 mM Imidazol
Dialysepuffer (2 l)	20 mM Tris/HCl pH 7.9
	6 M Urea

## Material

### d<sub>3</sub>) Proteinreinigung von M13 procoat mit OmpA pro828coat und pro80coat

Puffer Z (20 ml)	50 mM Tris/HCl pH 7.6 10% (w/v) Saccharose
Puffer U (80 ml)	50 mM Tris/HCl pH 8.0 1 M NaCl 8 M Urea 2 mM DTT
Puffer U1 (10 ml)	50 mM Tris/HCl pH 8.0 1 M NaCl 8 M Urea 2 mM DTT 50 mM Imidazol/HCl pH 8.0
Puffer U2 (10 ml)	50 mM Tris/HCl pH 8.0 1 M NaCl 8 M Urea 2 mM DTT 150 mM Imidazol/HCl pH 8.0
Dialysepuffer (200 ml)	50 mM Tris/HCl pH 8.0 8 M Urea 2 mM DTT

### e) Proteinreinigung von proOmpA

Puffer Z (20 ml)	20 mM Tris/HCl pH 8.0
Puffer U (70 ml)	50 mM Tris/HCl pH 8.0 1 M NaCl 8 M Urea 2 mM DTT
Puffer U1 (10 ml)	50 mM Tris/HCl pH 8.0

## Material

	1 M NaCl
	8 M Urea
	2 mM DTT
	50 mM Imidazol
Puffer U2 (10 ml)	50 mM Tris/HCl pH 8.0
	1 M NaCl
	8 M Urea
	2 mM DTT
	150 mM Imidazol
Puffer U3 (200 ml)	50 mM Tris/HCl pH 8.0
	8 M Urea
	2 mM DTT

### Proteinbestimmung nach Bradford

Bradford-Reagenz	Biorad Protein Assay in Phosphorsäure und Methanol
BSA-Stammlösung	2 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
BSA-Standardlösungen	Konzentration 100, 150, 250, 400, 500 und 750 µg/ml

### BCA-Proteinbestimmung

BCA-Reagenz	BCA-Kit von Pierce
BSA-Stammlösung	1 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
BSA-Standardlösungen	Konzentration 5, 25, 50, 125, 250, 500 µg/ml

### Herstellung von INV, Translokation mit INV

LB-Phosphatmedium (4 l)	10 g Hefeextrakt
	10 g Bactotrypton
	0,25% (w/v) Glucose
	4,15 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

## Material

	1 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$
Puffer A (50 ml)	250 mM Saccharose 50 mM HEPES pH 7.5 1 mM EDTA pH 7.0 1 mM DTT 0,5 mM PMSF
Saccharoselösung (40 ml)	1 M
Saccharosegradienten	770 mM, 1440 mM und 2020 mM Saccharose in Puffer A
INV-Puffer (10 ml)	250 mM Saccharose 50 mM HEPES pH 7.5 1 mM DTT
INV-Translokationspuffer	50 mM Tris/HCl pH 8.0 50 mM KCl 5 mM $\text{MgCl}_2$

## Lipid-Extraktion, -Reinigung, -Fällung, Dünnschichtchromatographie, Phosphatbestimmung

Lösungsmittel	DCM, MeOH, $\text{CHCl}_3$ , Aceton
Na-Phosphatpuffer (70 ml)	28,85 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 21,15 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7.0 5 mM $\text{MgCl}_2$ 0,1 mM PMSF
Puffer L (30 ml)	20 mM Tris/HCl pH 8.0
Puffer N	10 mM HEPES pH 8.0 100 mM $\text{Na}_2\text{SO}_4$ pH mit NaOH einstellen
Laufmittel (DC-Kammer)	25% (v/v) MeOH 70% (v/v) $\text{CHCl}_3$
Ninhydrinlösung	0,2% (w/v) Ninhydrin

## Material

	0,5% (v/v) Essigsäure
	96% (v/v) Aceton
Phosphatstandard	1 mM $K_2HPO_4$
HCL	2 M
Lösung 1	3,33% (w/v) $Mg(NO_3)$
	10% (w/v) $Mg(NO_3) \times 6 H_2O$
	98% (v/v) EtOH
Lösung 2	10% (w/v) Ascorbinsäure
	in 1 N $H_2SO_4$
Lösung 3	0,42% (w/v) Ammoniummolybdat
	in 1 N $H_2SO_4$

## Liposomenherstellung, Membranpotential, Rekonstitution, Topologie, Translokation, Anisotropie

Puffer N	10 mM HEPES pH 8.0
	100 mM $Na_2SO_4$
	pH mit NaOH einstellen
Puffer K	10 mM HEPES pH 8.0
	100 mM $K_2SO_4$
	pH mit KOH einstellen
Oxonol VI	1 mM in $H_2O_{dd}$
Valinomycin	250 $\mu M$ in 98% (v/v) EtOH
Fos-cholin12	0,08% (w/v) in $H_2O_{dd}$
Dodecylmaltosid	0,08% (w/v) in $H_2O_{dd}$
Saccharose	60% (w/v) in $H_2O_{dd}$
ATP	100 mM in $H_2O_{dd}$
$MgCl_2$	1 M in $H_2O_{dd}$
Trypsin-Stammlösung	1 mg/ml in $H_2O_{dd}$
Trypsin-Inhibitor-Stamm	20 mg/ml in $H_2O_{dd}$

## Material

Guanidiniumhydrochlorid	2 M in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Triton X-100	10 % (v/v) in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Proteinase K-Stammlösung	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
TCA	30% (w/v) in in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Puffer N	10 mM HEPES pH 8.0 100 mM Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5 M Glycerin pH mit NaOH einstellen
1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH)	1mM in Tetrahydrofuran (THF)

## Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Atto520-maleimid

Atto520-maleimid	1 mM in DMSO
TCEP	10-facher molarer Überschuss
Puffer A	1% (w/v) Lauroylsarcosin 20 mM Tris/HCl pH 7.9 500 mM NaCl
Puffer A1	1% (w/v) Lauroylsarcosin 20 mM Tris/HCl pH 7.9 500 mM NaCl 5 mM Imidazol
Puffer A2	1% (w/v) Lauroylsarcosin 20 mM Tris/HCl pH 7.9 500 mM NaCl 100 mM Imidazol
Puffer A3	1% (w/v) Lauroylsarcosin 20 mM Tris/HCl pH 7.9 500 mM NaCl



## Material

	200 mM Imidazol
Puffer B	1% (w/v) Lauroylsarcosin
	20 mM Tris/HCL pH 7.9
	500 mM NaCl
	500 mM Imidazol

## Spektroskopische Methoden

Aktivkohle	1,5 mm reinst Lebensmittelqualität
Atto520-maleimide	ca. 1 mM in DMSO
Puffer N*	20 mM Tris/HCl pH 8.0
	100 mM Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	mit Aktivkohle gereinigt
Puffer 2xN*	40 mM Tris/HCl pH 8.0
	200 mM Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	mit Aktivkohle gereinigt
Puffer K*	20 mM Tris/HCl pH 8.0
	100 mM K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	mit Aktivkohle gereinigt
Puffer A*	0,34 mM Dodecyl-β-D-maltosid
	20 mM Tris/HCl pH 7.9
	500 mM NaCl
	mit Aktivkohle gereinigt
Guanidiniumhydrochlorid	2 M in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Valinomycin	50 mM in 98% (v/v) EtOH
Kaliumiodid	1 M KI in Puffer N* bzw. K*
SDS-Probenpuffer (PP) für fluoreszenzmarkierte Proteine	

## 3. Methoden

### 3.1. Herstellung von kompetenten Zellen

Um *E. coli*-Zellen „kompetent“ zu machen, also die Aufnahme von DNA zu ermöglichen, muss die Permeabilität der Außenmembran erhöht werden. Hierfür wurde die Rubidium-Chlorid (RbCl)-Methode verwendet. Zunächst wurde ein Verdünnungsausstrich der gewünschten Zellen aus einer Glycerinstammlösung auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und dieser über Nacht bei 37°C bebrütet. Am nächsten Tag wurde eine Einzelkolonie von der Agarplatte gepickt (oder direkt 20 µl aus einem Glycerinstock verwendet) und in 2 ml LB-Medium gegeben, die Zellen wurden über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 100 ml LB-Medium mit 200–500 µl der Übernachtskultur angeimpft und erneut bei 37°C bis zu einer  $OD_{600nm} = 0,5$  geschüttelt. Die Kultur wurde daraufhin in einen vorgekühlten, sterilen JA14-Becher gegeben und für 5 min bei 2 460 *g* und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, während das Pellet in 30 ml eiskaltem TFB1 Puffer (100 mM RbCl, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% Glycerin, pH 5.8) vorsichtig resuspendiert wurde. Während des Resuspendierens wurden die Zellen auf Eis gehalten. Die resuspendierten Zellen wurden in ein eiskaltes, steriles JA20-Röhrchen überführt und für 90 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 1 940 *g* und 4° zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet sehr vorsichtig in 4 ml TFB2 Puffer (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% Glycerin, pH 8.0) resuspendiert und für weitere 15–60 min auf Eis gelagert. Die kompetenten Zellen wurden jeweils zu 100 µl in sterilen, kalten Eppendorfgefäßen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### 3.2. Transformation

Bei der Transformation wird freie DNA in Zellen eingebracht. Die kompetenten Zellen wurden aus der -80°C-Truhe geholt und sofort auf Eis gelagert, dabei wurde darauf geachtet, dass sie nicht geschüttelt oder schnell pipettiert wurden! Die kompetenten Zellen wurden kurz auf Eis aufgetaut. Daraufhin wurden 1-2 µl der Plasmid-DNA (ca. 50 ng) in ein vorgekühltes, steriles Eppendorfgefäß pipettiert und 50 µl der kompetenten Zellen (bzw. 50-200 µl) vorsichtig darauf gegeben. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert, anschließend für 45 s einem Hitzeschock bei 37°C ausgesetzt und erneut 5 min auf Eis inkubiert. Es wurden 200 µl steriles LB-Medium (bzw. 100-300 µl) zugegeben und für 1 h bei 37°C langsam im Thermoschüttler geschüttelt. Anschließend wurden 50 µl und der Rest (oder 20, 50 und 100 µl) auf einer LB-Amp-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 3.3. Übernachtskultur

Die Platten von der Transformation wurden nach der Inkubation über Nacht bis zur Weiterverwendung bei 4°C gelagert. Nun wurden 2 ml LB-Medium mit 200 µg/ml Ampicillin versetzt, in ein steriles Kulturröhrchen gegeben und mit einer Einzelkolonie von der Platte mittels einer Impföse oder einem sterilen Zahnstocher beimpft bis eine Trübung sichtbar wurde und für 3 h bei 37°C bei 125 rpm geschüttelt. Diese 2 ml Bakteriensuspension diente der Beimpfung für die Übernachtskultur. Dafür wurden 150 ml steriles LB-Medium in einem Schikanekolben mit 200 µg/ml Ampicillin versetzt und die 2 ml hinzupipettiert.

Für das Protein SecYEG wurde das Medium 2xYT verwendet, da die Zellen in normalem LB-Medium nicht genügend Nährstoffe fanden und deshalb sehr langsam wuchsen. Das 2xYT-Medium enthielt die doppelte Menge an Hefe (englisch: yeast) und Trypton.

### 3.4. Expression

6 l autoklaviertes LB-Medium wurden zu je 1 l in 2 l Schikanekolben gegeben und mit 200 µg/ml Ampicillin versetzt. Einmalig wurden 2,5 ml des LB-Amp-Gemisches als Nullwert in ein steriles Kulturröhrchen gegeben. Nun wurde jeweils 1 l LB-Amp-Medium mit 10 ml der Übernachtskultur (1:100) angeimpft und bis zur für die Induktion benötigten  $OD_{600nm}$  bei der gewünschten Temperatur geschüttelt. Waren die Zellen bis zur gewünschten  $OD_{600nm}$  gewachsen, wurde mit dem Induktor induziert und für die weitere benötigte Zeit und Temperatur geschüttelt. Die Zellen wurden dann geerntet, dafür wurden sie zunächst auf Eis gestellt und herunter gekühlt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 5 000 *g* und 4°C. Der Überstand wurde zügig abgegossen und so lange neue Suspension auf das vorhandene Zellpellet gegeben, bis keine Reste übrig waren. Das Gewicht der Zellpellets wurde bestimmt und die Zellpellets in dem benötigten Puffer bis zur gewünschten Konzentration resuspendiert. Die Zellsuspension wurde gut gemischt und zu je 10 g in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Die verwendeten Plasmide und kompetenten Zellen, die jeweiligen Inkubationszeiten und Temperaturen zum Erreichen der ausreichenden Zellzahl für die Induktion, sowie die jeweiligen Induktionsbedingungen und die eingesetzten Puffer sind den jeweiligen Abschnitten zur Reinigung zu entnehmen (siehe 3.17).

### 3.5. Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)

Proteine können mithilfe von Trichloressigsäure (TCA) aus wässrigen Lösungen irreversibel präzipitiert werden, wobei zusätzlich niedermolekulare Substanzen entfernt werden. Hierzu

## Methoden

wurde der Proteinlösung TCA bis zu einer Endkonzentration von 15% zugeführt und für mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Die gefällten Proteine wurden durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 18 629 *g* und 4°C in einer Tischkühlzentrifuge pelletiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Durch zweimalige Zugabe von eiskaltem Aceton (300 µl und 200 µl) wurde die Säure neutralisiert. Aceton wurde jeweils zu dem feuchten Proteinpellet gegeben und das Eppendorfgefäß leicht geschüttelt, wodurch das Pellet durch den Aceton gewaschen wurde. Es folgten zwei erneute Zentrifugationen (siehe oben), wobei der Überstand jeweils verworfen wurde. Das Pellet wurde in der Speed-Vac-Zentrifuge unter Vacuum für ca. 2 min bei 1 300 rpm und RT zentrifugiert, wobei eventuelle Lösungsmittelrückstände entfernt wurden. Das getrocknete Pellet (weißer Niederschlag) wurde in 20 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und im Thermoschüttler für 5 min erhitzt. Kleine Proteine wurden hierfür nur auf 42°C und große Proteinkomplexe auf 60°C erwärmt. Kleine Proteine können bei zu hohen Temperaturen Aggregate bilden, wodurch sie sich in der Tricin-SDS-PAGE nicht erwartungsgemäß verhalten würden. Die Proben konnten bis zur Durchführung der SDS-PAGE bei -20°C gelagert werden, mussten aber unmittelbar vor dem Auftragen auf das Gel erneut erhitzt werden, so dass eventuell ausgefallenes SDS wieder in Lösung ging.

### 3.6. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine nach ihrer Größe, also ihrem **M**olekulargewicht (MG), aufzutrennen, hat sich die SDS-**P**oly**a**crylamid**g**elelektrophorese (SDS-PAGE) als sehr effektiv erwiesen. Hierbei wandern die Proteine in einem elektrischen Feld und werden nach ihrem MG getrennt. Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergenz, das mit Proteinen zu einem negativ geladenen SDS-Proteinkomplex reagiert. Zusätzlich denaturiert es die Proteine und erleichtert somit die Wanderung im Gel. Im Probenpuffer befindet sich **D**ithio**t**hreit**o**l (DTT), das ebenfalls denaturierend wirkt und die Disulfidbrücken aufspaltet. Die Denaturierung bewirkt, dass keine Protein-Protein-Wechselwirkungen mehr auftreten. Die Auftrennung erfolgt an einer Polyacrylamidgelmatrix. Diese entsteht, wenn man eine Mischung aus Acrylamid-Monomeren und Bisacrylamid mit **A**mmonium**p**eroxodisulfat (APS) und **T**etramethylethylendi**a**min (TEMED) versetzt, letztere lösen die Polymerisation aus. Je nach MG des zu trennenden Proteins, variiert man die Acrylamid-Konzentration oder die Gelzusammensetzung. Je höher die Acrylamid-Konzentration ist, desto höher ist auch der Vernetzungsgrad des Gels und limitiert so die Proteingröße, da bei hoher Konzentration nur noch kleine Moleküle im Gel transportiert werden. Für die Auftrennung relativ kleiner Membranproteine (1 bis 10 kDa) wählt man Tricin-SDS-Polyacrylamidgele, für Proteine über 15 kDa SDS-Polyacrylamidgele. Für die Auftrennung wurde das so genannte Lämmli-System angewandt. Hierbei besteht das Gel aus zwei Phasen.

## Methoden

Einem Trenngel, das die Proteine trennt und einem darüber liegenden Sammelgel, welches die Proteine am Übergang in das Trenngel konzentriert und somit bewirkt, dass alle Proteine gleichzeitig in dieses übergehen. Im Sammelgel befinden sich Taschen, die durch Einsetzen eines Kammes in das noch flüssige Gel entstehen. In diese Taschen können die Proben unter Verwendung einer Hamilton-Spritze eingefüllt werden. Als Laufpuffer dient ein Tris-Glycin-Puffer. Vier Gele konnten in einer Gelgießkammer maximal gleichzeitig gegossen werden. Hierfür wurden jeweils vier Glasplatten mit Aussparung für die Taschen und vier ganze Platten mit Ethanol gereinigt und durch Abstandshalter voneinander getrennt in die Kammer geschichtet. Die unterschiedlichen Gele wurden durch Kunststoffplatten getrennt. Nun wurde das Trenngel in die Kammer gegossen und mit 80% Isopropanol überschichtet. Nach 1 h war das Gel polymerisiert, konnte mit H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> gewaschen und anschließend mit Filterpapier getrocknet werden. Für Tricin-SDS-Polyacrylamidgele wurde nun eine zusätzliche Schicht gegossen. Das Spacergel konzentriert die Proteine aufgrund des isoelektrischen Punktes noch zusätzlich, so dass die Proteine gleichzeitig in das folgende Trenngel übertreten können. Das Gel wurde zwischen die Glasplatten pipettiert, erneut mit 80% Isopropanol überschichtet und nach 45 min wiederum mit H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> gewaschen. Nun wurde das Sammelgel jeweils zwischen die Glasplatten pipettiert und die Kämme eingesetzt. Nach einer weiteren Stunde konnte die Kammer abgebaut werden und die Gele wurden abgedeckt durch nasse Papiertücher und Kunststoffolie für max. 2 Wochen im Kühlschrank gelagert.

<b>Protein</b>	<b>Größe</b>	<b>SDS-PAGE</b>	<b>Blotzeit</b>	<b>Antikörper</b>
<b>M13 procoat H5</b>	8,5 kDa	15% Tricin-SDS-Gel	40 min	M13 AIII + M13 RZ
<b>Procoat H5-M13C</b>	8,6 kDa	15% Tricin-SDS-Gel	40 min	M13 AIII + M13 RZ
<b>M13 procoat H5EE</b>	8,7 kDa	15% Tricin-SDS-Gel	40 min	M13 AIII + M13 RZ
<b>Procoat H5EE-M13C</b>	8,8 kDa	15% Tricin-SDS-Gel	40 min	M13 AIII + M13 RZ
<b>M13 procoat H5-0PC</b>	8,5 kDa	15% Tricin-SDS-Gel	120 min	M13 Kreta
<b>pro828coat</b>	26,5 kDa	15% SDS-Gel	50 min	M13 AII oder OmpA
<b>pro80coat</b>	16,1 kDa	15% SDS-Gel	50 min	M13 AII oder OmpA
<b>PClep</b>	18,4 kDa	15% SDS-Gel	50 min	M13 AI, M13 AII
<b>YidC</b>	60 kDa	12% SDS-Gel	60 min	YidC-C oder YidC-P1
<b>SecY</b>	48 kDa	15% SDS-Gel	70 min	SecY
<b>SecE</b>	14 kDa	15% SDS-Gel	70 min	His-tag
<b>SecG</b>	11,4 kDa	15% SDS-Gel	70 min	SecG
<b>SecA</b>	102 kDa	12% SDS-Gel	75 min	SecA
<b>proOmpA</b>	37,2 kDa	15% SDS-Gel	50 min	OmpA

**Tab.4 Übersicht über die verwendeten Proteine bezüglich SDS-PAGE, Blotzeit und Antikörper**

## Methoden

### SDS-PAGE-Probenpuffer

5 Vol Sol 1 : 4Vol Sol 2 : 1 Vol 1M DTT

Sol 1:

1 ml      1 M Tris  
0,5 ml    200 mM EDTA pH 7  
3,5 ml    H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

Sol 2:

4 ml      25% (w/v) SDS  
1 ml      1 M Tris  
3,5 ml    100% (v/v) Glycerol  
3,5 ml    0,5% (w/v) Bromphenolblau

Monomerlösung      30 % Acrylamidlösung  
                                 0,8 % Bisacrylamidlösung

#### a) SDS-PAGE (nach Lämmli)

SDS-Laufpuffer      27 mM Tris  
                                 192 mM Glycin  
                                 0,05% (w/v) SDS

<b>Trenngel (30 ml)</b>	<b>10%</b>	<b>12%</b>	<b>15%</b>	<b>Sammelgel (20 ml)</b>	<b>3%</b>
<b>Monomerlösung</b>	10 ml	12 ml	15 ml	<b>Monomerlösung</b>	2,66 ml
<b>2 M Tris pH 8,8</b>	5,62 ml	5,62 ml	5,62 ml	<b>1 M Tris pH 6,8</b>	2,5 ml
<b>H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub></b>	14,1 ml	12,1 ml	9,1 ml	<b>H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub></b>	14,6 ml
<b>25% SDS</b>	120 µl	120 µl	120 µl	<b>25% SDS</b>	80 µl
<b>10% APS</b>	150 µl	150 µl	150 µl	<b>10% APS</b>	100 µl
<b>TEMED</b>	10 µl	10 µl	10 µl	<b>TEMED</b>	10 µl

Tab.5 Pipettierschema für SDS-PAGE

#### b) Tricin-SDS-PAGE (nach Schagger)

Anoden-Puffer      200 mM Tris/HCl pH 8,9

Kathoden-Puffer    100 mM Tris  
                                 100 mM Tricin  
                                 0,1% (w/v) SDS

}      pH 8,25

Gel-Puffer            3 M Tris/HCl pH 8,45

0,3% (w/v) SDS

Lösung	Trenngel 15%	Spacergel 3%	Sammelgel 1%
Monomerlösung	15 ml	3,3 ml	1,1 ml
Gelpuffer	10 ml	4 ml	2,5 ml
Glycerin	4 g	-	-
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	1 ml	4,8 ml	6,5 ml
10% APS	100 µl	40 µl	80 µl
TEMED	10 µl	4 µl	8 µl

Tab.6 Pipettierschema für Tricin-SDS-PAGE

### 3.7. Visualisierung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Es sind mehrere Methoden zum Sichtbarmachen von Proteinen bekannt. Sie unterscheiden sich nicht nur in ihrer Wirkungsweise, sondern auch in ihrer Spezifität und Sensitivität.

Methode	Untere Nachweisgrenze	Spezifität
Silberfärbung	0,1-1 ng Protein	gering
Western Blot	< 10 ng Protein	hoch
Ponceau S	50 ng Protein	gering
Coomassie Brilliant Blau	100 ng Protein	gering

Tab.7 Sensitivität und Spezifität der Sichtbarmachung von Proteinen in SDS-PAGE

#### 3.7.1. Färbung eines Polyacrylamidgels mittels Coomassie

Eine recht unkomplizierte und schnelle Methode, Proteine sichtbar zu machen, ist die Färbung mit Coomassie Brilliant Blau. Bei dieser Färbereaktion lagert sich der Farbstoff Triphenylmethan an die basischen Seitenketten der Aminosäuren der Proteine an, wodurch diese unspezifisch gefärbt werden.

Das Gel wurde zunächst 5 min mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gewaschen, um Reste des Laufpuffers zu entfernen. Anschließend wurde das Gel für maximal 1 min bei 500 W in der Mikrowelle mit der Coomassie-Färbelösung (0,1% Coomassie Brilliant Blau R 250, 40% MeOH, 10% HAc) erhitzt. Nach dem vollständigen Abkühlen der Flüssigkeit konnte diese zurück in die Flasche gegossen und mehrmals wieder verwendet werden. Nun wurde der Hintergrund so lange mit Entfärbelösung (20% MeOH, 7% HAc) entfärbt, bis deutliche Banden sichtbar waren. Dafür wurde das Gel mehrmals für je eine Minute in der Mikrowelle erhitzt und nach dem Abkühlen in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gelagert. Die Entfärbelösung wurde ebenfalls wiederverwendet, musste dafür allerdings mithilfe von Aktiv-

## Methoden

kohle entfärbt werden. Das Gel wurde mithilfe des Image Scanners abfotografiert und im Gel-trockner getrocknet.

### **3.7.2. Färbung eines Polyacrylamidgels mittels Silberfärbung**

Eine weitere, jedoch deutlich aufwendigere Methode der Visualisierung von Polypeptiden, ist die Färbung mit Silbernitrat. Die Silberionen bilden Komplexe mit den Glu-, Asp- und Cys-Resten der Proteine, welche dann mit alkalischem Formaldehyd zu elementarem Silber reduziert werden. Dabei kommt es zu einer Färbung der Proteine. Des Weiteren fixiert das Glutaraldehyd die Proteine zusätzlich im Gel, indem es Quervernetzungen einbringt.

Zunächst wurde das Gel für mindestens 30 min in Fixierlösung (40% EtOH, 10% HAc) unter Schütteln inkubiert. Der Fixierer wurde entfernt, frisch hergestellter Sensitivierer (30% EtOH, 0,125% Glutaraldehyd, 0,2% Natriumthiosulfat, 6,8% Natriumacetat) zugegeben und das Gel darin weitere 30 min geschüttelt. Nun folgten zwei Waschschrte für je 5 min mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> und eine anschließende Färbung mit Silberlösung (0,25% Silbernitrat, 0,041% Formaldehyd) unter Alufolie für 20 min. Es schlossen sich erneut zwei Waschschrte mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> für jeweils 1 min an. Nun wurde das Gel für 2 min bis max. 45 min in Entwickler (2,5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,021% Formaldehyd) geschüttelt, was die Färbung sichtbar machte. Auch dieser Schritt erfolgte im Dunkeln, da dann die Färbung spezifischer war und der Hintergrund ungefärbt blieb. Wenn die gewünschten Banden sichtbar waren, wurde die Färbereaktion durch die Zugabe von Stopplösung (1,46% Na-EDTA) beendet. Nach 10-minütiger Inkubation in Stopplösung konnte das Gel in Konservierer (30% EtOH, 4% Glycerin) überführt werden und darin bis zur Detektion aufbewahrt werden. Das Gel wurde mithilfe des Image Scanners abfotografiert und im Gel-trockner getrocknet.

### **3.7.3. Transfer von Proteinen mittels semi-dry Western Blot**

Um Proteine aus einem SDS-Gel auf eine Nitrocellulosemembran zu transferieren, verwendet man den sogenannten Sandwichaufbau (siehe Abb16). Die Proteine werden hierbei auf die an der Seite der Kathode liegende Membran übertragen (englisch: blotting), indem ein zum Polyacrylamidgel senkrechtes elektrisches Feld angelegt wird.

Das Polyacrylamidgel und die Nitrocellulosemembran wurden zunächst für 10 min in Transferpuffer (50 mM Tris, 200 mM Glycin, 5% Methanol) inkubiert. Der Aufbau erfolgte von Anode zu Kathode. Zunächst wurden zwei in Transferpuffer getränkte Whatmanfilter (GB 004bGel Blotting Papier) auf die Anodenplatte der Blotkammer gelegt, das zu blottende Gel luftblasenfrei darüber und die Nitrocellulosemembran ebenfalls luftblasenfrei darauf. Zuletzt wurden erneut



## Methoden

zwei mit Transferpuffer getränkte Filterpapiere aufgelegt und die Kathodenplatte vorsichtig angedrückt und mit den Schrauben fixiert. Die Blotkammer wurde an ein Netzgerät angeschlossen und die Proteine bei konstant 10 V auf die Nitrocellulosemembran transferiert. Die Blotzeiten variierten dabei abhängig vom Protein (siehe Tab.1).

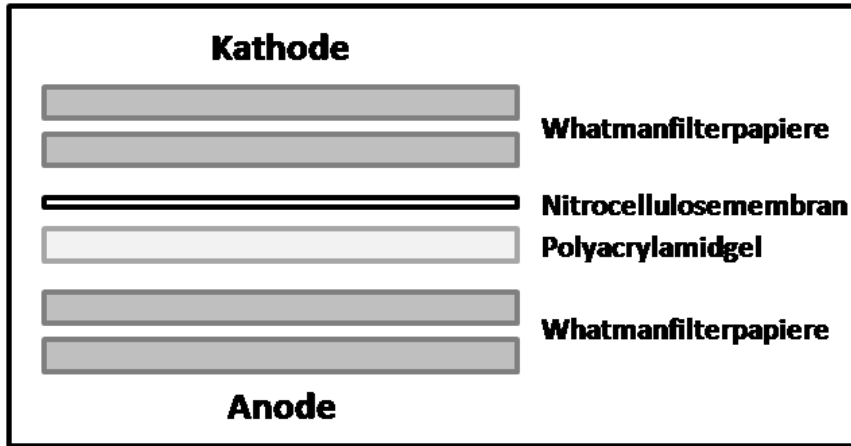


Abb16. Sandwichaufbau für die Durchführung eines semi-dry Western blot

### 3.7.4. Transfer von Proteinen mittels Nass-Blot

Einige Proteine lassen sich mittels semi-dry Western Blot nicht effizient auf die Nitrocellulosemembran transferieren (M13 procoat H5-0PC), hierfür kann die Nass-Blot-Technik angewandt werden. Bei dieser Technik erfolgt der Transfer der Proteine auf die proteinbindende Membran in einem deutlich größeren Puffervolumen über längere Zeit. Der Transfer erfolgte ebenfalls mithilfe des Sandwichaufbaus, das Volumen des speziellen Transferpuffers (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,01% SDS, 20% MeOH) war hierbei jedoch größer und ermöglichte somit die bessere Übertragung der Proteine. Der Transfer fand bei 125 V (max. 1500 mM) statt und wurde für 2 h durchgeführt. Anschließend wurde die Membran ebenfalls mit Ponceau S gefärbt. Die Übertragung der Proteine mittels der Nass-Blot-Technik war effizienter, daher wurde sie angewandt, wenn die semi-dry-Methode erfolglos blieb.

### 3.7.5. Ponceau S-Färbung der Nitrocellulosemembran

Nach erfolgtem Transfer der Proteine wurden die Proteinbanden für einige Minuten mit 0,2% Ponceau S in 5% TCA gefärbt und gleichzeitig fixiert. Die Membran wurde anschließend mit  $H_2O_{dd}$  entfärbt und die Banden mit einem Buntstift markiert.

### **3.8. Immunfärbung des Western Blots**

Die auf der Nitrocellulosemembran immobilisierten Proteine können mittels Immunfärbung detektiert werden. Hierfür ist zunächst das Absättigen der freien Bindungsstellen auf der Membran notwendig. Anschließend erfolgt eine spezifische Markierung der Proteinbanden mittels Antikörperbindung. Nach dem vollständigen Entfärben des Hintergrundes von Ponceau S-Rückständen wurden unspezifische Bindungsstellen der Membran durch Milchalbumin abgesättigt. Hierfür wurde die Membran für mindestens 30 min bei RT (oder über Nacht bei 4°C) in 5% Milchpulver in TBS (englisch: **T**ris-**b**uffered **s**aline) geschüttelt. Die Membran wurde nun 4 x 5 min mit TBS (20 mM Tris/HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 2,7 mM KCl) gewaschen und über Nacht im Primärantikörper bei 4°C inkubiert. Die Antikörperkonzentration war von der Art des Antikörpers und von der eingesetzten Proteinmenge abhängig (1:5 000 – 1:20 000). Anschließend wurde die Membran erneut 4 x 5 min mit TBS gewaschen und mit dem sekundären Antikörper (Anti-rabbit oder Anti-mouse) für 1 h bei RT inkubiert. Schließlich wurde die Membran ein letztes Mal 3 x 5 min mit TBS gewaschen und konnte für den immunologischen Nachweis herangezogen werden. Die verwendeten Antikörper und Inkubationszeiten sind in Tab.1 dargestellt.

#### **3.8.1. Enhanced Chemiluminescence (ECL)**

Die Chemilumineszenz-Verstärkungs-Reaktion (ECL) ermöglicht den Nachweis des an die Membran gebundenen Proteins. Der Primärantikörper erkennt spezifisch das Epitop des gewünschten Proteins, während der sekundäre Antikörper gegen den konstanten Teil des 1. gerichtet ist. Der 2. Antikörper ist an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Bei der ECL-Reaktion wurde Luminol durch die Meerrettich-Peroxidase in Gegenwart eines chemischen Verstärkers, wie Phenol, oxidiert. Das Luminol geht durch die Oxidation in einen angeregten Zustand über, den es nur durch Aussendung von Licht wieder verlassen kann. Diese Lumineszenz kann durch Exposition auf einem Blaulicht empfindlichen Film sichtbar gemacht werden.

Für die Durchführung wurde die Nitrocellulosemembran für 3 min in einer ECL-Lösung (ECL™ Western Blotting Detection Reagents and Analysis System, GE Healthcare) inkubiert. Diese ECL-Lösung setzte sich aus den 2 Reagenzien des ECL-Kits zusammen, die 1:1 (v/v) gemischt wurden (Gesamtvolumen für ein Minigel 1 ml). Nach dieser Inkubationszeit wurde die Membran so in eine Kunststoffolie gelegt, dass die Proteine nach oben zeigten. Die Folie wurde in eine Fotokammer (Röntgenkassette) gelegt, so dass kein Licht mehr an die Membran gelangen konnte. Nun wurde unter Rotlicht ein Film (Röntgenfilm, Valmex Blue) auf die Membran gelegt und beides je nach Bedarf 1-20 min belichtet. Abhängig von dem verwendeten Antikörper konnte die Belichtungszeit von mehreren Stunden bis zu einem Tag variieren. Danach wurde der

## Methoden

Film zügig entnommen, umgekehrt in die Entwicklerlösung gelegt und leicht geschüttelt. Der Entwickler (Eukobrom TETENAL) wurde zuvor 1:20 mit  $\text{H}_2\text{O}_d$  verdünnt. Sobald die Banden auf dem Film deutlich erkennbar waren, wurde der Film in eine Stopplösung gegeben. Diese Stopplösung bestand aus  $\text{H}_2\text{O}_d$ , welches mit einigen Tropfen Eisessig versetzt wurde. Nun wurde der Film in eine Fixierlösung (Superfix Plus von Eukobrom TETENAL) transferiert, welche zuvor 1:5 mit  $\text{H}_2\text{O}_d$  verdünnt wurde.

### 3.8.2. Chlornaphtol-Färbung

Hierbei wurden die Proteine auf der Nitrocellulosemembran durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht. Es wurden 20 mg 4-Chlor-1-naphthol in 3 ml Methanol gelöst zu 100 ml TBS gegeben, dann wurden 20  $\mu\text{l}$  30% Wasserstoffperoxid zugefügt und die Membran darin 5 min bis max. 1 h inkubiert. Danach wurde die Membran mit  $\text{H}_2\text{O}_d$  gewaschen und zwischen zwei Filterpapieren getrocknet. Die Membran konnte mithilfe des 2D-Scanners abfotografiert werden.

## 3.9. Entfernung eines Antikörpers von einer Nitrocellulosemembran

Für eine erneute Immundetektion einer bereits mittels ECL entwickelten Nitrocellulosemembran können die gebundenen Antikörper entfernt werden (englisch: stripping), indem die Membran mit einem stark sauren Puffer inkubiert wird. 40 ml Stripping-Puffer (200 mM Glycin, 500 mM NaCl, pH 2.8) wurde auf die zu behandelnde Membran gegeben und 5 min unter Schütteln inkubiert. Die Membran wurde nun mit 1 M Tris (oder mit 1 N NaOH) neutralisiert und zweimal 30 min mit 200 ml TBS gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit 5% Milch in TBS geblockt, um proteinfreie Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend erfolgte die erneute Inkubation mit dem spezifischen Antikörper.

## 3.10. Quantifizierung der Proteinbanden

Um die Banden zu quantifizieren, die bei der Topologiebestimmung und den Translokationsversuchen nach der ECL auf den Fotofilmen erkennbar waren, wurden diese mittels des Kodak Imagers berechnet.

Bei der Topologiebestimmung wurden die Banden der Ausgangsmenge als 100%-Wert herangezogen. Der zu berechnende Wert (Ausgangsmenge + Trypsin) wurde von der 100%-Bande abgezogen. Dabei wurden Banden von unverdaulichem YidC und Abbaubanden berücksichtigt.

## Methoden

Die Quantifizierung der Translokationsrate wurde berechnet, indem zunächst die Effizienz der Bindung des Proteins an die (Proteo-) Liposomenmembran bestimmt wurde. Hierfür wurden die Werte aus dem Überstand und dem Pellet addiert und als 100%-Wert verwendet. Nun konnte der Wert des Pellets davon abgezogen werden. Die Quantifizierung der Translokationsrate bezog sich auf das an die Membran gebundene Protein (Pellet). Der Wert des gebundenen Proteins wurde als 100%-Wert herangezogen und die Bande des Pellets, das mit Proteinase K verdaut wurde, davon abgezogen.

### **3.11. Mini-Präparation von Plasmid-DNA (für High Copy-Number Plasmide)**

Mithilfe der Mini-Präparation kann Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen gewonnen werden. Hierfür wurden die Plasmide in den *E. coli*-Stamm XL1Blue transformiert. Mindestens 3 ml LB-Medium wurden mit Ampicillin versetzt, so dass die Endkonzentration des Antibiotikums bei 200 µg/ml lag. Eine Kolonie wurde von einer LB-Amp-Platte der frisch transformierten XL1Blue-Zellen gepickt und die Übernachtskultur damit angeimpft. 1,5 ml der Übernachtskultur wurden in ein steriles Eppendorfgefäß pipettiert und für 1 min bei 10 000 *g* und RT zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen.

Für die Mini-Präparation von Plasmid-DNA wurde das Mini-Prep-Kit von Peq-Lab Biotechnology GmbH in Erlangen verwendet. Es wurden nochmals 1,5 ml der Übernachtskultur für 1 min bei 10 000 *g* und RT zentrifugiert und der Überstand sorgfältig mit einer gelben Spitze abgenommen. Nun sollten die Bakterien lysiert werden, indem das Bakterienpellet in 200 µl Lösung I/RNase A (musste vor dem ersten Gebrauch mit RNase A versetzt und bei 4°C gelagert werden) durch sorgfältiges Vortexen resuspendiert wurde. Nun gab man 200 µl Lösung II zu und invertierte 5 x, bis ein klares Lysat entstand. Auf Vortexen sollte verzichtet werden, da sonst die chromosomale DNA zerstört und mit der Plasmid-DNA eluiert würde! Das klare Lysat wurde nun mit 280 µl Lösung III neutralisiert und 5 x invertiert bis sich ein weißes, flockiges Präzipitat bildete. Nun wurde für 10 min bei 10 000 *g* und RT zentrifugiert und der Überstand weiterverwendet. Anschließend wurde eine HiBind®-Miniprep-Zentrifugensäule mit einer Pinzette in das passende 2 ml Sammeltube gesteckt und der klare Überstand in die Säule pipettiert ohne dabei Teile des Debris pellets zu übertragen. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation für 1 min bei 10 000 *g* und RT, der Säulendurchfluss wurde verworfen. Nun wurden 500 µl HB-Puffer auf die Säule pipettiert und für 1 min bei 10 000 *g* und RT pelletiert und wiederum der Säulendurchfluss verworfen. 600 µl des mit absolutem Ethanol komplettierten DNA-Waschpuffers wurden auf die Säule pipettiert und für 1 min bei 10 000 *g* und RT zentrifugiert, der Säulen-

## Methoden

durchfluss wurde abermals verworfen. Nochmals wurde mit 600 µl DNA-Waschpuffer gewaschen und wie oben zentrifugiert. Die Säule konnte nun durch eine Zentrifugation für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit (18 620 *g*) und RT getrocknet werden. Die Zentrifugensäule wurde in ein neues, steriles Eppendorfggefäß überführt und die DNA abhängig von der gewünschten Konzentration mit 50–100 µl sterilem Wasser eluiert. Dazu wurde die Säule ca. 1 min bei RT inkubiert (meist 50 µl steriles Wasser) und dann für 1 min bei 10 000 *g* und RT (Säule mit offenem Deckel) geleert. Die Plasmid-DNA wurde bei -20°C oder 4°C aufbewahrt.

### 3.12. Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA

Die Konzentration der gewonnenen DNA wurde durch eine photometrische Messung bestimmt. Hierzu wurde die in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> eluierte DNA bei einer optischen Dichte (OD) von 260 nm gemessen. Eine OD von 1 entspricht 50 µg/µl bei doppelsträngiger und 33 µg/µl bei einzelsträngiger DNA. Die DNA-Konzentration wurde mittels folgender Formel berechnet.

$$c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = E_{260} \times 50 \text{ }\mu\text{g/ml} \times F$$

c	Konzentration der DNA
E <sub>260</sub>	Extinktion bei λ = 260 nm
F	Verdünnungsfaktor

### 3.13. DNA-Sequenzierung (Sanger *et al.*, 1977)

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde nach der Didesoxymethode nach Sanger (1977) unter Verwendung des Thermo Sequenase™ Cycle Sequencing Kits (USB Biochemical Corporation) durchgeführt. Bei dieser Methode führt die Verwendung von Didesoxynukleotidtriphosphaten (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) zu einem Kettenabbruch, da während der Polymerasekettenreaktion (englisch: **p**olymerase **c**hain **r**eaction, PCR) anstelle der Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) eines der Didesoxynukleotide eingebaut wird, wobei unterschiedlich lange DNA-Fragmente entstehen. Da die Replikation des Plasmid-Templates von einem fluoreszenzfarbstoffmarkierten Sequenzierprimer ausgehend gestartet wird, können die in den vier parallel durchgeführten Ansätzen entstandenen Fragmente während einer elektrophoretischen Auftrennung von einem Laser detektiert werden.

## Methoden

Es wurden jeweils für jede zu untersuchende DNA vier PCR-Tubes in vier unterschiedlichen Farben vorbereitet. Von jedem Terminations-Mix (dNTP + ddNTP) wurden 4 µl in je ein PCR-Tube gegeben und auf Eis gelagert, dabei musste folgendes Farbschema berücksichtigt werden:

A = blau, C = rot, G = gelb, T = grün.

Der Mastermix wurde für jede zu sequenzierende DNA nach folgendem Pipettierschema (siehe Tab.8) in ein steriles Eppendorfgefäß pipettiert. Dabei musste darauf geachtet werden, dass der lichtempfindliche Primer immer unter Alufolie transportiert und während der Reaktion gelagert wurde. Die Thermosequenase hingegen musste ständig auf Eis gehalten werden und wurde erst direkt vor Zugabe zum Mastermix aus der Gefriertruhe geholt und kurz bei 18 620 *g* zentrifugiert.

Mastermix	Menge
DNA	12,5 µl
Reaktionspuffer	2 µl
Primer	1 µl (2 pmol/µl)
Thermosequenase	1,8 µl

**Tab.8 Pipettierschema für die DNA-Sequenzierung**

Nun wurde der Mastermix kurz durch Ansnipsen gemischt und für 10 s bei 18 620 *g* zentrifugiert und je 4 µl zu dem Terminations-Mix gegeben. Die PCR-Tubes wurden erneut kurz gemischt und für 10 s bei 18 620 *g* zentrifugiert.

Anschließend erfolgte die PCR nach folgendem Protokoll:

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95°C	2 min	1
Denaturierung	95°C	30 s	40
Annealing	je nach Primer	30 s	
Elongation	72°C	1 min	
<i>Final</i> Elongation	20°C	2 min	1
Reaktionsende	4°C		

**Tab.9 Programmierung der PCR-Maschine**

Nach der PCR-Reaktion wurden zu jedem Ansatz 3 µl Stopplösung hinzugegeben. Vor dem Auftragen auf das Sequenziergel wurden die Proben auf 75°C erhitzt.

### 3.14. Herstellung von Sequenziergelen

Vor dem Zusammenbau der Gießvorrichtung wurden die Glasplatten sorgfältig mit 10% SDS gereinigt und zunächst mit heißem Wasser und dann mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  gespült. Anschließend wurden die Innenseiten der Glasplatten mit Ethanol gereinigt und die Gelapparatur gemäß den Herstellerangaben zusammengesetzt.

21 g Harnstoff (Licor-Qualität) wurden mit 6 ml Acrylamid LongRanger™, 6 ml filtriertem 10 x TBE-Puffer (2,2 M Tris, 1,8 M Borsäure, 50 mM EDTA, pH 8.3) und 10 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  in einer Saugflasche gelöst. Anschließend wurde auf 50 ml mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  aufgefüllt und die Lösung mit der Wasserstrahlpumpe entgast. Nach dem Entgasen der Lösung wurden 3 ml Bodengel entnommen, mit 32  $\mu\text{l}$  10% APS und 4 ml TEMED versetzt und mithilfe einer Pasteurpipette in die Öffnungen der Gießvorrichtung pipettiert. Nach dem Polymerisieren des Bodengels wurde die restliche Lösung mit 250  $\mu\text{l}$  frisch zubereitetem 10% APS und 25  $\mu\text{l}$  TEMED versetzt und mit einer Spritze unter Klopfen luftblasenfrei zwischen die Glasplatte gegeben. Das polymerisierte Sequenziergel (1,5 bis 2 h) wurde in das Sequenziergerät gestellt, beladen und nach der Gelelektrophorese am Computer ausgewertet.

### 3.15. Proteinreinigung mit der Äkta

Bei dieser Methode handelt es sich um eine Art der FPLC (englisch: **f**ast **p**rotein **l**iquid **c**hromatography) bei der das Gerät pH/C-900, UV-900, P-900 von Amersham Biosciences verwendet wurde. Alle Puffer mussten entgast und fusselfrei sein! Dafür wurden die Puffer durch eine Nutsche gesaugt und dann mit geöffnetem Deckel für 5 min in das Ultraschallbad gestellt. Vor Verwendung der Äkta (Amersham Biosciences) musste das gesamte System (Pumpen, Schläuche und ggf. der Loop) zunächst mit 20% Ethanol, dann mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  gespült und anschließend mit dem benötigten Puffer äquilibriert werden. Für die in dieser Arbeit angefertigten Reinigungen wurde die Ionenmetallaffinitätschromatographie (IMAC) angewandt, dafür wurde eine selbst gepackte Säule (Amicon,  $\varnothing$  1,5 cm) verwendet. Die Leersäule wurde wie folgt vorbereitet. Man ließ die Protein-Matrix-Suspension mehrmals durchlaufen, wobei die untere Schraube nur ins untere Drittel gedreht wurde. Wenn das Inkubationsgefäß frei von  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose-Resten war, ließ man die Flüssigkeit so weit durchlaufen, dass ca. 4 cm übrig blieben. Nun konnte die untere Schraube zuge dreht und in die Vorrichtung eingehängt werden. Die Säule wurde mit einem Laborständer an der Äkta befestigt, dann wurde zunächst so lange die obere Hälfte der Säule mit offener Schraube eingedreht bis ca. 1 cm Flüssigkeit übrig blieb. Die aus dem Schlauch austretende Flüssigkeit wurde in den Vorfilter getropft, bis dieser voll war und mit dem Schlauch aus der Äkta verbunden werden konnte. Nun wurde so weit die untere

## Methoden

schwarze Schraube eingeschraubt bis ca. 2 mm Flüssigkeit übrig blieben, dabei musste die obere Schraube am Schlauch offen sein (Verschließen der Säule s.o.). Vor Starten des Programms mussten beide grünen Schrauben festgedreht werden, da sonst Flüssigkeit in die Säule eintreten und die beiden Hälften auseinander drücken konnte. Anschließend wurde die Säule unverzüglich mit einem gelochten Adapter mit dem System verbunden und das Programm gestartet.

### 3.16. Dialyse

Die Dialyse ermöglicht die Trennung von osmotisch wirksamen Teilchen an einer semi-permeablen Membran mit definierter Porengröße. Mit dieser Methode können z.B. Proteine von Salzen getrennt oder Substanzen wie Imidazol oder Detergenzien aus einer Lösung entfernt werden. Die Dialyseschläuche (Spectra/Por® Membrane MWCO 1 bis 30 kDa in 0,1% Natriumazid) für das entsprechende Molekulargewicht des Proteins (YidC, SecA, SecYEG, proOmpA, pro828coat, pro80coat, PClep) wurden zunächst für 10 min in 2% Natriumhydrogencarbonat und 1 mM EDTA gekocht. Anschließend wurden sie mehrmals mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gewaschen und abschließend für weitere 10 min in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf 100°C erhitzt. Für die Dialyse wurde der Schlauch an einem Ende einmal eingeschlagen und mit einer Schlauchklemme verschlossen. Die zu dialysierenden Fraktionen wurden gegebenenfalls vereinigt oder einzeln in den Dialyseschlauch gefüllt, dieser erneut umgeschlagen und mit einer Klemme befestigt. Die Dialyseeinheit wurde in 200-fachem Überschuss an Dialysepuffer für mindestens 2 h bei RT (für Harnstoff-haltige Eluate) oder über Nacht bei 4°C unter Rühren dialysiert. Für die kleinen M13 procoat-Proteine wurde die Dialyse mithilfe der D-Tube™ Dialyzer Maxi mit einer Porengröße von 3,5 kDa (Novagen) durchgeführt.

### 3.17. Proteinreinigung

Die Proteinreinigung ermöglicht die Anreicherung von Proteinen, die für molekularbiologische Experimente isoliert benötigt werden. Es gibt viele Möglichkeiten der Reinigung, wie zum Beispiel die Gelfiltration, Ionenaustausch- oder Affinitätschromatographie. Der Zellaufschluss erfolgte mithilfe der French Pressure Cell Press (Milner *et al.*, 1950), wobei die Zellen unter großem Druck aus einem Metallzylinder entlassen werden. Hierbei kommt es zu einem Druckabfall, wodurch die Zellen aufgeschlossen und die DNA zerkleinert wird. Die Reinigung von Proteinen kann allgemein auf zwei Arten geschehen, nativ oder denaturierend. Generell ist die native Reinigung der denaturierenden vorzuziehen. Dabei wird das Protein in seiner nativen Faltung erhalten und kann direkt verwendet werden. Bei der denaturierenden Reinigung wird



## Methoden

das Protein zunächst mithilfe von Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid entfaltet. Diese Entfaltung kann etwa von Nöten sein, wenn das Protein nicht für die Reinigungsmatrix zugänglich ist. Ein entfalteter Zustand kann aber auch für folgende Experimente von Vorteil sein. Lösliche Proteine des Cyto- oder Periplasmas können direkt gereinigt werden, während Membranproteine zunächst solubilisiert werden müssen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle Proteine mittels einer speziellen Form der Affinitätschromatographie, der Ionenmetall-affinitätschromatographie (englisch: **i**on-**m**etal-**a**ffinity-**c**hromatography, IMAC) gereinigt. Die zu reinigenden Proteine wurden in ein Plasmid transformiert, welches für eine Histidinyldmodifikation kodiert. Dieser sogenannte His-tag beinhaltet 6-10 Histidin-Aminosäurereste, die eine Bindung an eine Nickelmatrix ermöglichen. Diese Matrix kann z.B. Agarose oder Sepharose sein, welche jeweils mit **N**ickel( $\text{Ni}^{2+}$ )-Ionen beladen wurde. In den folgenden Abschnitten wurde meist die  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose (**N**itrilo-**t**ri-**a**cidic-acid, NTA), aber auch die  $\text{Ni}^{2+}$ -Sepharose (nur bei der SecYEG-Reinigung) verwendet. Die Bindung des His-tags und somit des ihn tragenden Proteins an die Matrix ist reversibel und kann mit Imidazol rückgängig gemacht werden. Imidazol hat eine ähnliche Struktur wie das Histidin, hat aber eine noch höhere Affinität zu den Nickelionen als die Aminosäure. Durch Zugabe von steigenden Konzentrationen an Imidazol können somit an die Matrix gebundene Moleküle systematisch von der Säule eluiert werden. Die Bindung des His-tags an die Säulenmatrix erfolgte im sogenannten „batch-Verfahren“ in einer Minisäule (BD Plastipak™, 5 ml, Becton Dickinson), bei welchem die Inkubation von Matrix und Protein gemeinsam über eine längere Zeit und unter Drehen geschieht. Sie ist im Gegensatz zum „Säulenverfahren“ zu sehen, bei dem das Protein in Lösung auf die bereits fertig gepackte Säule gegeben wird. Der Kontakt zwischen Protein und Matrix ist hierbei nur sehr kurzweilig.

Für die native Reinigung der verschiedenen Proteine wurden unterschiedliche Detergenzien eingesetzt. Das für die Reinigung von YidC verwendete zwitterionische Detergenz Fos-cholin12 (n-Dodecylphosphocholin, Anagrade) von Anatrace ist den Phospholipiden sehr ähnlich, besitzt Acylketten aus 12 C-Atomen und eine Phosphocholin-Kopfgruppe (molekulare Formel:  $\text{C}_{17}\text{H}_{38}\text{NO}_4\text{P}$ ). Das Molekulargewicht (MG) beträgt 351,5 g/mol und die cmc liegt bei 1,5 mM oder 0,047%. Für die Reinigung von YidC und SecYEG wurde das Detergenz Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid von GERBU verwendet, es ist ein nicht-ionisches Detergenz und hat ein MG von 510,6 g/mol (molekulare Formel:  $\text{C}_{24}\text{H}_{46}\text{O}_{11}$ ). Die cmc beträgt 0,15 mM oder 0,008%. Das für die Reinigung einiger Procoatproteine verwendete anionische Detergenz n-Lauroylsarcosin von USB hat ein MG von 293,4 g/mol ( $\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{NO}_3$ ) und die cmc beträgt 14,4 mM oder 0,42%.

Nach jeder Reinigung wurden je 10  $\mu\text{l}$  der Fraktionen über SDS-PAGE aufgetrennt, ein Gel wurde geblottet, während ein weiteres mit Coomassie Brilliant Blau (größere Proteine) oder Silber

## Methoden

(kleine Proteine) gefärbt wurde. Somit konnte detektiert werden, in welcher Fraktion sich das gereinigte Protein in konzentrierter Form befand, ebenfalls konnten die Elutionen auf ihren Reinheitsgrad untersucht werden. Die Protein enthaltenden Fraktionen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### **3.17.1. Reinigung der Membraninsertase YidC mit Fos-cholin12 (FOS) (Kuhn *et al.*, 2010)**

Zur Überexpression von YidC wurde das Plasmid pET-16b IM60 N-His<sub>10</sub> in *E. coli* C43 transformiert. Die Zellen wurden bis zu einer OD<sub>600nm</sub>= 0,5 in LB-Amp-Medium bei 37°C herangezogen und mit 1 mM IPTG induziert. Nach weiteren 3 h Schütteln wurden die Zellen geerntet. Die Zellen wurden für 10 min bei 5 000 *g* in einem JA10-Rotor abzentrifugiert, das Feuchtgewicht bestimmt und in 1 ml Puffer TSB (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 10% Glycerin, pH 8.0) pro Gramm Zellen auf Eis resuspendiert und eingefroren.

10 g der Zellen wurden durch zwei Durchgänge mit der French Pressure Cell Press bei 8 000 psi aufgeschlossen. Zur Verminderung der Proteaseaktivität wurde den Zellen der Protease Inhibitor Cocktail Set III von Calbiochem gemäß der Herstellerangaben zugegeben. Die Zellsuspension wurde bei 200 000 *g* (Rotor 50Ti) 50 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und bei 4°C aufbewahrt. Die Membranfraktion wurde in 20 ml eisgekühltem Extraktionspuffer (1% Fos-cholin12, 20 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 10% Glycerin, pH 8.0) aufgenommen und 30 min bei 4°C gerührt, um die Proteine zu solubilisieren. Die Membranproteine wurden zusätzlich im Dounce-Homogenisator solubilisiert. Nicht solubilisierbare Proteine und invertierte Membranvesikel wurden bei 250 000 *g* (Rotor 50Ti) pelletiert. Zum Überstand wurde so viel Puffer B hinzugegeben, dass die Imidazolendkonzentration 30 mM betrug. Nun wurde der Überstand zu 2 ml zuvor äquilibrierter Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose (Ni-NTA-Superflow, Qiagen) gegeben und 1 h unter Drehen im Kühlraum bei 4°C inkubiert. Für das Äquilibrieren wurden 4 ml Nickel-Matrix (1:1 in 98% Ethanol) zunächst zweimal mit 40 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> und danach mit 20 ml Puffer S (0,1% Fos-cholin12, 20 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 10% Glycerin, 30 mM Imidazol, pH 8.0) gewaschen. Man überführte die Agarose in eine Minisäule (BD Plastipak™, 5 ml, Becton Dickinson) und ließ die Suspension durchlaufen. Bei einer Tropfgeschwindigkeit von 1 ml/min wurde mit 25 ml Puffer A (0,2% Fos-cholin12, 20 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 10% Glycerin, 40 mM Imidazol, pH 8.0) zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine gewaschen. Anschließend wurde mit zunächst 3 ml 213 mM Imidazol (Puffer A:B 1:2) und dann mit 10 ml Puffer B (0,2% Fos-cholin12, 20 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 10% Glycerin, 300 mM Imidazol, pH 8.0) eluiert. Die Fraktionen, welche die höchste YidC-Konzentration enthielten, wurden gegen Dialysepuffer (0,2% Fos-cholin12, 20 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 10%

## Methoden

Glycerin, pH 8.0) über Nacht bei 4°C dialysiert, um das Imidazol zu entfernen. Anschließend wurden die Fraktionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### **3.17.2. Reinigung der Membraninsertase YidC mit Dodecylmaltosid (DDM) (Serek *et al.*, 2004, modifiziert)**

Zur Überexpression von YidC wurde das Plasmid pET-16b IM60 N-His<sub>10</sub> in *E. coli* C43 transformiert. Die Zellen wurden bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5 in LB-Amp-Medium bei 37°C herangezogen und mit 1 mM IPTG induziert. Nach weiteren 3 h Schütteln wurden die Zellen geerntet. Die Zellen wurden für 10 min bei 5 000 *g* in einem JA10-Rotor abzentrifugiert, das Feuchtgewicht bestimmt und in 1 ml Puffer TSB (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 10% Glycerin, pH 8.0) pro Gramm Zellen auf Eis resuspendiert und eingefroren.

10 g Zellen wurden bei 4°C aufgetaut und durch 2–3 Durchgänge bei 8 000 psi in der French-Press aufgeschlossen. Die Aktivität der Proteasen wurde durch die Zugabe von Protease Inhibitor Cocktail Set III (Calbiochem) laut der Angaben des Herstellers vermindert. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert für 50 min bei 200 000 *g* und 4°C (Rotor 50Ti). Das Pellet (Membranfraktion) wurde in 20 ml Extraktionspuffer (1% DDM, 20 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 10% Glycerin, pH 8.0) aufgenommen und durch mehrere Durchgänge im Dounce-Homogenisator solubilisiert. Nicht solubilisierete Proteine wurden bei 250 000 *g* für 20 min bei 4°C (Rotor 50Ti) pelletiert. Zu dem Überstand wurde Puffer B hinzupipettiert, so dass die Endkonzentration von Imidazol 30 mM betrug. Die Vorbereitung des Säulenmaterials erfolgte durch zweimaliges Waschen der 4 ml Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose (Ni-NTA-Superflow, Qiagen) mit 40 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, danach wurde die Nickelmatrix mit 20 ml Puffer S äquilibriert (0,1% DDM, 20 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 10% Glycerin, 10 mM Imidazol, pH 8.0). Der Überstand wurde mit 2 ml äquilibrierter Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose 1 h unter Drehen bei 4°C inkubiert. Anschließend überführte man die Agarose in eine Minisäule (BD Plastipak™, 5 ml, Becton Dickinson) und ließ das mit dem Überstand inkubierte Säulenmaterial durchlaufen. Die Säule wurde mit 25 ml Puffer A (0,2% DDM, 20 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 10% Glycerin, 40 mM Imidazol, pH 8.0) zur Entfernung der unspezifisch gebundenen Proteine gewaschen. Danach erfolgte der erste Elutionsschritt mit 3 ml 213 mM Imidazol (Puffer A:B 1:2). Die Elutionen wurden in 1 ml Fraktionen gesammelt. Die weiteren Elutionsschritte erfolgten mit 10 ml Puffer B (0,2% DDM, 20 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 10% Glycerin, 300 mM Imidazol, pH 8.0) und wurden in 2 ml Fraktionen gesammelt. Die relevanten Fraktionen wurden gegen einen 200-fachen Überschuss an Dialysepuffer (0,2% DDM, 20 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 10% Glycerin, pH 8.0) über Nacht bei 4°C dialysiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### 3.17.3. Reinigung der ATPase SecA (Roos, 2000)

Zur Überexpression von SecA wurde das Plasmid pZ52-SecA-N-His<sub>6</sub> (Karamanou *et al.*, 1999) in *E. coli* BL21 transformiert. Die Zellen wurden bis zu einer OD<sub>600nm</sub> = 0,5 in LB-Amp-Medium bei 37°C herangezogen und mit 0,5 mM IPTG induziert. Nach weiteren 2,5 h Schütteln wurden die Zellen geerntet. Die Zellen wurden für 10 min bei 5 000 *g* und 4°C zentrifugiert, das Feuchtgewicht bestimmt und in 1 ml Puffer TSB (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 10% Saccharose) pro Gramm Zellen auf Eis resuspendiert und eingefroren.

Sollte die Expressionsrate von SecA-N-His<sub>6</sub> niedrig sein, so kann der *E. coli*-Stamm BL21.19 verwendet werden, da in diesem Stamm die Aktivität der Protease ClpA reduziert ist (Mitchell & Oliver, 1993). Die Inkubationstemperatur während der Zellanzucht sollte dann auf 30°C reduziert werden.

10 g Zellen wurden bei 4°C aufgetaut. Der Zellaufschluss wurde durch vier Durchgänge an der French Press bei 8 000 psi durchgeführt. Zusätzlich wurde dem Zellaufschluss der Proteasehemmer PMSF bis zu einer Endkonzentration von 1 mM zugesetzt, um proteolytischen Abbau durch Serinproteasen zu verhindern. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert für 30 min bei 40 000 *g* und 4°C (Rotor JLA25.50) um die Zelltrümmer und Membranen zu entfernen. Die cytosolische Fraktion als Überstand wurde weiterverarbeitet. Dem Überstand wurde nun 5 mM Mercaptoethanol und 5 mM Imidazol zugegeben. Die 2 ml äquilibrierte Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose (Ni-NTA-Superflow, Qiagen) wurde mit dem Überstand beladen und für 2 h unter Drehen bei 4°C inkubiert. 4 ml Nickel-Matrix (1:1 in 98% Ethanol) wurde zuvor zweimal mit 40 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> und anschließend mit 20 ml Puffer B1 (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Imidazol, pH 8.0) gewaschen. Anschließend überführte man das inkubierte Säulenmaterial in eine Minisäule (BD Plastipak™, 5 ml, Becton Dickinson) und ließ den Überstand bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min durchlaufen. Die Säule wurde mit 25 ml Puffer B2 (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Imidazol, pH 8.0) zur Entfernung der unspezifisch gebundenen Proteine gewaschen. Danach erfolgte die Elution mit 10 ml (10 Fraktionen zu je ½ Säulenvolumen) 150 mM Imidazol in Puffer B3 (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM Imidazol, pH 8.0), während die Elutionen zu je 1 ml Fraktionen gesammelt wurden. Anschließend wurden die SecA-haltigen Fraktionen vereinigt und gegen Dialysepuffer (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Mercaptoethanol, pH 8.0) bei 4 °C über Nacht dialysiert. Die Protein enthaltenden und dialysierten Fraktionen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### 3.17.4. Reinigung der Translokase SecYEG (Collinson *et al.*, 2001, modifiziert)

Um den Proteinkomplex SecYEG nativ reinigen zu können, wurde das Plasmid pHis-EYG, welches den His<sub>6</sub>-tag am SecE trägt, in *E. coli* C43 (DE3) transformiert. Die Anzucht der Zellen und die Reinigung geschahen am selben Tag. Eine Vorkultur wurde in 50 ml LB-Medium mit 200 µg/ml Ampicillin bei 37°C über Nacht herangezogen und die 3 l 2xYT-Amp-Medium mit 4 ml pro l Medium beimpft. Die Zellen wurden bei 30°C über Nacht geschüttelt und direkt mit 1% Arabinose induziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen bei 10 000 *g* und 4°C sedimentiert und das Feuchtgewicht der Zellpellets bestimmt. Die Zellen wurden in 2 ml/g Zellen TSG-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 10% Glycerin, pH 8.0) resuspendiert und direkt für die Reinigung verwendet.

10 g Zellen wurden aufgeschlossen durch vier Durchgänge in der French Press bei 8 000 psi, proteolytischer Abbau wurde durch Zugabe des Serin-Proteasehemmers PMSF bis zu einer Endkonzentration von 1 mM verhindert, während die Zellen auf Eis gehalten wurden. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 90 min bei 142 000 *g*, 4°C (Rotor 60Ti) entfernt. Das Pellet wurde in 1,5 ml/g Zellen TSG-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 10% Glycerin, pH 8.0) aufgenommen und im Dounce-Homogenisator auf Eis resuspendiert. Erneut folgte eine Zentrifugation für 90 min bei 142 000 *g* und 4°C. Das Pellet wurde in 1,5 ml/g Zellen TSG1-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 1,25% n-Octyl-β-D-glucopyranosid, 300 mM NaCl, 10% Glycerin, pH 8.0) aufgenommen und im Dounce-Homogenisator solubilisiert. Zum vollständigen Solubilisieren wurde die Suspension für 15 min bei 4°C gerührt. Nicht solubilisierbare Membranproteine wurden durch eine Zentrifugation für 60 min bei 142 000 *g*, 4°C (Rotor 50Ti) abgetrennt. Die Suspension wurde im „batch-Verfahren“ für 1 h unter Drehen bei 4°C an 1 ml äquilibrierte Ni<sup>2+</sup>-Sephrose (Ni-Sephrose™ 6 Fast Flow, GE Healthcare) gebunden. 1 ml Ni<sup>2+</sup>-Sephrose (1:1 in 20% Ethanol) wurde zuvor zweimal mit 40 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> mit 20 ml TSG1-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 1,25% n-Octyl-β-D-glucopyranosid, 300 mM NaCl, 10% Glycerin, pH 8.0) gewaschen. Man überführte das Säulenmaterial in eine Minisäule (BD Plastipak™, 5 ml, Becton Dickinson), ließ die Suspension durchlaufen und wusch die Säule mit 30 ml TSG2-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 0,05% Dodecyl-β-D-maltosid, 300 mM NaCl, 10% Glycerin, 30 mM Imidazol, pH 8.0). Der Proteinkomplex wurde nun mit 20 ml TSG3-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 0,05% Dodecyl-β-D-maltosid, 300 mM NaCl, 10% Glycerin, 330 mM Imidazol, pH 8.0) in 1 ml Fraktionen eluiert. Die SecYEG-enthaltenden Fraktionen wurden für 2 h bei RT gegen einen 200-fachen Überschuss an TSG4-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 0,05% Dodecyl-β-D-maltosid, 300 mM NaCl, 10% Glycerin, pH 8.0) dialysiert, anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### **3.17.5. Reinigung von M13 procoat H5, Procoat H5-M13C, M13 procoat H5EE, Procoat H5EE-M13C (Kuhn *et al.*, 2010)**

#### **M13 procoat H5**

Hierbei handelt es sich um eine Mutante von M13 procoat, die nicht prozessiert wird. An der Aminosäure mit der Position -3 befindet sich ein Austausch von Serin nach Phenylalanin (Kuhn & Wickner, 1985a), der bewirkt, dass das Protein mit geringer Effizienz von der Leaderpeptidase zu seiner maturen Form prozessiert wird. Das Protein mit der H5-Mutation zeigt ein wild-typisches Translokationsverhalten (Soekarjo *et al.*, 1996). Da das Protein zusätzlich einen 6-fachen C-terminalen His-tag trägt, ist sein Molekulargewicht 8,5 kDa.

#### **Procoat H5-M13C**

Dieses Protein trägt dieselbe Mutation wie M13 procoat H5, hat aber zusätzlich einen Austausch von Serin nach Cystein an der Position +13 im maturen Bereich des periplasmatischen Loops. Das Cystein ermöglicht die Markierung des Proteins mit einem Fluoreszenzfarbstoff. Das Molekulargewicht beträgt 8,5 kDa.

#### **M13 procoat H5EE**

Hierbei handelt es sich um eine Mutante von M13 procoat H5, sie besitzt eine Insertion von 2 zusätzlichen Glutaminsäureresten hinter der Position +2, somit ist die Nettoladung des Loops -5 (Roos *et al.*, 2001). Der Membraneinbau des Proteins ist vom Membranpotential (Cao *et al.*, 1995) und YidC, sowie von SecA und SecY abhängig (Baud *et al.*, 2005). Das Molekulargewicht beträgt 8,7 kDa.

#### **Procoat H5EE-M13C**

Dieses Protein trägt die Mutationen des M13 procoat H5EE, besitzt aber des Weiteren einen Austausch von Ser13 gegen Cys, so dass eine Fluoreszenzmarkierung durchgeführt werden kann. Das Molekulargewicht beträgt 8,7 kDa.

### **Reinigung der M13 procoat-Proteine (Kuhn *et al.*, 2010)**

Um die C-terminal mit 6 Histidinen modifizierten M13 procoat-Proteine (pJQ H5 C-His<sub>6</sub>, pJQ H5-M13C C-His<sub>6</sub>, pJQ H5EE C-His<sub>6</sub>, pJQ H5EE-M13C C-His<sub>6</sub>) über zu exprimieren, wurden diese in *E. coli* HB101 transformiert. Dann wurden die Zellen in 5 l LB-Amp-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bei 37°C geschüttelt, mit 0,5 mM IPTG induziert und für 2,5 h weiter geschüttelt. Die Zellen wurden bei 5 000 g (JA10 Rotor) geerntet und in 1 ml Puffer Z (50 mM Tris/HCl pH 7,6, 10%

## Methoden

Saccharose) pro Gramm Feuchtgewicht auf Eis resuspendiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

10 g Zellen wurden auf Eis aufgetaut und durch vier Durchgänge mit der French Pressure Cell bei 8 000 psi aufgeschlossen. Um den Zellaufschluss zu verbessern, wurde der Suspension BugBaster® Master Mix (Novagen) gemäß der Herstellerangaben zugegeben. Zur Verminderung der Aktivität der Serinproteasen wurde der Zellsuspension vor jedem Arbeitsschritt PMSF bis zu einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. Die aufgeschlossenen Zellen wurden bei 40 000 *g* für 30 min bei 4°C (JA20-Rotor) zentrifugiert, das Pellet in 40 ml Puffer T (10 mM Triethanolamin, 10% Glycerin, pH 7.5) auf Eis resuspendiert und im Dounce-Homogenisator homogenisiert. Daraufhin erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 40 000 *g* für 30 min und 4°C. Das Pellet, welches die Membranfraktion enthielt, wurde in 20 ml Puffer S (20 mM Tris/HCl pH 7.9, 500 mM NaCl, 1% Lauroylsarcosin, 10% Glycerin, pH 7.9) aufgenommen und zum vollständigen Solubilisieren zunächst für 30 min bei 4°C gerührt und dann mit dem Dounce-Homogenisator solubilisiert. Nicht solubilisierte Proteine wurden bei 250 000 *g* 20 min bei 4 °C (Rotor 50Ti) pelletiert, der Überstand zu 2 ml zuvor äquilibrierter Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose (Ni-NTA-Superflow, Qiagen) gegeben und für 1 h bei 4°C gedreht („batch-Verfahren“). Zum Äquilibrieren wurden 4 ml Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose (1:1 in 98% Ethanol) zuerst 2 x mit 40 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gewaschen und mit dann 20 ml Puffer A (20 mM Tris/HCl pH 7.9, 500 mM NaCl, 1% Lauroylsarcosin, pH 7.9) inkubiert. Während der Bindungsphase der His-tag-markierten Proteine an die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Matrix musste die Leersäule (Amicon, ø 1,5 cm), sowie die Äkta vorbereitet werden (siehe Abschnitt Verwendung der Äkta). Die Leersäule wurde wie folgt zusammengebaut. Die kleinen Siebchen wurden zuvor in ca. 50 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> 3 x 10 s im Ultraschallbad gereinigt. Die Siebchen wurden an der Säule befestigt, dabei musste die grüne Schraube offen bleiben, damit genügend Platz für die Suspension vorhanden war. Nun wurde die eine Seite festgedreht, indem die große schwarze, dann die kleine schwarze und anschließend die grüne Schraube, fixiert wurden. Die Leersäule wurde in den Metallständer gehängt, so dass sie gerade ausgerichtet war. Man überführte die Protein-Ni<sup>2+</sup>-NTA-Suspension in die Leersäule, ließ diese durchlaufen und schloss die Säule an die Äkta an. Erläuterungen hierzu in „Verwendung der Äkta“ (siehe 3.15). Die Äkta musste zuvor gründlich gespült werden. Die Säule wurde zunächst mit 25 ml Puffer A (20 mM Tris/HCl pH 7.9, 500 mM NaCl, 1% Lauroylsarcosin, pH 7.9), dann mit 25 ml Puffer A (20 mM Tris/HCl pH 7.9, 500 mM NaCl, 1% Lauroylsarcosin, pH 7.9) mit 5 mM Imidazol (1% Puffer B (20 mM Tris/HCl pH 7.9, 500 mM NaCl, 1% Lauroylsarcosin, 500 mM Imidazol, pH 7.9)) bei einer Tropfgeschwindigkeit von 1 ml/min gewaschen. Dann mit 10 ml 100 mM und 200 mM Imidazol (20% und 40% Puffer B) und danach mit 20 ml 500 mM Imidazol (100% Puffer B) eluiert und die Fraktionen zu je 2 ml gesammelt. Die Protein enthaltenden Fraktionen wurden über Nacht bei 4°C gegen 200-fachen Überschuss an Dialysepuffer (20 mM Tris/HCl pH 7.9, 1%

## Methoden

Lauroylsarcosin) mithilfe der D-Tube™ Dialyzer Maxi von Novagen (MWCO 3,5 kDa) dialysiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### 3.17.6. Reinigung von M13 procoat H5-0PC (Baud *et al.*, 2005, modifiziert)

Hierbei handelt es sich um eine Mutante von M13 procoat, die die H5-Mutation trägt mit 6-fachem C-terminalen His-tag, sowie dem Austausch Serin gegen Phenylalanin an der Position -3 und einen neutralen periplasmatischen Bügel zwischen den Transmembranbereichen 1 und 2 (AS AQGNN). Es wurde ein Austausch von Glutamat nach Glutamin an der Position +2 und Austausch von Aspartat nach Asparagin an den Positionen +4 und +5 vorgenommen (E2Q, D4N, D5N), weshalb der Loop keine Nettoladung trägt. Der Membraneinbau des Proteins benötigt YidC und ist vom Membranpotential unabhängig (Cao *et al.*, 1995; Samuelson *et al.*, 2001). Das Molekulargewicht beträgt ca. 8,8 kDa.

Die Reinigung von M13 procoat H5-0PC erfolgte mit einigen Modifikationen nach Baud *et al.*, 2005. Um das Protein M13 procoat H5-0PC reinigen zu können, wurde das Plasmid pJQ H5 AQGNN C-His<sub>6</sub> zunächst in *E. coli* HB101 transformiert. Die Zellen wurden bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5 bei 37°C geschüttelt, mit 0,5 mM IPTG induziert und für weitere 2,5 h bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden auf Eis gestellt und durch Zentrifugation bei 5 000 *g* für 15 min bei 4°C geerntet. Das Gewicht der Zellpellets wurde bestimmt und in 3 ml Puffer Z (50 mM Tris/HCl, pH 7.6, 10% Saccharose, 1 mM PMSF) pro *g* Zellen resuspendiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

10 *g* Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit so viel Lysozym versetzt, dass die Endkonzentration 0,5 mg/ml betrug und für 45 min bei 4°C leicht gerührt. Es wurden zusätzlich 0,2 mg/ml DNaseII, sowie 5 mM MgCl<sub>2</sub> zugegeben. Zur Verminderung der Serinproteaseaktivität wurde der Zellsuspension vor jedem Arbeitsschritt PMSF bis zu einer Endkonzentration von 1 mM zugefügt. Der Ansatz wurde für 10 min bei 20°C leicht gerührt und dann mit 30 ml Denaturierungspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7.9, 500 mM NaCl, 8 M Urea, pH 7.9) für 15 min bei 4°C inkubiert. Die Suspension wurde mit dem Dounce-Homogenisator solubilisiert und für 30 min bei 40 000 *g* bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 ml Resuspensionspuffer (20 mM Tris/HCl pH 7.9, 10% Saccharose, 1 mM PMSF, pH 7.9) aufgenommen und für 10 min mit Ultraschall bei einem 50 Sekunden-Intervall und 4°C behandelt. Anschließend wurde der Ansatz für 30 min bei 40 000 *g* und 4°C zentrifugiert, das Pellet in 50 ml Puffer 1 (10 mM Triethanolamin, 10% Glycerin, pH 7.5) aufgenommen und für 30 min bei 40 000 *g* und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde nun in 50 ml Solubilisierungspuffer (20 mM Tris/HCl pH 7.9, 10% Glycerin, 500 mM NaCl, 6 M Urea, 1% Lauroylsarcosin, pH 7.9) resuspendiert, für 15 min



## Methoden

bei 4°C inkubiert und dann für 30 min bei 40 000 *g* und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde für 1,5 h mit Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose (Ni-NTA-Superflow, Qiagen) bei 4°C unter Drehen inkubiert. Dafür wurden 4 ml Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose (1:1 in 98% Ethanol) zunächst 2 x mit 40 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gewaschen und dann mit 30 ml Äquilibriumspuffer (20 mM Tris/HCl pH 7.9, 10% Glycerin, 500 mM NaCl, 6 M Urea, 1% Lauroylsarcosin, 5 mM Imidazol, pH 7.9) äquilibriert. Man überführte den Ansatz in eine Minisäule (BD Plastipak™, 5 ml, Becton Dickinson) und ließ die Suspension 2 x durch diese laufen. Nun wurde die Säule mit 5 Säulenvolumen (10 ml) Waschpuffer 1 (20 mM Tris/HCl pH 7.9, 10% Glycerin, 500 mM NaCl, 6 M Urea, 0,5% Lauroylsarcosin, 5 mM Imidazol, pH 7.9) und dann mit 5 Säulenvolumen (10 ml) Waschpuffer 2 (20 mM Tris/HCl pH 7.9, 10% Glycerin, 500 mM NaCl, 0,5% Lauroylsarcosin, 5 mM Imidazol, pH 7.9) gewaschen. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschrift mit 10 Säulenvolumen (20 ml) Waschpuffer 3 (20 mM Tris/HCl pH 7.9, 10% Glycerin, 0,5% Lauroylsarcosin, 15 mM Imidazol, pH 7.9). Daraufhin wurde mit 4 ml Elutionspuffer (20 mM Tris/HCl pH 7.9, 10% Glycerin, 0,5% Lauroylsarcosin, 300 mM Imidazol, pH 7.9) eluiert und das Eluat zu je 500 µl Fraktionen gesammelt. Fraktionen mit dem meisten Protein wurden gepoolt, in einem D-Tube™ Dialyzer Maxi von Novagen (MWCO 3,5 kDa) gegen 200 ml Dialysepuffer (20 mM Tris/HCl pH 7.9, 6 M Urea, pH 7.9) für 1 h bei RT dialysiert. Der Puffer wurde gegen 800 ml frischen Dialysepuffer gewechselt und abermals über Nacht bei RT dialysiert. Die Protein enthaltenden Fraktionen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### 3.17.8. Reinigung von pro828coat und pro80coat (Roos, 2000)

#### **Pro828coat**

Bei dem Protein pro828coat handelt es sich um ein Hybridprotein aus M13 procoat H5 mit OmpA. Es besitzt eine Insertion von 174 Aminosäuren, der Aminosäuren +67 bis +240 der OmpA-Sequenz, die zwischen der Position -1 und +1 von M13 procoat eingefügt wurde (Kuhn, 1988). Das Protein wird mit der Hilfe von SecY, SecA (Kuhn, 1988) und YidC (Samuelson *et al.*, 2001) in die Membran inseriert. Das Plasmid pET22 H5-OmpA C-His<sub>6</sub> besitzt ein Ampicillin-Resistenz, einen sechsfachen His-tag am C-Terminus, sowie die H5-Mutation. Der Membran-einbau des Proteins ist abhängig von SecA und SecY (Roos *et al.*, 2001). Das theoretische Molekulargewicht beträgt 26,5 kDa.

#### **Pro80coat**

Es handelt sich hierbei um ein Hybridprotein aus M13 procoat H5 mit 80 Aminosäureresten der OmpA-Sequenz (+67 bis +76, sowie +171 bis +240), ausgehend von pro828coat bei dem ein

## Methoden

großer Teil der OmpA-Sequenz mittig deletiert wurde (Roos *et al.*, 2001). Es besitzt in der zentralen Region eine Nettoladung von -1, die H5-Mutation, eine Ampicillin-Resistenz und zusätzlich einen His-tag am C-Terminus. Pro80coat inseriert in die Membran Sec-abhängig (Kuhn *et al.*, 1990). Das theoretische Molekulargewicht beträgt 16,1 kDa.

Zur Überexpression des Hybridproteins pro80coat wurde das Plasmid pQN  $\Delta$ 80 C-His<sub>6</sub> in *E. coli* HB101 transformiert, für pro828coat erfolgte die Transformation von pET22 H5-OmpA C-His<sub>6</sub> in *E. coli* HB101. Die Zellen wurden bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,7 bei 37°C geschüttelt, mit 0,5% Arabinose induziert und für weitere 2,5 h bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden durch eine Zentrifugation bei 5 000 *g* für 15 min und 4°C geerntet und das Gewicht der Zellpellets bestimmt. Die Pellets wurden in 1 ml Puffer Z (50 mM Tris/HCl pH 8.0) pro g Zellen aufgenommen, zu 10 g Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

10 g Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Die Zellen wurden zum Zellaufschluss mit BugBaster® Master Mix (Novagen) gemäß den Herstellerangaben versetzt und für 30 min auf Eis gerührt. Nun wurden 2 ml pro g Zellpellet Puffer U (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 M NaCl, 8 M Urea, 2 mM DTT) zugegeben, sowie 1 mM PMSF. Das Solubilisieren erfolgte mittels des Dounce-Homogenisators. Zelltrümmer wurden bei 32 000 *g* für 30 min und 4°C im JA20-Rotor abgetrennt. 2 ml Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose (1:1 in 98% Ethanol) wurde 2 x mit 40 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gewaschen und mit 20 ml Puffer U äquilibriert. Der Überstand wurde mit 1 ml Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose (Ni-NTA-Superflow, Qiagen) für 2 h unter Drehen bei RT inkubiert, anschließend überführte man die Suspension in eine Minisäule (BD Plastipak™, 5 ml, Becton Dickinson) und ließ diese 2 x durchlaufen. Während der Behandlung mit Urea konnte das Säulenmaterial mehrmals die Farbe wechseln, dies hatte aber auf den Reinigungserfolg keine negative Auswirkung. Nun wurde mit 20 Säulenvolumen (20 ml) Puffer U (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 M NaCl, 8 M Urea, 2 mM DTT) und dann mit weiteren 4 Säulenvolumen (4 ml) Puffer U1 (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 M NaCl, 8 M Urea, 2 mM DTT, 50 mM Imidazol, pH 8.0) gewaschen. Schließlich wurde mit 3 Säulenvolumen (3 ml) Puffer U2 (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 M NaCl, 8 M Urea, 2 mM DTT, 150 mM Imidazol, pH 8.0) eluiert und zu je 1 ml Fraktionen gesammelt. Die Protein enthaltenden Fraktionen wurden für 2 h bei RT gegen Dialysepuffer (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 8 M Urea, 2 mM DTT) dialysiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### 3.17.9. Reinigung von PClep (Serek, 2005)

Hierbei handelt es sich um ein Hybridprotein aus M13 procoat H5 mit Teilen der Leaderpeptidase. Es besitzt am C-Terminus nach der Position +49 eine 103 AS lange Sequenz der Leaderpeptidase beginnend mit dem Aminosäurerest 221 Isoleucin bis zur Aminosäure 323,

## Methoden

welche sich 52 bp vor dem STOP-Codon befindet (Kuhn *et al.*, 1986b). Der Membraneinbau *in vivo* des Proteins ist YidC- (Samuelson *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2003) und membranpotentialabhängig (Cao *et al.*, 1995), sowie unabhängig von SecYEG (Kuhn *et al.*, 1987; Chen *et al.*, 2005). Das theoretische Molekulargewicht beträgt 18,4 kDa.

Um das C-terminal mit 6 Histidinen modifizierte Hybridprotein PClep aus M13 procoat H5 und Teilen der Sequenz der Leaderpeptidase über zu exprimieren, wurde das Plasmid pMS H5-Lep C-His<sub>6</sub> in *E. coli* C41 transformiert. Die Zellen wurden in 5 l LB-Amp-Medium bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,6 bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden dann in den Schüttler bei 10°C gestellt und 5 min geschüttelt, bis die Zellen abgekühlt waren. Dann wurden sie mit 0,5 mM IPTG induziert und für 6 h oder über Nacht bei 10°C geschüttelt. Die Zellen wurden bei 5 000 g (JA10 Rotor) für 15 min geerntet und in 1 ml Puffer Z (50 mM Tris/HCl pH 7.6, 10% Saccharose) pro Gramm Feuchtgewicht auf Eis resuspendiert und eingefroren.

10 g Zellen wurden auf Eis aufgetaut und wie folgt aufgeschlossen. Die Zellen wurden mit BugBaster® Master Mix (Novagen) und Protease Inhibitor Cocktail Set III (Calbiochem) gemäß der Angaben des Herstellers versetzt und für 1 h bei 4 °C gerührt. Die aufgeschlossenen Zellen wurden bei 40 000 g für 30 min bei 4°C (Rotor JA20) abzentrifugiert und das Pellet in 40 ml Puffer T (10 mM Triethanolamin, 10% Glycerin, pH 7.5) auf Eis resuspendiert. Die Membranproteine wurden mittels des Dounce-Homogenisators solubilisiert und die Suspension erneut wie oben zentrifugiert. Das Pellet, welches die Membranfraktion enthielt, wurde in 20 ml Puffer S (20 mM Tris/HCl pH 7.9, 500 mM NaCl, 1% Lauroylsarcosin, 10% Glycerin, pH 7.9) aufgenommen und erneut im Dounce-Homogenisator homogenisiert. Zum vollständigen Solubilisieren wurde die Membranfraktion evtl. bei 4°C für 30 min gerührt. Nicht solubilisierbare Proteine wurden bei 250 000 g 20 min bei 4 °C (Rotor 50Ti) pelletiert, der Überstand wurde zu 2 ml zuvor äquilibrierter Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose (Ni-NTA-Superflow, Qiagen) gegeben und für 1 h bei 4°C gedreht. Für das Äquilibrieren wurden 4 ml Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose (1:1 in 98% Ethanol) 2 x mit 40 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gewaschen und mit 20 ml Puffer A (20 mM Tris/HCl pH 7.9, 500 mM NaCl, 1% Lauroylsarcosin, pH 7.9) inkubiert. Während der Bindungsphase der His-tag-markierten Proteine an die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Matrix musste die Leersäule (Amicon, ø 1,5 cm), sowie die Äkta vorbereitet werden. Die Leersäule wurde wie folgt zusammengebaut. Die kleinen Siebchen wurden zuvor in ca. 50 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> 3 x 10 s im Ultraschallbad gereinigt. Die Siebchen wurden an der Säule befestigt, dabei musste die grüne Schraube offen bleiben, damit genügend Platz für die Suspension vorhanden war. Nun wurde die eine Seite festgedreht, indem die große schwarze, dann die kleine schwarze und anschließend die grüne Schraube, fixiert wurden. Die Leersäule wurde in den Metallständer gehängt, so dass sie gerade ausgerichtet war. Erläuterungen hierzu in „Verwendung der Äkta“ (siehe 3.15). Man überführte die Suspension in eine Leersäule, ließ

## Methoden

die Protein-Ni<sup>2+</sup>-NTA-Suspension durchlaufen und schloss die Säule an die Äkta an. Die Säule wurde nun mit 25 ml Puffer A, dann mit 25 ml Puffer A mit 5 mM Imidazol (1%Puffer B (20 mM Tris/HCl pH 7.9, 500 mM NaCl, 1% Lauroylsarcosin, 500 mM Imidazol, pH 7.9)) bei einer Tropfgeschwindigkeit von 1 ml/min gewaschen. Anschließend wurde mit 10 ml 100 mM und 200 mM Imidazol (20% und 40% Puffer B) und danach mit 20 ml 500 mM Imidazol (100% Puffer B) eluiert und zu je 2 ml Fraktionen gesammelt. Die Protein enthaltenden Fraktionen wurden gegen einen 200-fachen Überschuss an Dialysepuffer (20 mM Tris/HCl pH 7.9, 1% Lauroylsarcosin, pH 7.9) über Nacht bei 4°C dialysiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### 3.17.10. Reinigung von proOmpA (Roos, 2000)

Zur Überexpression von proOmpA wurde das Plasmid pTYE009-proOmpA-C-His<sub>6</sub> in *E. coli* TYE056 transformiert. Die Zellen wurden bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,6 in LB-Amp-Medium bei 30°C herangezogen und mit 0,3 mM IPTG induziert. Nach weiteren 3 h Schütteln bei 37°C wurden die Zellen geerntet. Durch die temperatursensitive Mutation im *secY*-Gen (*secY24<sup>ts</sup>*) wurde erreicht, dass bei der erhöhten Temperatur von 37°C der SecYEG-Komplex instabil wurde, was die verminderte Prozessierung von proOmpA und den anderen Präproteinen nach sich zog. Die Zellen wurden für 10 min bei 5 000 *g* und 4°C zentrifugiert, das Feuchtwicht bestimmt und in 1 ml Puffer Z (20 mM Tris/HCl pH 8.0) pro Gramm Zellen auf Eis resuspendiert und eingefroren.

10 g Zellen wurden bei 4°C aufgetaut und aufgeschlossen durch vier Durchgänge an der French Press bei einem Druck von 8 000 psi. Zusätzlich wurde dem Zellaufschluss der Proteasehemmer PMSF bis zu einer Endkonzentration von 1 mM zugesetzt, um proteolytischen Abbau zu verhindern. Der Zellsuspension wurde 2 ml pro g Zellpellet Puffer U (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 M NaCl, 8 M Urea, 2 mM DTT, pH 8.0) zugegeben und die Zellen im Dounce-Homogenisator lysiert. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert für 30 min bei 32 000 *g* und 4°C (Rotor JLA25.50), um die Zelltrümmer und Membranfragmente zu entfernen. Die cytosolische Fraktion als Überstand wurde weiterverwendet. Der Überstand wurde nun zu 1 ml mit Puffer U (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 M NaCl, 8 M Urea, 2 mM DTT, pH 8.0) äquilibrierter Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose (Ni-NTA-Superflow, Qiagen) gegeben und im „batch-Verfahren“ für 1 h unter Drehen inkubiert. Anschließend überführte man das inkubierte Säulenmaterial in eine Minisäule (BD Plastipak™, 5 ml, Becton Dickinson) und ließ den Überstand mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min durchlaufen. Die Säule wurde mit 20 ml Puffer U (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 M NaCl, 8 M Urea, 2 mM DTT, pH 8.0) zur Entfernung von unspezifisch gebundenen Proteinen gewaschen. Daraufhin

## Methoden

erfolgte ein weiterer Waschschrift mit 4 ml Puffer U1 (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 M NaCl, 8 M Urea, 2 mM DTT, 50 mM Imidazol, pH 8.0). Danach erfolgte die Elution mit 3 ml Puffer U2 (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 M NaCl, 8 M Urea, 2 mM DTT, 150 mM Imidazol, pH 8.0), während die Elutionen zu je 1 ml Fraktionen gesammelt wurden. Die proOmpA-enthaltenden Fraktionen wurden für 2 h bei RT gegen 200-fachen Überschuss an Puffer U3 (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 8 M Urea, 2 mM DTT, pH 8.0) dialysiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### 3.18. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentration von gereinigten Proteinen kann mit verschiedenen Methoden bestimmt werden. Substanzen wie Imidazol und große Mengen an Detergenz müssen hierfür durch Dialyse entfernt werden.

#### 3.18.1. Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)

Das Reaktionsprinzip beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums einer Acid Blue-Lösung in Phosphorsäure durch die Absorption des Farbstoffs an Protein. Die verwendete Acid Blue-Lösung in Phosphorsäure wird im folgenden Abschnitt als Bradford-Farbreagenz (Bio Rad Protein Assay Farbreagenz) bezeichnet. Bei der Bindung des in dem Bradford-Reagenz vorhandenen Coomassie Brilliant Blau G-250 an die basischen Seitenketten des Proteins verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nm ohne Protein nach 595 nm mit Protein. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm kann somit als Maß für die Proteinkonzentration der Lösung angesehen und zur quantitativen Bestimmung herangezogen werden.

Standardlösungen aus Rinderserumalbumin (englisch: **h**ovine **s**erum **a**lbumine, BSA) wurden in folgenden Konzentrationen hergestellt: 100, 150, 250, 400, 500 und 750 µg/ml und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Für jede zu bestimmende Probe wurden zwei Ansätze vorbereitet und 735 µl Bradford-Reagenz in jedes Eppendorfgefäß pipettiert. Für die Standardwerte wurden 15 µl der Standardproteinlösungen hinzugefügt, so dass die Endkonzentration bei 2, 3, 5, 8, 10 und 15 µg/ml lag. Für den Nullwert der Eichgerade wurden 15 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> zu dem Reagenz gegeben. Nun wurden 1-15 µl Probe zu den Probengefäßen gefügt und mit x µl Puffer (je nach eingesetzter Probenmenge) auf 15 µl Endvolumen aufgefüllt. Eine leichte Blaufärbung sollte auftreten. Für den Probenleerwert wurden 15 µl des Puffers gemessen, in dem das Protein gereinigt vorlag, um Beeinträchtigungen durch den Puffer bzw. das Detergenz abziehen zu können. Nach einer Inkubation von 5 min pro Probe wurde die OD bei 595 nm gemessen. Dann wurde anhand der Eichgerade der Proteingehalt der Proben ermittelt.

### 3.18.2. Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure-Test

Unter alkalischen Bedingungen vermögen Proteine  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$  zu reduzieren, diese Reaktion wird auch als Biuretreaktion bezeichnet. Die Reduktion wird hierbei durch die Peptidbindung und durch die Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan oder Cystein ausgelöst. Es bildet sich mithilfe der Bicinchoninsäure (englisch: **b**icinchoninic **a**cid, BCA) ein stabiler Chelatkomplex mit den Kupferionen, wodurch eine violette Farbreaktion auftritt. Die Absorption dieses Komplexes ist bei 562 nm proportional zur Proteinkonzentration.

Zunächst wurden Standardlösungen aus Rinderserumalbumin (BSA) mit den Konzentrationen 5, 25, 50, 125, 250, 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  hergestellt. Das BCA-Reagenz (Pierce) wurde in ausreichender Menge im Verhältnis 50:1 von Reagenz A:Reagenz B verdünnt. Nun wurden 0,05 ml Standard oder zu analysierende Proben in Eppendorfgefäßen vorbereitet und mit 1 ml des verdünnten BCA-Reagenz versetzt. Ein Nullwert wurde mit dem jeweiligen Puffer analog hergestellt. Nun wurden die Ansätze für 30 min auf 60°C erhitzt und anschließend für 10 min bei RT inkubiert. Diese Inkubationszeit sollte nicht verlängert werden, da die Farbreaktion stetig weiter läuft und die OD-Werte dadurch verfälscht werden könnten. Die Absorption wurde bei 562 nm gegen  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  gemessen, die Standard-Eichgerade erstellt und die Proteinkonzentration mittels der Geradengleichung ermittelt.

### 3.18.3. Bestimmung der Proteinkonzentration durch SDS-PAGE

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration kann auch die SDS-PAGE genutzt werden. Diese Methode ermöglicht die Berücksichtigung des Reinheitsgrades der Proteinelution, da nur die jeweilige Bande analysiert werden kann. Dafür wurden verschiedene Mengen des gereinigten Proteins auf ein SDS-Gel aufgetragen. Um die Konzentration der zu analysierenden, gereinigten Proteine ermitteln zu können, wurden zusätzlich Proteine auf das Gel aufgetragen, deren Konzentrationen bekannt waren. Das Standardprotein musste hierbei ein ähnliches Molekulargewicht haben, wie das zu untersuchende Protein, um ein ähnliches Laufverhalten im Gel zu erzielen. Für Proteine mit einer Größe von ca. 60 kDa (YidC) wurde das Protein BSA auf ein 12% SDS-Gel aufgetragen, für das Proteine SecA wurde Phosphorylase B als Referenz verwendet. Für kleine Proteine (M13 procoat-Proteine) wurde Insulin auf ein Tricin-SDS-Gel geladen. Die Hybridproteine aus M13 procoat und OmpA pro80coat und M13 procoat und Lep PClep, sowie SecE und SecG wurden mit Lysozym verglichen, das Protein aus M13 procoat und OmpA pro828coat mit Trypsin-Inhibitor, während proOmpA zusammen mit Carbonic Anhydrase auf ein Gel geladen wurde. Die Banden wurden dann nach vollendeter Coomassie- (größere Proteine) bzw. Silberfärbung (kleine Proteine) mittels des Kodak Imagers und der entsprechenden Software quantifiziert und die Konzentration bestimmt.

### 3.19. Herstellung von invertierten Cytoplasmamembranvesikeln (INV)

Invertierte Innenmembranvesikel (englisch: inverted **inner** membrane **vesicles**, INV) besitzen eine umgekehrte Orientierung im Vergleich zur Innenmembran von Bakterienzellen. In den INV befindet sich die periplasmatische Membranseite im Inneren des Vesikels, während die cytoplasmatische Seite nach außen gerichtet ist (Müller & Blobel, 1984a). Die Vesikel werden aus *E. coli* generiert und beinhalten Membranproteine der Cytoplasmamembran wie zum Beispiel SecYEG, YidC und Leaderpeptidase, sowie membranassoziiertes SecA. Somit können INV zur Untersuchung der Proteintranslokation über und in die innere Membran von *E. coli* studiert werden.

4 l LB-Phosphatmedium (10 g Hefeextrakt, 10 g Bactotrypton, 0,25% Glucose, 4,15 mM  $K_2HPO_4$ , 1 mM  $KH_2PO_4$ ) wurden mit Glucose angesetzt und mit einer *E. coli* MRE600 oder BL21 Übernachtskultur 1:50 angeimpft. Die Zellen wurden bei 37°C bis zu einer  $OD_{600}$  von 1,6 bis 1,8 herangezogen und die Kultur unter Schütteln 5 min auf Eis herunter gekühlt. Daraufhin wurden die Zellen bei 9 950 *g* für 10 min und 4°C (Rotor JA10) geerntet. Die Zellpellets wurden gewogen und in 1 ml Puffer A (250 mM Saccharose, 50 mM HEPES pH 7.5, 1 mM EDTA pH 7.0, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF) pro g Feuchtgewicht resuspendiert. Danach erfolgte der Zellaufschluss mit 2 Durchgängen in der French Press bei 8 000 psi. Die Zelltrümmer wurden zentrifugiert bei 7 740 *g* für 10 min bei 4°C (Rotor JA20) und der klare Überstand vorsichtig mit einer Pasteurpipette abnommen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 150 000 *g* für 2 h bei 4°C (Rotor 50Ti). Während der Zentrifugation wurde der Saccharosegradient gegossen. Dies erfolgte mithilfe einer speziellen Glasspritze und SW28 UZ-Röhrchen (dünnwandige 60Ti-Röhrchen). Die unterschiedlichen Saccharosegradienten wurden übereinander geschichtet, beginnend mit der leichtesten Lösung, dann wurde die jeweils nächst schwerere mit einer langen Kanüle unterschichtet: 12 ml 770 mM, 12 ml 1 440 mM und 10 ml 2 020 mM Saccharose in Puffer A. Die Grenzschichten wurden dünn mit Filzstift an der Röhrchenwand markiert, die Gradienten mit Parafilm abgedeckt für 1 h im Kühlraum inkubiert. Nach Beendigung der Zentrifugation wurde der Überstand abpipettiert und die Pellets in insgesamt 1–2 ml Puffer A (250 mM Saccharose, 50 mM HEPES pH 7.5, 1 mM EDTA pH 7.0, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF) resuspendiert. Danach wurden die Suspensionen sorgfältig mit einem Dounce-Homogenisator homogenisiert und jeweils ca. 1 ml der Membransuspension auf den Saccharosegradienten aufgetragen. Nun erfolgte eine Gradienten-Zentrifugation bei 65 000 *g* über Nacht (mindestens 16 h) und 4° (Rotor SW28) in einem Ausschwingrotor. Die Membranfraktion wurde mit einer langen Kanüle von oben entnommen, sie war als gelb-braune, transparente Bande an der Grenzschicht von 1 440 mM zu 2 020 mM Saccharose zu erkennen. Die Membranen wurden mit 50 mM HEPES-Puffer pH 7.5 auf ca. 250 mM Saccharose verdünnt. Die Membranvesikel wurden bei 200 000 *g* für 2 h und 4°C

## Methoden

(Rotor 60Ti) sedimentiert und dann der Überstand mit einer Pasteurpipette abgenommen und verworfen. Die Pellets wurden in ca. 1ml INV-Puffer (250 mM Saccharose, 50 mM HEPES pH 7.5, 1 mM DTT) mit einem Dounce-Homogenisator homogenisiert und die Absorption der Membransuspension (1:500 in 2% SDS verdünnt) bei 280 nm (UV-Bereich) gegen 2% SDS bestimmt. Der Wert sollte so ca. bei 0,08–0,12 liegen. Die INV wurden in flüssigem Stickstoff schock gefroren und bei – 80°C gelagert.

### 3.20. Lipidextraktion aus *E. coli*

20 g (4 l) *E. coli* MRE600 wurden auf Eis aufgetaut (1 ml pro g Zellpellet) und mit Na-Phosphatpuffer (28,85 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 21,15 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.0) durch eine Zentrifugation bei 3 020 g für 10 min, 4°C (Rotor JA20) gewaschen. Das Pellet wurde in Na-Phosphatpuffer (28,85 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 21,15 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.0) aufgenommen und erneut bei 3 020 g für 10 min, 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in Na-Phosphatpuffer resuspendiert und die Zellen mit einer Spatelspitze DNaseII, 5 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,1 mM PMSF versetzt. Nun folgte der Zellaufschluss mit 3 Durchgängen in der French Press bei 8 000 psi. Die Suspension wurde bei 3 020 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert und das Pellet verworfen. Nun folgten mehrere Zentrifugationsschritte, wobei jeweils der Überstand weiterverwendet und das Pellet verworfen wurde. Zunächst bei 3 020 g für 10 min und 4°C, dann zweimal bei 39 200 g für je 20 min und 4°C und schließlich bei 100 000 g für 70 min bei 4°C (Rotor 60Ti). Abschließend wurde das Pellet in kleinem Volumen (5–6 ml) in Puffer L (20 mM Tris/HCl pH 8.0) resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schock gefroren und bei – 80°C gelagert. Anschließend folgte die Ames Extraktion (siehe 3.21).

### 3.21. Ames Extraktion für Phospholipide

Alle Schritte wurden in einem dunklen Labor unter Grünlicht mit ausreichend Stickstoffflaschen durchführt. Mit dieser Methode konnten Proteinreste bzw. Verunreinigungen entfernt werden. Auch Lipide, die schon in wässriger Lösung vorlagen, konnten erneut in eine organische Phase zurückgeführt werden, um sie in veränderter Form zu trocknen und hinterher resuspendieren zu können.

Die Zellen wurden in 2 g/ml Puffer L (20 mM Tris/HCl pH 8.0) aufgenommen oder ggf. auf Eis aufgetaut. Das Gesamtvolumen der Zellen wurde bestimmt, um die nachfolgenden Volumina bestimmen zu können. Die Lösungsmittel Dichlormethan (DCM) und Methanol (MeOH) wurden zu einem 3,6-fachen Volumen der Lipide im Verhältnis 1:2 von DCM:MeOH in einer Duranflasche gemischt. Die Zellsuspension wurde in einen Erlenmeyerkolben oder eine Flasche mit Schliff



## Methoden

gegeben und das Lösungsmittel zugefügt. Die Suspension wurde in einem Dounce-Homogenisator 5–6 mal homogenisiert (evtl. auf Eis) und für 30 min bei RT für kleine Volumina und für 45 min bei RT für größere inkubiert. Je 1,8 vol H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> bzw. DCM wurden zugegeben und kräftig geschüttelt. Eine weitere Inkubation für 10 min bei RT für kleine Volumina und für 1 h bei RT für große folgte. Nun wurde für 30 min bei 1 940 *g* und 4 °C zentrifugiert (Rotor JA20 in den passenden Teflon-Röhrchen) und die obere H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>-MeOH-Phase mit löslichen Proteinen und Zellbestandteilen, die mittlere weiße, trübe Zwischenschicht aus degradierten Proteinen und die untere Phase aus MeOH und DCM mit Lipiden detektiert. Die untere Phase enthielt die im Lösungsmittel gelösten Lipide, diese wurde nun vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt (durch die obere Schicht und am Rand der weißen Phase vorbeistechen). Die restliche wässrige Phase wurde zurück in den Erlenmeyerkolben geben und erneut je 1,8 vol H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> bzw. DCM zugeben. Nun wurden die obigen Schritte wiederholt bis insgesamt 3 Durchgänge absolviert waren.

### **3.22. Acetonfällung zur Reinigung von bis zu 100 mg Lipiden (Kuhn *et al.*, 2010)**

Der *E. coli* Gesamtextrakt besteht zu 57,5% aus Phosphatidylethanolamin (PE), zu 15,1% aus Phosphatidylglycerol (PG) und zu 9,8% aus Cardiolipin (CL), zusätzlich beinhaltet dieser Lipidextrakt 17,6% andere Bestandteile. Im Gegensatz zum *E. coli* Gesamtextrakt besteht der *E. coli* Polarextrakt zu 67% aus PE, zu 23,2% aus PG und zu 9,8% CL. Um den *E. coli* Polarextrakt zu erhalten, wurde der *E. coli* Gesamtextrakt bei der Herstellung bei Avanti Polar Lipids Inc. mit Aceton gefällt und mit Diethylether extrahiert. Es handelt sich bei beiden Produkten um einen Extrakt aus *E. coli* B, welcher in Kornberg-Minimalmedium bei 37°C herangezogen und dann während  $\frac{3}{4}$  der Logwachstumsphase geerntet wurde. Das Lipidpulver wird in Borosilikatglasampullen unter Stickstoffatmosphäre versiegelt. Der Polarextrakt kann direkt verwendet werden, während der Gesamtextrakt aufgrund der unbekannteren weiteren Bestandteile durch eine Acetonfällung gereinigt werden musste.

Die Lipide sollten keinem weißen Licht und besonders keinem Sauerstoff ausgesetzt werden! Die Kolben und Gefäße wurden hierfür mit Alufolie umwickelt und mit Stickstoff begast.

Die Lipidampulle des *E. coli* Gesamtextraktes wurde vorsichtig geöffnet, indem der Glashals abgebrochen wurde. Dabei sollte nicht mit Stickstoff begast werden, da der Inhalt aus feinem Pulver besteht. Nun wurde mit einer Pasteurpipette 1 ml DCM oder Chloroform zugegeben und das Lipidpulver vollständig gelöst. Während aller kommenden Vorgänge wurde ständig mit Stickstoff begast und im Dunkel unter Grünlicht gearbeitet. Das Lösungsmittel wurde in der

## Methoden

Pasteurpipette mehrmals rauf- und runtergesaugt, damit diese gesättigt war und die Flüssigkeit nicht mehr auslaufen konnte, sonst bestand die Gefahr, dass das Lösungsmittel unkontrollierbar aus der Pipette spritzte. Nun wurden zum besseren Lösen aller im Extrakt enthaltenen Bestandteile ein paar Tropfen Methanol zu der Lipidlösung gegeben. Die Lösung wurde in einen Spitzkolben (50 ml) überführt und die Ampulle mit einem weiteren ml DCM oder Chloroform nachgespült. Ein 10-facher Überschuss an eiskaltem Aceton wurde zugegeben, damit die Lipide gefällt wurden. Hierfür folgte eine Inkubation für 2 h bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Die Probe wurde in zwei Zentrifugenröhrchen (teflonbeschichtet, somit Aceton- bzw. DCM-beständig) überführt. Diese Röhrchen mussten bis zum Hals befüllt werden. Nun wurde für 30 min bei  $5\ 140\ g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert (Beckman Model J2-21), der Überstand abgekippt und das Pellet in je 1 ml DCM gelöst. Erneut wurde ein 10-facher Überschuss (10 ml) an Aceton zugegeben und für 2 h bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Daraufhin wurde wiederum für 30 min bei  $5\ 140\ g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Pellet in je 1 ml DCM gelöst. Die Lipidlösung wurde in einen Rundkolben überführt und am Rotationsverdampfer für 20 min bei RT getrocknet bis alles Lösungsmittel entfernt war und ein gleichmäßiger Lipidfilm an der Kolbenwand entstand. Der Rundkolben wurde mit einem Stopfen und Parafilm verschlossen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **3.23. Lipide mit Diacylglycerin (Kuhn *et al.*, 2010; Stiegler *et al.*, 2011)**

Diacylglycerin (DAG) besteht aus einem Glycerinmolekül, an das zwei Fettsäuren variabler Länge und Struktur an den C-Atomen 1 (meist gesättigt) und 2 (meist ungesättigt) angehängt werden (siehe Abb17). DAG ist ein Vorläufer von Triacylglycerin (Triglyceriden). Die Synthese beginnt mit Glycerin-3-Phosphat, welches ein Produkt der Glykolyse ist. Zwei Fettsäuremoleküle werden an Glycerol-3-Phosphat angehängt, um Phosphatidsäure zu erhalten. Phosphatidsäure wird dann dephosphoryliert, um Diacylglycerin zu bilden. Es bewirkt, dass die Membran dichter wird und kein spontaner Einbau von kleinen Proteinen erfolgt. In *E. coli* kommt es bis zu  $\sim 1,3\%$  in der Innenmembran vor (Raetz & Newman, 1978; Rotering & Raetz, 1983). Diacylglycerin ist ein „second messenger signaling lipid“ (Botenstoff), das durch das membrangebundene Enzym Phospholipase C zusammen mit Inositoltrisphosphat hergestellt wird. Obwohl Inositoltrisphosphat ins Cytosol diffundiert, bleibt Diacylglycerin in der Nähe der Plasmamembran, aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften. DAG vermag Enzyme zur Membran zu geleiten und diese in ihr zu verankern. Zusätzlich aktiviert es die Proteinkinase C, die für die Signaltransduktion von großer Bedeutung ist. Die Cytoplasmamembran von *E. coli* besteht aus verschiedenen Lipiden, zu diesen gehört das Phosphatidylethanolamin mit einer Konzentration von ca. 75%, ca. 20% besteht aus Phosphatidylglycerin und ca. 5% Cardiolipin.

## Methoden

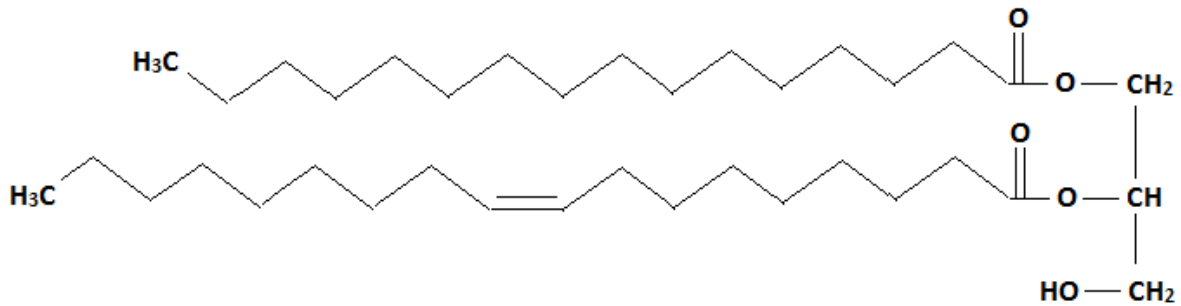


Abb17. **Diacylglycerin hergestellt aus Ei-Phosphatidylcholin von „Lipid Products“**

Dieses Beispiel zeigt das Diacylglycerin mit den Fettsäuren Palmitinsäure und Ölsäure. Es können aber jeweils die anderen Acylketten mit der unten stehend angegebenen Konzentration vorkommen.

### In Diacylglycerin von Lipid Products enthaltene Acylketten in Prozent, isoliert aus EggPC:

16:0	32,1%	Palmitinsäure (16 C, 31 H, 1 O)	MG: 239 g/mol
16:1 (9)	2,1%	Palmitoleinsäure (16 C, 29 H, 1 O)	MG: 237 g/mol
18:0	11,7%	Stearinsäure (18 C, 35 H, 1 O)	MG: 267 g/mol
18:1 (9)	36,2%	Ölsäure (18 C, 33 H, 1 O)	MG: 265 g/mol
18:2 (9,12)	12,5%	Linolsäure (18 C, 31 H, 1 O)	MG: 263 g/mol
20:4 (5,8,11,14)	5,5%	Arachidonsäure (20 C, 31 H, 1 O)	MG: 287 g/mol

Das Diacylglycerin von Lipid Products hat ein durchschnittliches Molekulargewicht von 605,05 g/mol.

Die gewünschten Lipide wurden in Chloroform ( $\text{CHCl}_3$ ) gelöst und das DAG in der erforderlichen Konzentration zugegeben. Das DAG war in Chloroform zu einer Konzentration von 20 mg/ml in einer Flasche mit Septum gelöst und konnte mit einer Glasspritze mit lösungsmittelbeständiger Metallkanüle (mit Chloroform äquilibrieren) pipettiert werden. Da die DAG-Lösung eine Konzentration von 20 mg/ml hatte, ergab sich eine Menge von 35  $\mu\text{l}$  DAG-Lösung pro 1% Endkonzentration an DAG in 100 mg des gewünschten Lipidextraktes. Bei der Bestimmung der DAG-Menge musste der Lipidverlust nach der Acetonfällung berücksichtigt werden (siehe 4.11). Für die Zugabe von DAG wurden zunächst ca. 50  $\mu\text{l}$  Chloroform in die Spritze aufgezogen, so dass sich die geringen Mengen besser pipettieren ließen und nicht sofort verdampfen konnten. Beim Einstechen in das Septum musste der Stempel der Spritze gut fixiert werden, da sonst Luft aus der Flasche in die Spritze gelangen konnte. Das DAG wurde nun vorsichtig in der gewünschten Menge in die Spritze gezogen und direkt in den Glasrundkolben mit der Lipidlösung gespritzt, so

## Methoden

dass keine Reste an die Wand gelangen konnten. Nun wurden die beiden Flüssigkeiten gut gemischt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei 50 mbar für 20 min bei RT entfernt bis ein gleichmäßiger Lipidfilm an der Glaswand entstand. Anschließend wurde der Lipidfilm an der Vacuumpumpe getrocknet (siehe 3.24).

### **3.24. Trocknen der Lipide (Kuhn *et al.*, 2010)**

Der Rundkolben mit dem Lipidfilm wurde gründlich mit Stickstoff begast und an die Vacuumpumpe angeschlossen. Hierfür musste zunächst die Pumpe vorgekühlt werden. Der Glaskolben mit dem Lipidfilm wurde an die Vacuumpumpe angeschlossen und für mindestens 6 h bei einem Druck von  $\leq 7 \times 10^{-2}$  bar getrocknet. Anschließend wurde der Lipidfilm in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  gelöst, so dass die gewünschte Konzentration (eine Konzentration von 20 mg Lipid/ml war sehr praktikabel) angenommen wurde. Ein Volumen von 100 mg Lipiden sollte nicht überschritten werden, da genügend Raum für den Lipidfilm an der Glaswand des Kolbens vorhanden sein sollte, ggf. das Volumen des Glaskolbens anpassen. Zunächst wurden 2 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  oder Puffer zugegeben und der Glaskolben sorgfältig mit Stickstoff begast. Nun wurden 2 kleine Glaskugeln in den Kolben gegeben und auf Eis geschwenkt, da die Lipidsuspension sonst eine gelartige Konsistenz annehmen konnte und die Lipide dabei ihren Aggregatzustand veränderten. Die Lipidsuspension wurde anschließend in ein detergenzfreies, stickstoffbefülltes Gefäß mithilfe einer Pasteurpipette überführt und der Kolben erneut mit 3 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  versetzt, geschwenkt bis kein sichtbarer Lipidfilm mehr zu erkennen war und die milchigen Flüssigkeiten in dem Gefäß vereint. Die Lipidsuspension wurde in speziellen Eppendorfhütchen mit Schraubdeckel (Mikroröhre 1,5 ml mit Verschluss, Sarstedt) zu je 100  $\mu\text{l}$  (für in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  resuspendierte MLV und 200  $\mu\text{l}$  für in Puffer) Fraktionen aliquotiert, mit Stickstoff begast, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $80^\circ\text{C}$  gelagert. Vor dem Gebrauch mussten die in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  resuspendierten multilamellaren Vesikel 1:1 in doppelt konzentriertem Puffer aufgenommen und kurz gevortext werden. Eine schematische Darstellung der Herstellung von unilamellaren Vesikeln ist in Abb. 11 dargestellt.

### **3.25. Phosphatbestimmung (Ames, 1966)**

Mithilfe der Phosphatbestimmung kann die Konzentration der multilamellaren Vesikel bestimmt werden. Jedes Phospholipid enthält einen Phosphatrest, Cardiolipin enthält zwei, welche dann mittels einer Farbreaktion photometrisch sichtbar gemacht werden können. Somit kann die Konzentration an Lipiden in der Probe ermittelt werden. Abhängig von der Lipidzusammensetzung variieren die Molekulargewichte der Lipide, dies ist bei der Berechnung zu

## Methoden

berücksichtigen. Alle verwendeten Glaswaren mußten vor Gebrauch über Nacht in 2 M Salzsäure (HCl) eingelegt werden, um eventuelle Detergenzrückstand zu entfernen. Anschließend wurden diese gründlich mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gespült und getrocknet. Aus denselben Gründen wurden während der gesamten Versuchsdurchführung Handschuhe getragen und die Lösungen mit autoklaviertem H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> direkt aus der Milliporeanlage hergestellt. Es wurden ausreichend hitzebeständige und phosphatfreie Reagenzgläser, sowie Glasmurmeln vorbereitet. Für das Erstellen der Eichgerade wurden Phosphatstandards mit Konzentrationen von 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 und 70 nMol benötigt, dafür wurde eine 1 mM Stammlösung aus K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> hergestellt. Die zu analysierenden Liposomen wurden vor dem Verwenden für 2 x 10 s im Ultraschallbad homogenisiert, um eine gleichmäßige Verteilung der Vesikel zu erreichen. Das Volumen der Ansätze sollte 100 µl nicht überschreiten. Nun wurden 10 µl der Liposomen auf den Boden des Glasröhrchens pipettiert und 300 µl der Lösung 1 (3,33% Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 10% Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O in 98% EtOH) direkt in den Liposomentropfen gegeben. Die Flüssigkeit wurde über dem Bunsenbrenner verdampft bis ein weißer Niederschlag entstand. Die dabei freiwerdenden braunen Dämpfe sollten nicht eingeatmet werden, weshalb dieser Schritt unter dem Abzug durchgeführt wurde. Die Reagenzgläser mussten zunächst vor dem Fortfahren abkühlen. Nun wurden 300 µl 500 N HCl zugegeben und die Reagenzgläser mit Murmeln verschlossen, damit die Flüssigkeit nicht verdampfen konnte. Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei 100°C. Nach dem Abkühlen wurden 700 µl eines Gemisches aus 1 vol Ascorbinsäure und 6 vol Ammoniummolybdat in die Reagenzgläser pipettiert und bei 45°C für 20 min erhitzt. Für das Erstellen des Gemisches wurden zuvor Stammlösungen von 10% Ascorbinsäure und 0,42% Ammoniummolybdat x 4 H<sub>2</sub>O in 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hergestellt. Während der Inkubation bei 42°C verfärbten sich die Proben blau und konnten nun bei einer Wellenlänge von 820 nm gemessen werden. Mithilfe der OD<sub>820nm</sub>-Werte des Phosphatstandards konnte eine Eichgerade erstellt werden, aus der dann die Konzentration der Lipide, genauer deren Phosphatreste, ermittelt werden konnte.

$$\frac{\text{Absorption der Probe}}{\text{Steigung der Geraden}} = \text{nmol [Phosphat der Probe]}$$

$$\frac{\text{nmol [Phosphat]}}{10 \text{ (10 } \mu\text{l Liposomen)}} = \frac{\text{nmol [Phosphat der Probe]}}{\mu\text{l}}$$

$$\frac{\text{nmol [Phosphat]}}{\mu\text{l}} = \text{nmol [Lipid]}$$

1,1

$$\frac{\text{nmol [Lipid]} \times \text{MG [Lipide]}}{1000} = \text{Lipid in mg/ml}$$

Berechnung der Lipidkonzentration

### 3.26. Dünnschichtchromatographie (Kuhn *et al.*, 2010)

Die Dünnschichtchromatographie (DC) ermöglicht die Analyse der Bestandteile in Lipid-extrakten oder -mischungen. Es können Lipidmoleküle, Proteine und andere Substanzen nachgewiesen und somit die Reinheit der Materialien überprüft werden.

Die Dünnschichtchromatographieplatten (Silicagel 60 F<sub>254</sub>) mussten für mindestens 4 h bei 100°C getrocknet werden. Die folgenden Schritte wurden unter einem Abzug durchgeführt, um das Einatmen von Lösungsmittel zu reduzieren. Die Glaskammer wurde mit frisch hergestelltem Laufmittel (70% CHCl<sub>3</sub>, 25% MeOH, 5% H<sub>2</sub>O<sub>ad</sub>) für 1 h bei RT äquilibriert. Hierfür wurde ein Whatmann 3 mm Chromatographiepapier nach den Ausmaßen der Kammer vorgeschnitten und in der Kammer in das Laufmittel gestellt. Die zu analysierenden Lipidproben wurden zu einer ungefähren Konzentration von 1-10 µg Lipid in Chloroform gelöst und vorsichtig mithilfe einer Glaskapillare (Sodaklarglas) auf die Silicaplatte aufgetropft ohne deren Beschichtung zu beschädigen. Die Glasplatten wurden kurz bei RT getrocknet und in die Chromatographiekammer gestellt. Wenn die Lauffront bis ca. 2 cm unterhalb des Plattenendes vorangeschritten war (spätestens nach 1 h) wurde die Chromatographie beendet. Die Platte wurde vorsichtig aus der Kammer entnommen und eventuell sichtbare Lipidspuren markiert. Nach 10-minütiger Trocknungsphase unter dem Abzug wurde die Platte in eine mit elementarem Iod äquilibrierte zweite Kammer gestellt und für mindestens 30 min bei RT inkubiert. Die Iodatmosphäre bewirkte das Sichtbarmachen von Lipidbestandteilen in den Proben. Die sichtbaren gelb bis bräunlichen Spuren wurden vorsichtig mit einem Bleistift markiert. Die Iodspuren wurden entfernt, indem die Platte über Nacht bei RT unter dem Abzug gelagert wurde, ggf. konnte dieser Schritt durch die Verwendung einer Heißluftpistole beschleunigt werden. Nach dem vollständigen Entfernen der Iodspuren wurde die Platte mit einer Ninhydrinlösung (0,2% Ninhydrin, 0,5% Essigsäure, 96% Aceton) sorgfältig und gleichmäßig besprüht, um eventuell vorhandene Proteine sichtbar zu machen. Das Ninhydrin färbt spezifisch Aminogruppen und bildet das „Ruhemann'sche Purpur“ (Ruhemann, 1911). Die Detektion von Aminosäuren in Gemischen ist sehr sensitiv und weist selbst kleinste Mengen nach. Das Phospholipid Phosphatidylethanolamin (PE) ist ebenfalls mit dieser Methode nachweisbar und konnte somit eindeutig von den anderen Lipidbestandteilen unterschieden werden. Die Platte wurde hierfür nach dem Besprühen kurz bei RT getrocknet und anschließend für 45 min bei 100° C erhitzt. Die purpurnen Proteinspuren wurden markiert und die Platte abfotografiert. Die Silicaplatte konnte abgedeckt bei RT gelagert werden.

### 3.27. Herstellung von unilamellaren Vesikeln mit der Extrudermethode (Kuhn *et al.*, 2010; Stiegler *et al.*, 2011)

Multilamellare Vesikel sind für die Analyse von Translokationsprozessen eher ungeeignet, da nur die äußerste Schicht der Lipidmembranen untersucht werden kann, deshalb werden Vesikel in unilamellarer Form benötigt. Hierfür hat sich die Extrudermethode als sehr praktikabel erwiesen, da sie für die Vesikel im Gegensatz zum Ultraschall sehr schonend ist. Die Apparatur (siehe Abb18) ist mit zwei Filterpapieren, sowie einer Polycarbonatmembran mit definierter Porengröße (400 nm) versehen. Der erforderliche Druck wird durch die beiden Hamilton-Spritzen erreicht, die die Lipidsuspension durch die Membran drücken.

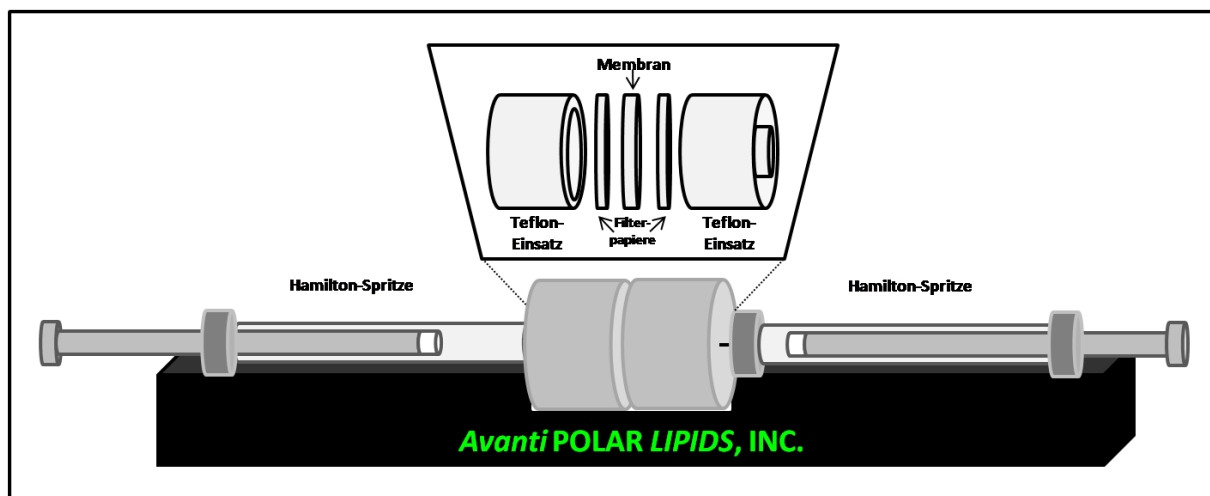


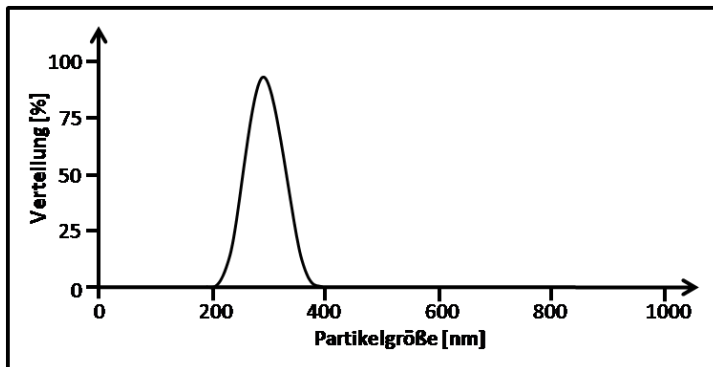
Abb18. Schematische Darstellung des Extruders von Avanti Lipids, Inc.

Die Lipidsuspension wird mittels der beiden Hamilton-Spritzen durch das System mehrfach hin- und hergedrückt. Die Polycarbonatmembran in Mitten der Teflon-Einsätze hat eine gegebene Porengröße und ist umgeben von zwei Filterpapieren. Durch den vorgegebenen Durchmesser der Membran besitzen die Lipidvesikel eine definierte Größe.

Die in  $H_2O_{dd}$  resuspendierten multilamellaren Vesikel (20 mg/ml) wurden zuvor 1:1 mit doppelt konzentriertem Puffer N (20 mM HEPES, 200 mM  $Na_2SO_4$ , pH 8.0) verdünnt, kurz gevortext und in eine der beiden Hamilton-Spritzen des Extruders gezogen. Liposomen, die in Puffer resuspendiert wurden, konnten unverdünnt verwendet werden. Für die Herstellung von Proteoliposomen konnte eventuell vor dem Extrudieren das Protein zugegeben werden, dies ist aber nicht für alle Proteine möglich (vergleiche Abb20 und Abb21). Die Suspension wurde 15 x zwischen den Spritzen hin- und hergedrückt, wobei durch das Passieren der Polycarbonatmembran große unilamellare Vesikel (LUV) mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 250–350 nm entstanden (siehe Abb19). Die Größe der (Proteo) Liposomen wurde mittels Photonenkorrelationsspektroskopie im Sub Micron Particle Analyzer bestimmt. Hierfür wurden 990  $\mu$ l Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM  $Na_2SO_4$ , pH 8.0) mit 10  $\mu$ l der Liposomensuspension versetzt und die Größe in einer Glasküvette gemessen. Nach Gebrauch wurde der Extruder in seine Einzelteile zerlegt, mit Isopropanol gereinigt und hinterher sorgfältig mit  $H_2O_{dd}$  gespült.

## Methoden

Die Gauss'sche Verteilung der Partikelgröße der großen unilamellaren Vesikel (LUV) ist in Abb19 zu sehen.



**Abb19. Durchschnittliche Liposomengröße der Partikelgrößenbestimmung**

Der mittlere Durchmesser der (Proteo-) Liposomen betrug 250-350 nm durch die Polycarbonatmembran des Extruders mit der Porengröße 400 nm.

### 3.28. Rekonstitution von Membranproteinen in Proteoliposomen

Membranproteine können funktionstüchtig in künstliche Membransysteme eingebaut werden, dies nennt man Rekonstitution (Eytan, 1982). Das in Detergenz gereinigte Protein kann mit unterschiedlichen Methoden in Lipidvesikel rekonstituiert werden.

#### 3.28.1. Rekonstitution von Membranproteinen mithilfe des Extruders (Kuhn *et al.*, 2010)

Die multilamellaren Vesikel wurden wie in Abschnitt „Extrudermethode“ (siehe 3.27.) beschrieben hergestellt. Vor dem Extrudieren wurde der Vesikelsuspension gereinigtes YidC-Protein bis zu einem molaren Verhältnis von 1:25 000 von YidC-Molekül:Lipid-Molekül zugegeben (siehe Abb20). Dieses Verhältnis entspricht ca. 25 Molekülen YidC pro Liposom und ist für die Insertion von Pf3 coat am effizientesten (Serek *et al.*, 2004). Ein durchschnittliches Liposom mit der Größe 250 nm besitzt ca. 650 000 Lipidmoleküle, bei einer Oberfläche von ca. 200 000 nm<sup>2</sup> und einer Lipiddichte von 6,5 Molekülen pro nm<sup>2</sup> (Eisenhower *et al.*, 2001). Das gereinigte YidC-Protein hatte durchschnittlich eine Konzentration von 3 mg/ml, während die Lipide eine Konzentration von ca. 10 mg/ml aufwiesen. Für die Rekonstitution von YidC in Liposomen wurden für das Extrudieren 200 µl (10,6 mM für *E. coli* Gesamtextrakt bei einer Konzentration von 10 mg Lipid/ml und einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 941 g/Mol) Lipidsuspension mit 1,7 µl (50 µM bei einer Konzentration von 3 mg Protein/ml bei einem Molekulargewicht von 60 000 g/Mol) gereinigtem YidC-Protein versetzt, wodurch ein Verhältnis von 1 Molekül YidC zu 25 000 Lipid-Molekülen erzielt werden konnte. Für jeden Ansatz wurden 200 µg Lipide verwendet, dabei musste die Konzentration der LUV nach der



## Methoden

Extrusion mittels Phosphatbestimmung ermittelt werden, da kleine Lipidmengen an der Polycarbonatmembran zurückbleiben konnten.

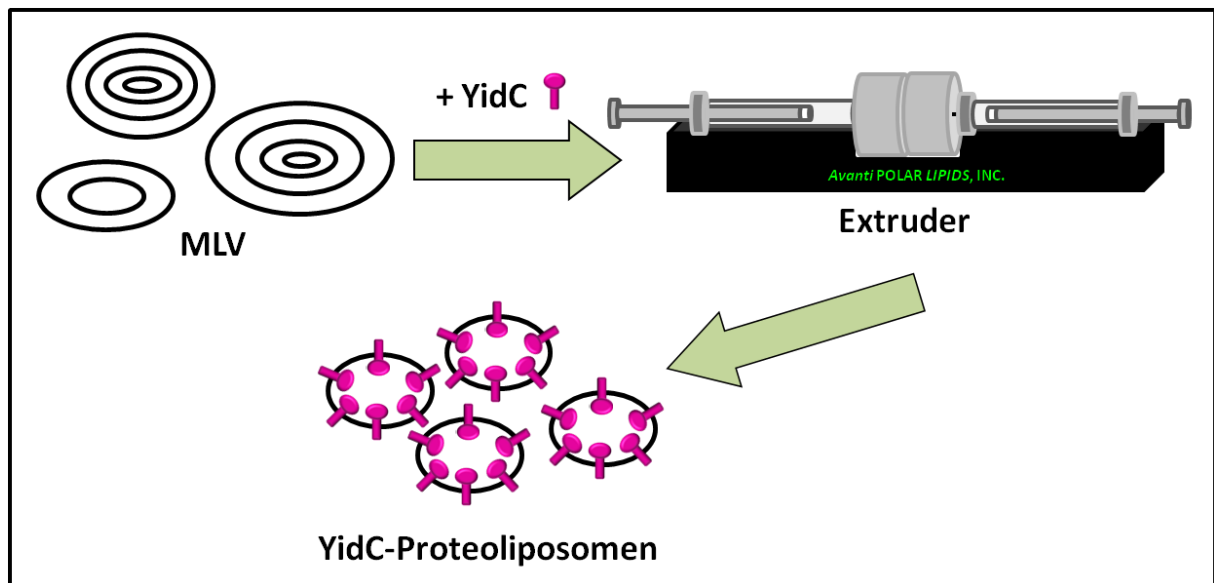


Abb20. **Rekonstitution mittels der Extrudermethode**

Den multilamellaren Vesikeln wurde das gereinigte Protein YidC zugegeben, anschließend erfolgte die Extrusion durch die Polycarbonatmembran. Es entstanden unilamellare Vesikel mit rekonstituiertem YidC-Protein.

### 3.28.2.. Rekonstitution von Membranproteinen mithilfe von Bio Beads

Für die Rekonstitution von gereinigten Proteinen in Liposomen mithilfe von Bio Beads (siehe Abb21) wurden die unilamellaren Vesikel zunächst gemäß Abschnitt „Extrudermethode“ (siehe 3.27.) hergestellt. Man inkubierte die unilamellaren Vesikel mit dem entsprechenden Detergenz (bezüglich der cmc 10-facher Überschuss an n-Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid), wodurch sie in ihrer Größe zunahmen. Anschließend gab man das gewünschte Protein in gereinigter Form zu (SecYEG oder YidC), welches sich spontan in die Membran einlagerte. Mithilfe der Bio Beads SM-2 der Firma Bio Rad konnte das Detergenz entfernt werden. Es handelt sich hierbei um Harzkügelchen (poröse Polystyrolpolymere), die durch hydrophobe Wechselwirkungen die Detergenzmoleküle aus der Flüssigkeit entfernen. Die Zugabe darf nur in einem bestimmten Konzentrationsverhältnis erfolgen, da die Harzkügelchen ebenfalls Membranproteine, sowie Lipidmoleküle aufgrund ihrer Hydrophobizität binden können.

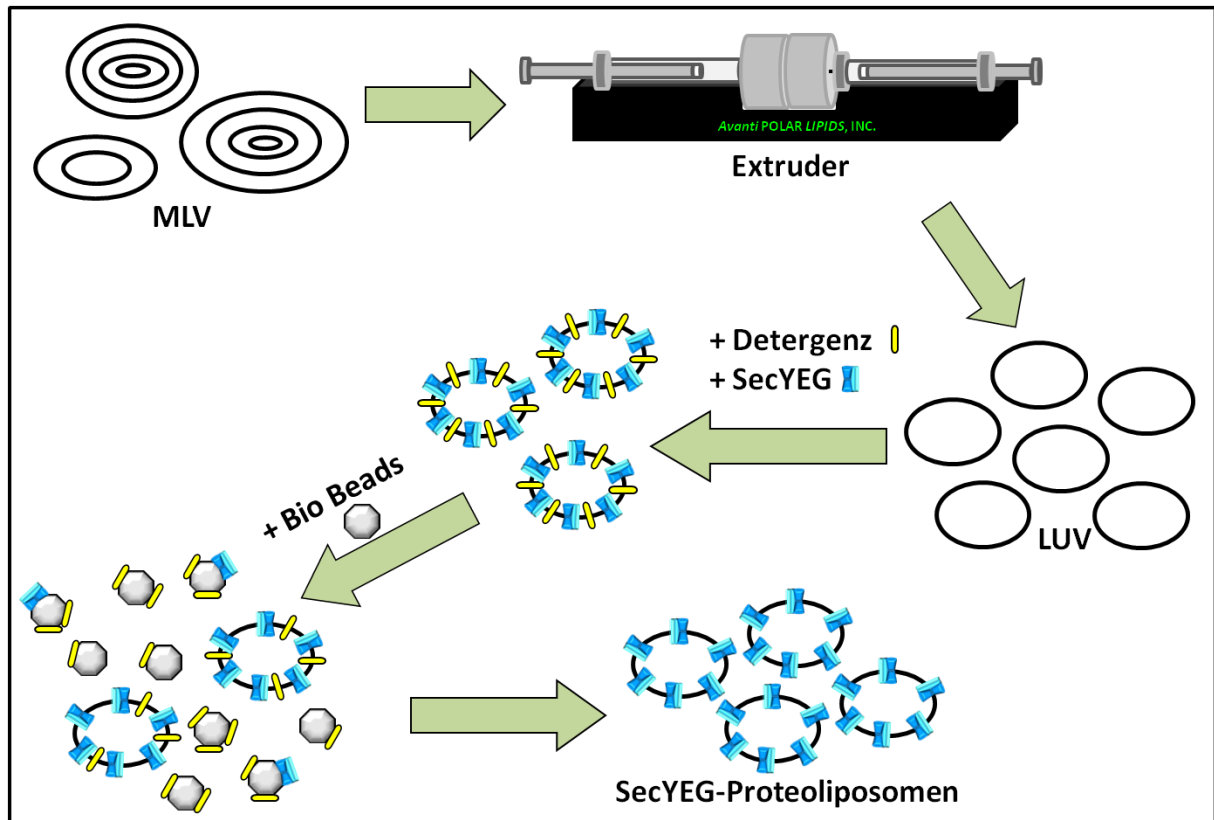


Abb21. **Rekonstitution mittels Bio Beads**

Die multilamellaren Vesikel wurden extrudiert. Zu den unilamellaren Vesikeln wurden 0,08% DDM zugegeben und unter Drehen bei RT inkubiert. Durch die Zugabe von gereinigtem SecYEG oder YidC konnten die Proteine unter Drehen bei 4°C rekonstituiert werden. Anschließend wurden Bio Beads zugegeben und mehrere Stunden bei 4°C gedreht.

350 µl der in Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0) extrudierten Liposomen wurden mit 0,08% Dodecylmaltosid (cmc: 0,008%) versetzt und für 2 h unter Drehen bei RT inkubiert. Das gereinigte YidC-Protein wurde im molaren Verhältnis von 1:25 000 (50 µM YidC auf 10,6 mM Lipid) zu den entsprechenden Liposomen hinzugegeben und für 1 h bei 4°C gedreht. Die gereinigten SecYEG-Proteine wurden zu den Liposomen gegeben, so dass das molare Verhältnis von Protein zu Lipid bei 1:8 000 lag und ebenfalls für 1 h auf dem Drehrad bei 4°C rekonstituiert. Hierfür wurden 20 µl gereinigtes SecYEG-Protein (13 µM bei einer Konzentration von 1 mg/ml und einem Molekulargewicht von 75 000 g/Mol) auf 200 µl Lipid (10,6 mM *E. coli* Gesamtextrakt bei einer Konzentration von 10 mg/ml und Molekulargewicht von durchschnittlich 941 g/Mol) verwendet. Anschließend wurden Bio Beads gemäß der angegebenen Kapazität (100 mg/ml Bio Beads) zugegeben. Diese wurden zuvor mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> im Ultraschallbad hydriert und mit Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0) äquilibriert. Nach 3-stündigem Drehen bei 4°C wurden die Harzkügelchen erneuert und über Nacht weitergedreht. Nach dem vollständigen Entfernen der Bio Beads waren die Proteoliposomen zur Analyse bereit und konnten vorsichtig abgenommen werden. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass keine Bio Beads in die Pipette gesaugt werden. Die parallele Herstellung der Liposomen wurde ohne die Zugabe von

gereinigtem Protein durchgeführt. Anschließend wurden die (Proteo) Liposomen durch Floaten auf einem Saccharosekissen gerettet (siehe 3.28).

### 3.29. Floaten von (Proteo-) Liposomen

Der Erfolg der Rekonstitution konnte mithilfe einer Zentrifugation auf einem Saccharosegradienten überprüft werden (siehe Abb22). Dafür wurden 1 ml TLA120.2-Röhrchen mit 200  $\mu$ l 60% Saccharose befüllt und die Front markiert. Die (Proteo) Liposomen-Suspension wurde vorsichtig abpipettiert und am Rand auf das Saccharosekissen gegeben. Es folgte eine anschließende Zentrifugation für 20 min bei 142 000  $g$  bei 4°C (Rotor TLA120.2). Die (Proteo) Liposomen lagerten sich dabei auf dem Saccharosebett ab (floaten auf diesem) und konnten als weißer Schleier abpipettiert werden. Ungebundenes Protein verblieb hierbei im Überstand, während Proteinaggregate das Saccharosekissen durchquerten und als Pellet sedimentierten. Eventuell mussten die (Proteo) Liposomen durch mehrmaliges Pipettieren homogenisiert werden. Die Saccharose wurde durch eine Zentrifugation in der Airfuge für 10 min bei 120 000  $g$  und 4°C und das anschließende Resuspendieren des Pellets in Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , pH 8.0) entfernt.

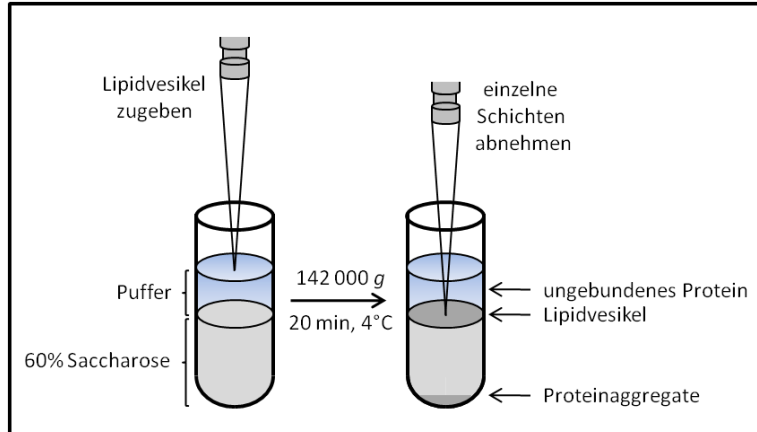


Abb22. **Zentrifugation auf einem Saccharosekissen**

Die (Proteo-) Liposomen wurden auf ein 60%-iges Saccharosekissen gegeben und zentrifugiert. Die Lipidvesikel floateten auf der Oberfläche des Saccharosekissens und konnten vorsichtig abgenommen werden. Ungebundenes Protein konnte aus dem Überstand entnommen werden, evtl. Proteinaggregate befanden sich im Pellet.

### 3.30. Bestimmung der Topologie von YidC (Kuhn *et al.*, 2010)

Zur Bestimmung der Orientierung des Proteins YidC in Proteoliposomen wurden die multilamellaren Vesikel (20 mg/ml) 1:1 mit doppelt konzentriertem Puffer N (20 mM HEPES, 200 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , pH 8.0) auf eine Konzentration von 10 mg/ml verdünnt. Die Liposomen wurden mit gereinigtem YidC bis zu einem molaren Verhältnis von 1:5 000 Protein-Molekül:Lipid-

## Methoden

Moleküle (200 µl MLV mit einer Konzentration von 10 mg/ml auf 8,48 µl gereinigtes YidC mit einer Konzentration von 3 mg/ml) versetzt und gemeinsam extrudiert (siehe Abb20). Die Größe der nun unilamellaren Vesikel wurde mithilfe des Sub Micron Particle Analyzers überprüft.

Es wurden pro Ansatz je 3 Eppendorfhütchen mit 50 µl YidC-Proteoliposomen in Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0) befüllt und mit 0,2 mg/ml Trypsin versetzt. Der Verdau erfolgte für 90 min auf Eis, wobei zu dem Ansatz 3 nach 10 min als Kontrolle für die Trypsinaktivität zusätzlich 10% Triton X-100 bis zu einer Endkonzentration von 4% gegeben wurden. Durch die Zugabe von 1 mg/ml Trypsin-Inhibitor und einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurde der Verdau gestoppt. Anschließend wurden die Proben mit 15% TCA gefällt. Eine schematische Darstellung der Schnittstellen von Trypsin im Protein YidC ist in Abb57 dargestellt.

1. Ausgangsmenge:	50 µl Proteoliposomen
2. Ausgangsmenge + Trypsin:	50 µl Proteoliposomen + 0,2 mg/ml Trypsin + 1 mg/ml Trypsin-Inhibitor
3. Ausgangsmenge + Trypsin + Detergenz:	50 µl Proteoliposomen + 0,2 mg/ml Trypsin + 4% TX-100 + 1 mg/ml Trypsin-Inhibitor

### 3.31. Transitionsunkt von Membranen (Anisotropie)

Mit dieser Methode kann die Fluidität der Membran gemessen werden. Der Farbstoff 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH) ist membrangängig (siehe Abb23), also lipophil und baut sich in die Membran ein. Eingebaut in diese kann der Farbstoff je nach Fluidität der Membran schneller oder langsamer rotieren. Aus dem Verhältnis an anregbaren und nicht anregbaren Molekülen ergibt sich das Verhältnis der Fluidität. DPH (Sigma-Aldrich) hat ein Molekulargewicht von 232 Da, sein Absorptionsmaximum liegt bei 355 nm, sein Emissionsmaximum bei 430 nm.

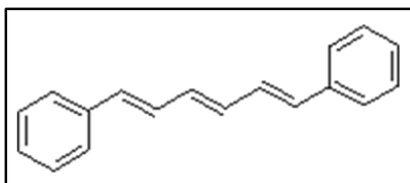


Abb23. Struktur von 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien (Quelle: Sigma-Aldrich)

## Methoden

Das Computerprogramm des Fluorolog3 gibt die Messdaten in HV oder HH an. Der erste Buchstabe gibt hierbei den „excitation polarizer“ und der zweite den „emission polarizer“ an. Der Gerätefaktor musste bei einer Temperatur von 25°C bestimmt werden. Dabei musste „Ex“ auf „vertical“ gestellt sein, beim Bestimmen der Anisotropie jedoch auf „horizontal“. Für die Messung mussten die Shutter geöffnet werden. Die gewünschte Intensität sollte bei 100 000–150 000 liegen. Die Lampe sollte 30–45 min lang warmlaufen, dann war auch der Zähler ausreichend gekühlt.

**Gerätefaktor G**

$$G(\lambda_{EM}) = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$$

**Anisotropie r**

$$[r] = \frac{(I_{VV} - I_{VH})}{(I_{VV} + (2 \times I_{VH}))}$$

Der Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0) mit 5 M Glycerin musste vor der Messung entgast werden. Das Wasserbad, welches die Messkammer temperierte, enthielt H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> und 50% Glysantin. Am Abend vor der Messung wurde das Wasserbad angeschaltet und auf -30°C eingestellt, so dass es genügend Zeit hatte, Temperaturen um die -10°C zu erreichen. Am Messtag wurde ein Coolpack, welches über Nacht bei -80°C vorgekühlt wurde, in das Wasserbad gelegt, um die Temperatur zusätzlich zu vermindern. Des Weiteren wurde die Kammer während der Messung mit Stickstoffgas gekühlt, damit die Küvette nicht beschlug. Hierfür wurde in den kleinen schwarzen Drehdeckel neben den Schläuchen des Wasserbades, welche mit Luftpolster- und Alufolie umwickelt waren, das Stickstoffgas geleitet. Dies galt nur für Temperaturen von -10°C bis ca. +10°C, die Fließgeschwindigkeit sollte ca. 2 l pro min betragen. Die Temperatur in der Messkammer, die mit Styropor ausgekleidet wurde, musste mittels eines Temperaturfühlers in der mit der Probe befüllten Küvette überprüft werden. Die Flüssigkeit in der Küvette wurde während der gesamten Messung mit 100 rpm gerührt. Der Rührfisch garantierte eine gleichmäßige Temperaturverteilung in der Küvette. Ab 20°C mussten ggf. Luftblasen aus der Küvette geklopft werden. Ab 40°C sollte darauf geachtet werden, dass der Deckel gut schließt, damit die Probe nicht verdampfen konnte. Es wurde eine 1 mM Stammlösung des Farbstoffs DPH in **Tetrahydrofuran** (THF) hergestellt. Die benötigte Endkonzentration von DPH lag bei 5,9 µM. Die Zugabe des Farbstoffes sollte bei einer Temperatur erfolgen, die über der Phasenumwandlungstemperatur der Lipidmischung lag. Die Liposomen mit DPH wurden vor der Zugabe zu Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0) mit 5 M Glycerin homogenisiert, bei ca. 500 µl Lipide mit einem Minipotter, bei niedrigeren Volumina mittels 2 x 10 s Ultraschallbehandlung.

## Methoden

### Einstellung des FLUOROLOG3

<b>Band pass</b>	2 nm
<b>Integration</b>	10 s
<b>Monos</b>	EX1 359 nm EM1 428 nm
<b>HV</b>	950
<b>Polarizers</b>	Ex vertical S entweder auf <i>vertical</i> oder <i>horizontal</i>

### **3.32. Bestimmung des Membranpotentials (Kuhn *et al.*, 2010; Stiegler *et al.*, 2011)**

Der potentialsensitive Fluoreszenzfarbstoff Oxonol VI (siehe Abb24) ist bei physiologischen pH-Werten anionisch und kann sich in die Membran einlagern. Er besitzt ein Molekulargewicht von 316 Da, sein Absorptionsmaximum liegt bei 523 nm, das Emissionsmaximum bei 630 nm.

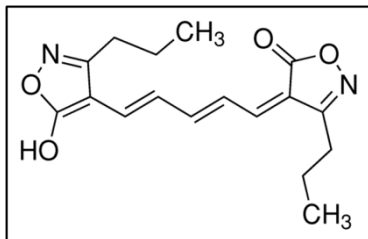


Abb24. **Struktur von Oxonol VI (1,5-Bis(5-oxo-3-propylisoxazol-4-yl)pentamethine-oxonol, Quelle: Fluka)**

Moleküle mit großen permanenten Dipolmomenten können sich in Anwesenheit von einem Membranpotential neu orientieren. Die membranpotentialinduzierte Störung des Gleichgewichts des Farbstoffs führt zu Änderungen in der Fluoreszenzintensität. Da die Umlagerung in der Membran stattfindet, ist die Antwortzeit des Farbstoffs relativ schnell (im Sekundenbereich). Der Farbstoff ist membranpermeabel und negativ geladen. Er wird, abhängig vom Membranpotential, von der positiven Ladung im Inneren des Liposoms angezogen. Das Membranpotential wird als valinomycininduziertes Kalium-Diffusions-Potential gebildet, da durch die Zugabe des Ionophors Valinomycin ein Kaliumstrom in die Vesikel induziert wird und sich ein vorübergehendes Membranpotential bildet (siehe Abb25).

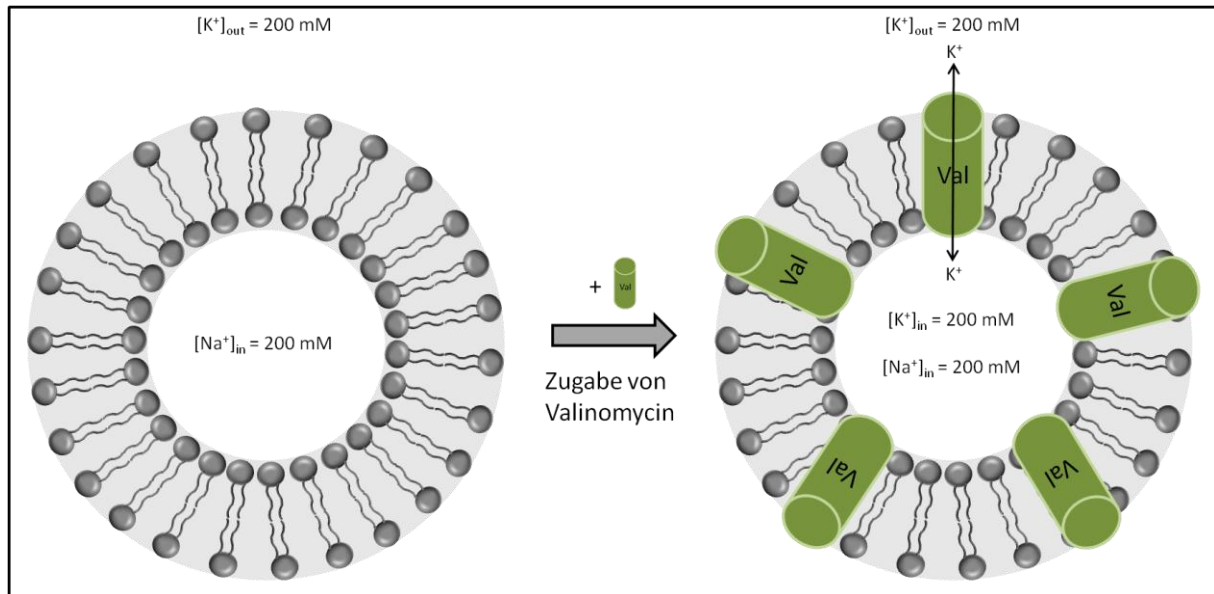


Abb25. **Prinzip der Generation eines Membranpotentials mittels Valinomycin**

Die unilamellaren Vesikel wurden mithilfe des Extruders in Puffer N ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) hergestellt, für 10 min bei 120 000 *g* zentrifugiert und in Puffer K ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) resuspendiert. Im Vesikellumen befanden sich zunächst nur Natriumionen, während im umgebenden Puffer Kaliumionen vorhanden waren. Durch die Zugabe von Valinomycin wurde das Einströmen von Kaliumionen bis zum Diffusionsgleichgewicht induziert, wodurch ein Überschuss an positiven Ionen im Inneren des Vesikels bewirkt wurde.

Ein Potential, welches im Inneren des Liposoms einen Überschuss an positiver Ladung aufweist, erhöht die Fluoreszenzintensität des Farbstoffs Oxonol VI. Auch ein Wechsel der Umgebung, vom wässrigen Medium zur Nähe der Membran, bewirkt eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität. In Anwesenheit eines Ladungsunterschiedes (das Innere des Vesikels hat einen Überschuss an positiver Ladung) wird das negativ geladene Oxonol VI transloziert und akkumuliert im Inneren des Liposoms entsprechend der Nernst-Gleichung (Apell & Bersch, 1987). Diese Gleichung gibt das quantitative Verhältnis von dem Gleichgewichtspotential  $E_K$  und dem Konzentrationsverhältnis eines Ions zwischen innen und außen an.

$$E_K = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln \frac{[K^+]_a}{[K^+]_i}$$

### Nernst-Gleichung

$E_K$	Kalium-Gleichgewichtspotential
R	allgemeine Gaskonstante (8,314 J/K mol)
T	absolute Temperatur in °K
z	Wertigkeit des Ions (1 bei einwertigen Ionen, 2 bei Metallionen wie $\text{Ca}^{2+}$ )
F	Faraday-Konstante (96487 C)
$[K^+]_a$ bzw. ${}_i$	Kaliumkonzentration außen bzw. innen

## Methoden

Die Zunahme der Fluoreszenz wurde bei 634 nm nach der Anregung bei 599 nm gemessen. Somit konnte das Vorhandesein eines Membranpotentials über die Liposomenmembran nachgewiesen werden. Der Farbstoff aggregiert bei einer Konzentration über 1  $\mu\text{M}$ , was zu Quenching (siehe 3.36) führt.

Die Liposomen wurden in Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , pH 8.0) mit oder ohne YidC extrudiert. 200  $\mu\text{g}$  der (Proteo-) Liposomen wurden in der Airfuge für 10 min bei 120 000  $g$  (20 psi) und 4°C zentrifugiert und die Pellets in der entsprechenden Menge an Puffer K (10 mM HEPES, 100 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , pH 8.0) resuspendiert. Man ließ die resuspendierten (Proteo-) Liposomen für 10 min stehen, um eventuell durch das Pipettieren entstandene Luftblasen bei der Messung zu vermeiden. 200  $\mu\text{g}$  (Proteo-) Liposomen wurden zu so viel Puffer K gegeben, dass ein Volumen von 1 ml entstand. Das Gemisch wurde mit einer blauen Spitze rauf und runter pipettiert und Oxonol VI gelöst in **Dimethylsulfoxid** (DMSO) bis zu einer Endkonzentration von 0,34  $\mu\text{M}$  hinzugefügt. Erneut wurden die Substanzen mittels einer blauen Spitze gemischt und in die Quarzküvette gegeben. Die Messkammer wurde mithilfe eines Wasserbades auf konstanter Temperatur gehalten (sollte 25°C nicht überschreiten) und mit einem Minirührfisch bei 100 rpm gerührt. Die Küvette wurde in die Halterung gesteckt, der Deckel geschlossen und „START“ gedrückt. Die Messung wurde solange fortgeführt bis die Kurve konstant blieb, daraufhin wurde „STOP“ und „AUTO ZERO“ gedrückt. Erneut wurde eine Messung gestartet und nach ca. 25 s Valinomycin bis zu einer Endkonzentration von 0,21  $\mu\text{M}$  zugegeben. Nun konnte ggf. das zu translozierende Protein zugefügt werden, dafür wurde je 1  $\mu\text{g}$  des entfaltenen Proteins (mit 1 M Guanidiniumhydrochlorid) zügig in die Küvette pipettiert. Das generierte Membranpotential konnte durch die Zugabe von 2,5  $\mu\text{M}$  Alamethicin (Sigma-Aldrich) zerstört werden. Das Antibiotikum Alamethicin bildet einen Kanal und leitet Kationen durch die Vesikelmembran, wodurch es zu einem Ladungsausgleich zwischen innen und außen kommt (Hanke & Hanke, 1997).

### Einstellungen des *Jasco* FP 750 Spectrofluorometers:

Excitation Wavelength	599 nm
Emission Wavelength	634 nm
Band width (Ex)	5 nm
Band width (Em)	5 nm
Response	1 s
Sensitivity	Medium
Measurement range	0 – 500 s oder 0 – 1 200 s
Data pitch	1 s



### 3.33. Translokation in (Proteo-) Liposomen (Kuhn *et al.*, 2010; Stiegler *et al.*, 2011)

Für die *in vitro*-Translokation (siehe Abb26) der gereinigten Präproteine M13 procoat H5, Procoat H5-M13C, M13 procoat H5EE, Procoat H5EE-M13C, M13 procoat H5-OPC, der Hybridproteine M13 procoat mit Lep PClep, M13 procoat mit OmpA pro828coat und pro80coat, sowie von proOmpA in Liposomen bzw. Proteoliposomen wurden durch Verwendung des Extruders unilamellare Vesikel hergestellt (siehe 3.27.) und deren Größe bestimmt. Für die Translokation wurden YidC-Proteoliposomen mit dem molaren Verhältnis von 1:25 000 Protein-Molekül:Lipid-Moleküle (50  $\mu\text{M}$  YidC auf 10,6 mM Lipid) hergestellt.

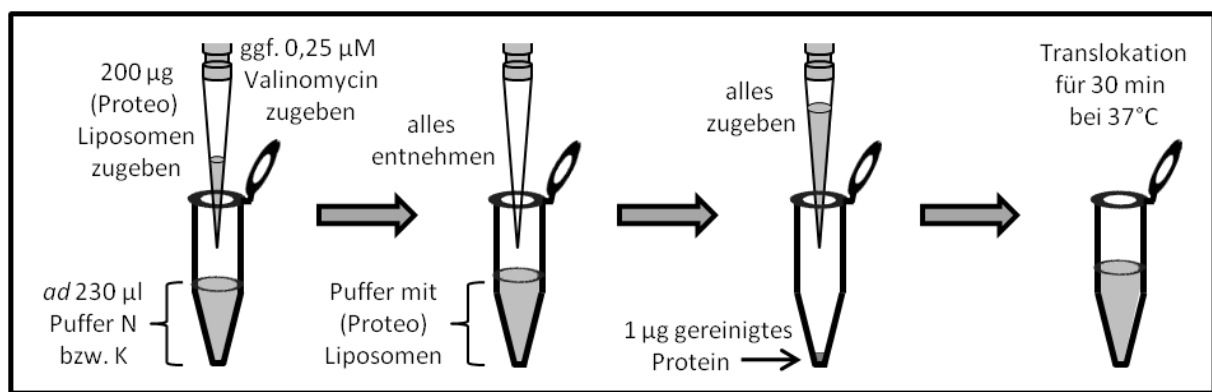


Abb26. **Schematische Darstellung der Pipettierreihenfolge bei der Translokation**

Dem Puffer wurden 200  $\mu\text{g}$  der (Proteo-) Liposomen zugegeben, für das Generieren eines Membranpotentials wurden ggf. 0,25  $\mu\text{M}$  Valinomycin zugefügt. Der gesamte Ansatz wurde entnommen und zu 1  $\mu\text{g}$  des zu translozierenden Substrates gegeben. Die Translokation erfolgte für 30 min bei 37°C.

#### Translokation ohne Membranpotential:

Die benötigte Menge an (Proteo-) Liposomen wurde für 10 min bei 120 000  $g$  (20 psi) und 4°C zentrifugiert und in entsprechender Menge an Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , pH 8.0) resuspendiert. Es wurden pro Ansatz je 4 Eppendorfhütchen mit so viel Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , pH 8.0) befüllt, dass das Endvolumen 230  $\mu\text{l}$  betrug und diese auf 37°C vorgewärmt. Nun wurden 200  $\mu\text{g}$  frisch extrudierte Liposomen bzw. Proteoliposomen in Puffer N zu dem vorgewärmten Puffer gegeben und vorsichtig gemischt.

#### Translokation mit Membranpotential:

Die benötigte Menge an (Proteo-) Liposomen wurde für 10 min bei 120 000  $g$  (20 psi) und 4°C zentrifugiert und in entsprechender Menge an Puffer K (10 mM HEPES, 100 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , pH 8.0) resuspendiert. Es wurden ebenfalls 4 Eppendorfgefäße mit so viel Puffer K befüllt, dass das

## Methoden

Endvolumen 230  $\mu\text{l}$  betrug und auf 37°C vortemperiert. Nun wurden 200  $\mu\text{g}$  (Proteo-) Liposomen dazugegeben, sowie Valinomycin bis zu einer Endkonzentration von 0,25  $\mu\text{M}$  und mit einer blauen Spitze einmal rauf und runter pipettiert.

In einen weiteren Satz Eppendorfgefäße wurde das zu translozierende Protein zu einer Konzentration von 1  $\mu\text{g}$  pro Eppendorfgefäß vorgelegt und die gesamten 230  $\mu\text{l}$  hinzu pipettiert. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei 37°C unter langsamem Schütteln. Anschließend wurden die Ansätze 2, 3 und 4 für 10 min in der Airfuge bei 120 000  $g$  und 4°C zentrifugiert. Von Ansatz 2 wurde der Überstand und das Pellet, von den anderen nur das Pellet weiterverwendet. Auf die Pellets wurden jeweils 230  $\mu\text{l}$  Puffer N (ohne Membranpotential) bzw. 230  $\mu\text{l}$  Puffer K (mit Membranpotential) gegeben und langsam resuspendiert. Zu den Ansätzen 3 und 4 wurde anschließend 0,3 mg/ml Proteinase K gegeben und die Ansätze für 30 min auf Eis inkubiert. Nach 5 min wurde zu den Proben 4 je 4% Triton X-100 pipettiert. Der Verdau wurde durch die Zugabe von 15% TCA gestoppt. Die verschiedenen Ansätze der Translokation sind in Abb27 dargestellt.

- |                                 |   |
|---------------------------------|---|
| 1. Gesamtmenge:                 | <i>ad</i> 230 $\mu\text{l}$ Puffer N oder K + 200 $\mu\text{g}$ (Proteo-) Liposomen + ggf. 0,25 $\mu\text{M}$ Valinomycin + 1 $\mu\text{g}$ Protein                           |
| 2. Überstand:                   | <i>ad</i> 230 $\mu\text{l}$ Puffer N oder K + 200 $\mu\text{g}$ (Proteo-) Liposomen + ggf. 0,25 $\mu\text{M}$ Valinomycin + 1 $\mu\text{g}$ Protein                           |
| 3. Pellet:                      | <i>ad</i> 230 $\mu\text{l}$ Puffer N oder K + 200 $\mu\text{g}$ (Proteo-) Liposomen + ggf. 0,25 $\mu\text{M}$ Valinomycin + 1 $\mu\text{g}$ Protein                           |
| 4. Pellet + Verdau:             | <i>ad</i> 230 $\mu\text{l}$ Puffer N oder K + 200 $\mu\text{g}$ (Proteo-) Liposomen + ggf. 0,25 $\mu\text{M}$ Valinomycin + 1 $\mu\text{g}$ Protein + 0,3 mg/ml PK            |
| 5. Pellet + Verdau + Detergenz: | <i>ad</i> 230 $\mu\text{l}$ Puffer N oder K + 200 $\mu\text{g}$ (Proteo-) Liposomen + ggf. 0,25 $\mu\text{M}$ Valinomycin+ 1 $\mu\text{g}$ Protein + 0,3 mg/ml PK + 4% TX-100 |

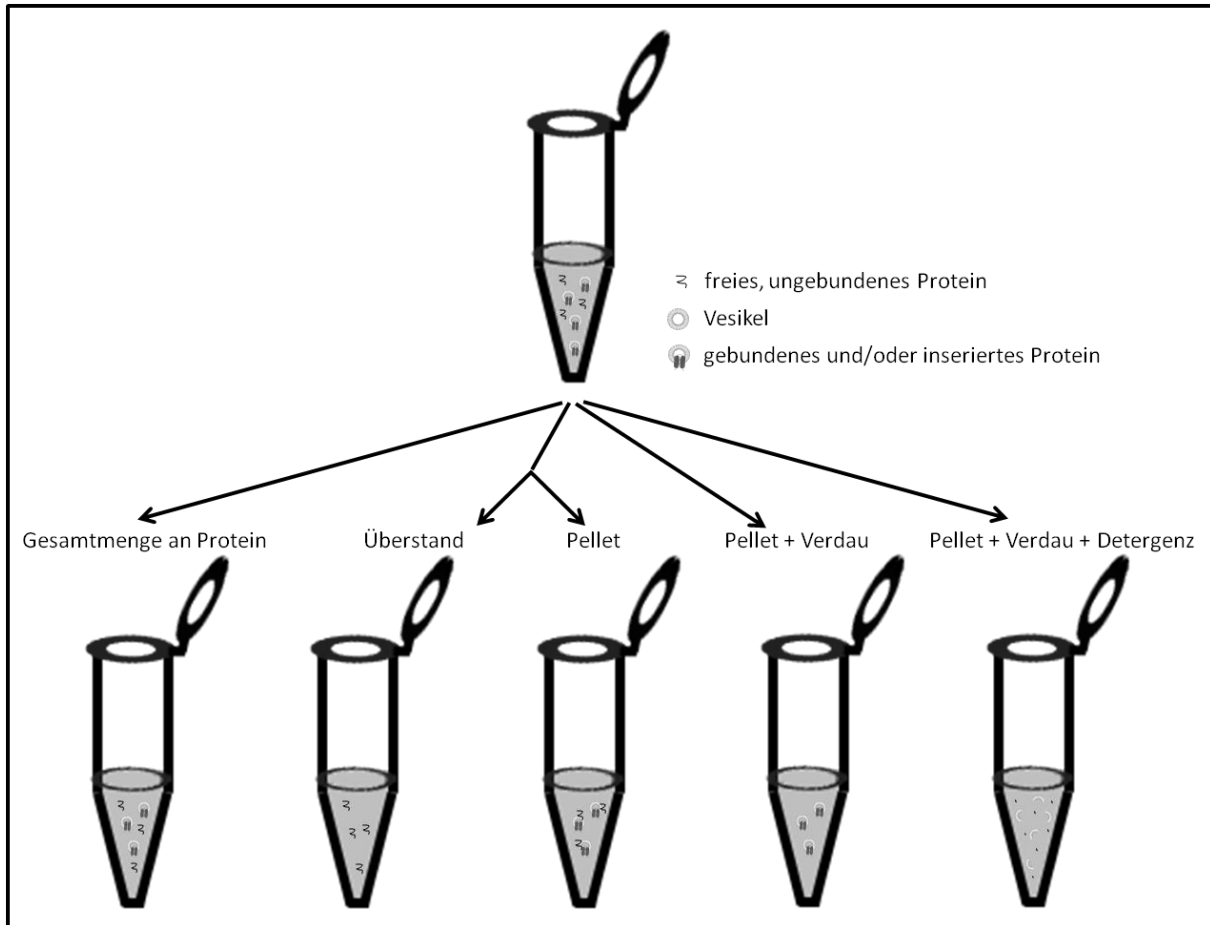


Abb27. Schematische Darstellung der unterschiedlichen Ansätze bei der Translokation

Ansatz 1 enthielt die Gesamtmenge an Protein. Der Ansatz 2 wurde für 10 min bei 120 000  $g$  zentrifugiert und in Überstand und Pellet aufgeteilt. Der Überstand enthielt freies, ungebundenes Protein, während das Pellet die sedimentierten Vesikel mit gebundenem und/oder inseriertem Protein beinhaltete. Der Ansatz 3 wurde nach der Zentrifugation mit Proteinase K versetzt und stellte die inserierten Proteine dar, der Ansatz 4 wurde zusätzlich mit Triton X-100 versehen und diente als Kontrolle der Proteaseaktivität. Die Ansätze wurden nach dieser Reihenfolge mittels SDS-PAGE dargestellt.

### 3.34. Translokation in SecYEG-Proteoliposomen (Stiegler *et al.*, 2011)

Die Proteoliposomen, welche die Translokase SecYEG und analog YidC enthielten, wurden für die *in vitro*-Translokation von gereinigten Präproteinen gemäß der Rekonstitutionsanleitung (siehe Abb21) mit dem Detergenz Dodecylmaltosid und anschließender Behandlung mit den Polystyrolpolymeren Bio Beads hergestellt. Für die Translokation wurden SecYEG-Proteoliposomen mit einem molaren Verhältnis von 1:8 000 Protein-Molekül:Lipid-Molekülen (13  $\mu\text{M}$  SecYEG-Protein auf 10,6 mM Lipid) und YidC-Proteoliposomen mit einem molaren Verhältnis von 1:25 000 Protein-Molekül:Lipid-Molekülen (50  $\mu\text{M}$  YidC auf 10,6 mM Lipid) hergestellt.

## Methoden

### Translokation mit SecA und ATP:

Es wurden 4 Eppendorfgefäße mit so viel Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0) befüllt, dass das Endvolumen 230 µl betrug und auf 37°C vortemperierte. Sollte ein Membranpotential generiert werden, so wurde Puffer K (ad 230 µl) vorgelegt und die entsprechende Menge an LUV für 10 min bei 120 000 *g* und 4°C zentrifugiert und in Puffer K (10 mM HEPES, 100 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0) resuspendiert. Durch die Zugabe von 0,25 µM Valinomycin konnte das Membranpotential generiert werden. Jeweils ein Ansatz wurde mit äquimolarem Verhältnis von SecA zu translozierendem Protein, 3 mM ATP, sowie 5 mM MgCl<sub>2</sub> versetzt, der andere Ansatz blieb ohne SecA, ATP und MgCl<sub>2</sub>. Nun wurden 200 µg (Proteo-) Liposomen dazugegeben und mit einer blauen Spitze einmal rauf und runter pipettiert. In einen weiteren Satz Eppendorfgefäße wurde das zu translozierende Protein bis zu einer Konzentration von 1 µg pro Eppendorfgefäß vorgelegt und die gesamten 230 µl hinzupipettiert. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei 37°C unter langsamem Schütteln. Anschließend wurden die Ansätze 2, 3 und 4 für 10 min in der Airfuge bei 120 000 *g* (20 psi) und 4°C zentrifugiert. Von Ansatz 2 wurde der Überstand und das Pellet, von den anderen nur das Pellet weiterverwendet. Auf die Pellets wurden 230 µl Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0) bzw. Puffer K (10 mM HEPES, 100 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0) gegeben und diese langsam resuspendiert. Zu den Ansätzen 3 und 4 wurden 0,3 mg/ml Proteinase K gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach 5 min wurde zu den Proben 4 jeweils 4% Triton X-100 pipettiert und die Ansätze 4 weiter auf Eis inkubiert. Der Verdau wurde durch die Zugabe von 15% TCA gestoppt.

1. Gesamtmenge:                    *ad* 230 µl Puffer N bzw. K + 200 µg (Proteo-) Liposomen + ggf. SecA + ggf. 3 mM ATP + ggf. 5 mM MgCl<sub>2</sub> + 1 µg Protein
2. Überstand:                      *ad* 230 µl Puffer N bzw. K + 200 µg (Proteo-) Liposomen + ggf. SecA + ggf. 3 mM ATP + ggf. 5 mM MgCl<sub>2</sub> + 1 µg Protein
3. Pellet:                            *ad* 230 µl Puffer N bzw. K + 200 µg (Proteo-) Liposomen + ggf. SecA + ggf. 3 mM ATP + ggf. 5 mM MgCl<sub>2</sub> + 1 µg Protein
4. Pellet + Verdau:                *ad* 230 µl Puffer N bzw. K + 200 µg (Proteo-) Liposomen + ggf. SecA + ggf. 3 mM ATP + ggf. 5 mM MgCl<sub>2</sub> + 1 µg Protein + 0,3 mg/ml PK
5. Pellet + Verdau +  
Detergenz:                          *ad* 230 µl Puffer N bzw. K + 200 µg (Proteo-) Liposomen + ggf. SecA + ggf. 3 mM ATP + ggf. 5 mM MgCl<sub>2</sub> + 1 µg Protein + 0,3 mg/ml PK + 4% TX-100

### 3.35. Translokation in INV (inverted inner membrane vesicles)

(Stiegler *et al.*, 2011)

Für dieses Experiment wurden Eppendorfgefäße mit Minirührfischchen verwendet, da die Volumina nicht so groß waren, dass sich die Komponenten im Thermoschüttler unter langsamem Schütteln ausreichend vermischen würden. 100 µl INV-Translokationspuffer (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) wurden in die Eppendorfgefäße gegeben und 30 µg der invertierten Innenmembranvesikel (INV), sowie 5 mM ATP je Translokationsansatz zugefügt. Nun wurden die Ansätze im 37°C-Brutraum auf den Rührer (Minirührfisch, ø 2 mm) gestellt und alles gut durchmischt. Das zu untersuchende Protein wurde zu einer Endkonzentration von 1 µg in die rührende Flüssigkeit pipettiert. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Endkonzentration der in Harnstoff gereinigten Proteine zwar hoch genug war, um entfaltet zu werden, die Konzentration an Harnstoff aber 500 mM nicht überschritt. Die Translokation wurde für 30 min bei 37°C unter Rühren durchgeführt. Danach wurden die Proben auf Eis gestellt und in drei gleich große Teile geteilt. Anschließend folgte der Proteinase K-Verdau für 30 min auf Eis. Dafür wurde den Ansätzen 2 und 3 je 0,3 mg/ml Proteinase K zugesetzt und zusätzlich dem Ansatz 3 nach 5 min 4% Triton X-100. Der Verdau wurde durch die Zugabe von 15% TCA gestoppt.

- |                       |  |
|-----------------------|--|
| 1. Gesamtmenge        | 100 µl INV-Puffer + 30 µg INV + 5 mM ATP + 5 mM MgCl <sub>2</sub> + 1 µg Protein                               |
| 2. Verdau             | 100 µl INV-Puffer + 30 µg INV + 5 mM ATP + 5 mM MgCl <sub>2</sub> + 1 µg Protein<br>+ 0,3 mg/ml PK             |
| 3. Verdau + Detergenz | 100 µl INV-Puffer + 30 µg INV + 5 mM ATP + 5 mM MgCl <sub>2</sub> + 1 µg Protein<br>+ 0,3 mg/ml PK + 4% TX-100 |

### 3.36. Grundlagen der Spektroskopie

#### 3.36.1. Fluoreszenz

Lumineszenz (kaltes Leuchten) entsteht dann, wenn ein fluoreszierendes Molekül von einem angeregten Zustand in seinen Grundzustand übergeht. Die dabei freiwerdende Energie wird in Form von Photonen abgegeben. Je nach Art des Elektronenübergangs können zwei Arten der Lumineszenz unterschieden werden, die Fluoreszenz und die Phosphoreszenz. Unter Fluoreszenz versteht man den Übergang eines Elektrons von einem angeregten in den Grundzustand unter Emission eines Photons. Die Dauer dieses Nachleuchtens liegt bei der Fluoreszenz bei einigen Nanosekunden. Bei der Phosphoreszenz hingegen kann es zu einem längeren Nachleuchten kommen (metastabiles Energieniveau mit langer Verweilzeit). Substanzen, bei denen Fluoreszenz auftreten kann, werden als Fluorophore bezeichnet. Der angeregte Fluorophor kann nach der Absorption eine bestimmte Zeit in diesem angeregten Zustand verweilen, die mittlere Zeitspanne wird auch als Fluoreszenzlebensdauer (Lifetime) bezeichnet. Das Aussenden von Licht kann mithilfe von bestimmten Substanzen, sogenannten Quenchern, unterdrückt werden. Diese Deaktivierungsprozesse nennt man Fluoreszenzlöschung (englisch: quenching). Beim Quenching geht der Fluorophor entweder strahlungslos in seinen Grundzustand ( $k_{21}$ ) über oder er bildet mit dem Quencher einen sogenannten dunklen Komplex. Im Gegensatz zum Quenching ist das Ausbleichen des Farbstoffes eine Abnahme der Fluoreszenz aufgrund von chemischen Reaktionen, bei denen Fluorophore irreversibel geschädigt werden. Eine Möglichkeit dieser chemischen Reaktionen ist die Oxidation durch Sauerstoff.

Die Vorgänge der Fluoreszenz können mithilfe des Jablonski-Diagramms (siehe Abb28) dargestellt werden. Es zeigt schematisch die Energieniveaus der Elektronen und deren Übergänge, die bei Absorption und Emission von Photonen auftreten.

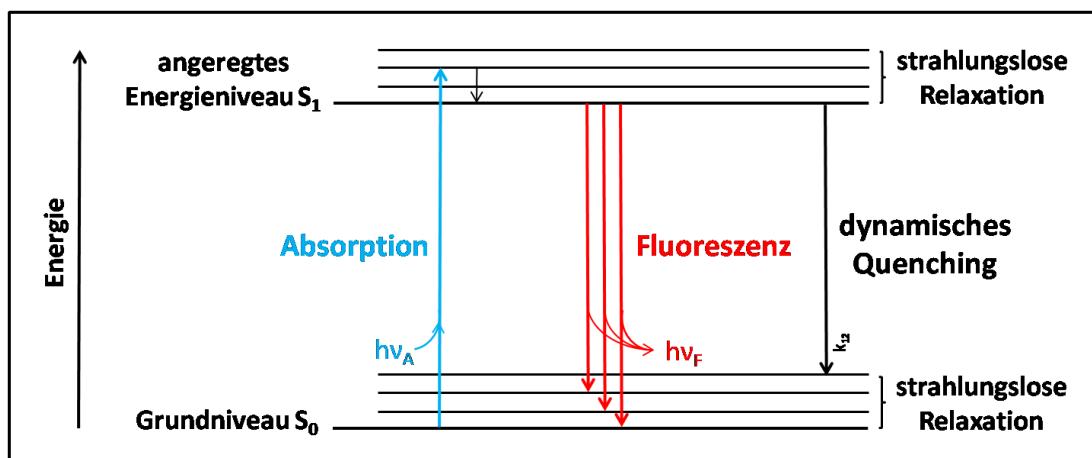


Abb28. **Jablonski-Diagramm**  
Schematische Darstellung der atomaren Energieniveaus.

## Methoden

Elektronen eines Moleküls können verschiedene Energiezustände einnehmen ( $S_0$  und  $S_1$ ). Diese können zudem auch unterschiedliche Schwingungsniveaus aufweisen. Der energetisch günstigste Zustand ist der Grundzustand  $S_0$ , diesen kann das Elektron durch die Aufnahme von Energie, in diesem Fall der Absorption von Licht in Form von Photonen, verlassen. Dabei wird das Elektron in ein höheres Energieniveau ( $S_1$ ) gehoben, zunächst meist in einen hohen Schwingungszustand des  $S_1$ -Zustandes. Durch strahlungslose Relaxation kann das Elektron auf das niedrigste Schwingungsniveau des  $S_1$ -Zustandes gelangen. Diesen Prozess bezeichnet man auch als innere Umwandlung (englisch: internal conversion). Wird nun beim Zurückfallen des Elektrons von Zustand  $S_1$  auf das Grundniveau  $S_0$  ein Photon emittiert, so bezeichnet man das als Fluoreszenz. Diese Schwingungsprozesse führen zum Verlust von Energie des Anregungslichtes im Vergleich zum emittierten Licht. Das emittierte Licht ist somit energieärmer und hat daher eine höhere Wellenlänge als das Licht, das zur Anregung des Elektrons geführt hat. Diese Verschiebung zu längeren Wellenlängen hin, bezeichnet man als Stokes-Verschiebung (englisch: Stokes-Shift).

### 3.36.2. Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS)

(Joseph R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy)

Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) ermöglicht die spektroskopische Detektion von Einzelmolekülen in Lösung. Bei dieser Methode werden Intensitätsschwankungen von Fluoreszenzsignalen gemessen, die durch verschiedene Ereignisse, wie Diffusion und Konformationsänderung eines Moleküls, verursacht werden können. FCS-Messungen werden meist in stark verdünnten Lösungen durchgeführt, um die Intensitätsschwankungen der Einzelmoleküle zu untersuchen. Die zufällige Moleküldiffusion (Brown'sche Molekularbewegung) der Fluorophore in das Fokalvolumen des Lasers und aus diesem heraus, führt zu Zeitveränderungen (Fluktuationen), die Rückschlüsse auf die Struktur des Moleküls ermöglichen. Die Diffusionszeit ( $\tau_D$ ) eines Fluorophors (siehe Abb29) ist dabei abhängig von seiner Größe, kleinere Moleküle durchqueren das Fokalvolumen schneller als größere. Diese Intensitätsfluktuationen können kinetische Informationen über Photonenstatistik, Rotationsdiffusion, Triplettbesetzung und Translationsdiffusion liefern. So konnte z.B. der Anstieg der Diffusionszeit von an ein Liposom gebundenem M13 procoat-Proteins nachgewiesen werden. Jeder dieser Prozesse besitzt eine charakteristische Zeitdauer mit der er in der berechneten Korrelationsfunktion der Intensitätsspur abfällt. Um diese Intensitätsfluktuationen analysieren zu können, bedient man sich der Autokorrelationsfunktion  $G(\tau)$ . Sie gibt die Selbstähnlichkeit einer Funktion an und beschreibt den Zusammenhang des Wertes einer Messgröße zum Zeitpunkt  $t$

## Methoden

mit dem Wert dieser Größe zum Zeitpunkt  $t + \tau$  (time lag). Im zweiten Teil der Formel wurde die Autokorrelation über die zeitliche Fluktuation berechnet.

$$G(\tau) = \frac{[F(t)F(t+\tau)]}{[F(t)]^2} = \frac{[\delta F(t)\delta F(t+\tau)]}{[F(t)]^2} + 1$$

**Autokorrelationsfunktion  $G(\tau)$**

$F(t)$  gemessene Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt  $t$

$\tau$  Zeitverzögerung

$\delta F(t)$  Differenz des gemessenen Signals vom zeitlichen Mittelwert

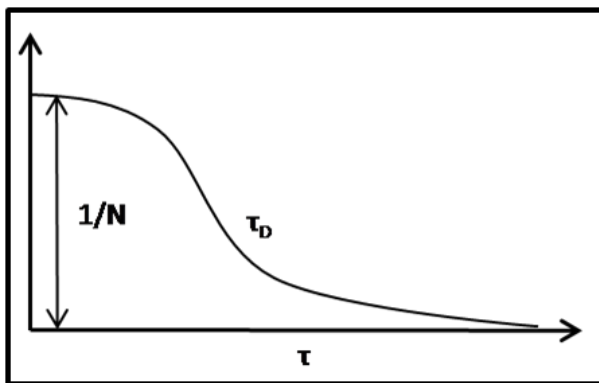


Abb29. Diffusionszeit eines Fluorophors

### 3.36.3. Das konfokale Mikroskop

Für die FCS wird ein kleines Detektionsvolumen benötigt, welches mithilfe eines konfokalen Mikroskops (siehe Abb30) erzeugt werden kann. Das Anregungslicht wird dabei auf ein kleines Volumen fokussiert, um die Lichtquelle auf die Probe abzubilden. Die Probe wird hierbei zusätzlich auf einer Lochblende abgebildet, die man als „pinhole“ bezeichnet. Die Detektion des Signals der restlichen Probe wird dadurch vermindert, indem nur ein kleines Volumen in der Fokusebene angeregt wird. Zudem wird das Signal außerhalb dieser Ebene durch eine Lochblende ausgeschnitten und gelangt nicht auf den Detektor. Das Licht der punktförmigen Lichtquelle trifft auf einen dichroiden Strahlteiler (siehe Abb30). Das Licht wird reflektiert, durch das Objektiv auf die Probe fokussiert und gelangt zurück auf den Strahlteiler. Da nur das Fluoreszenzlicht durch den Strahlteiler gelangen kann, wird das restliche Laserlicht ausgefiltert. Anschließend passiert das Fluoreszenzlicht eine Lochblende und wird von der Avalanche Photodiode (APD) detektiert. Das Fokalvolumen beträgt wenige Femtoliter (fl). Eine in Wasser verdünnte Rhodamin 110 Lösung mit einer Diffusionszeit von  $330 \pm 20 \mu\text{s}$  wurde verwendet, um das effektive Fokalvolumen von  $10 \pm 1 \text{ fl}$  zu bestimmen (Börsch *et al.*, 1998). Somit wird das Signal von Teilchen, die nicht im Detektionsvolumen liegen, gleich zweifach unterdrückt.



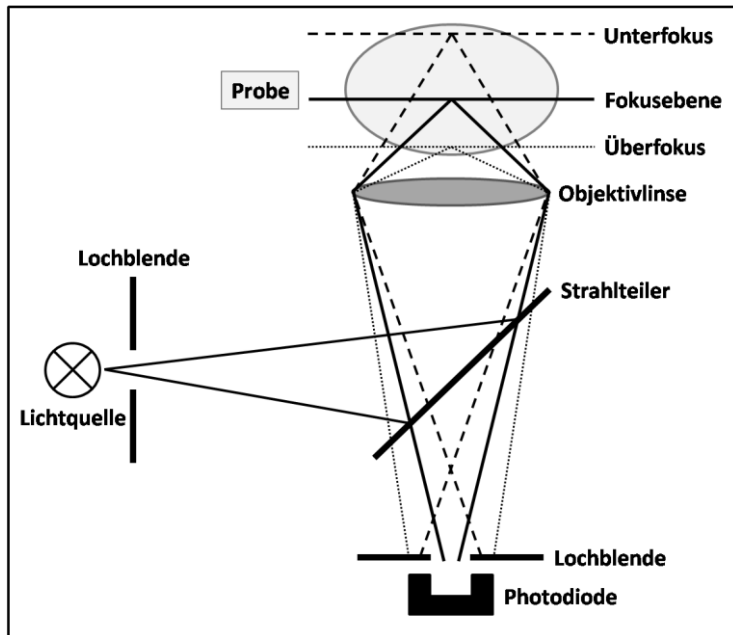


Abb30. **Schematischer Strahlengang eines konfokalen Mikroskops**  
(Stefan Ernst, Universität Stuttgart, 3. Physikalisches Institut)

### 3.36.4. Einzelmoleküldetektion

Um Einzelmoleküle mittels Spektroskopie detektieren zu können, müssen die zu untersuchenden Moleküle spezifisch mit Fluorophoren versehen werden. Eine weitere entscheidende Voraussetzung bei der Einzelmolekülspektroskopie, ist ein gutes Verhältnis zwischen Signal und Hintergrundrauschen. Um relevante Aussagen über das Messergebnis machen zu können, muss das Hintergrundrauschen möglichst niedrig gehalten werden. Die Eigenfluoreszenz von Verunreinigungen, z.B. in Puffersubstanzen, stellt hier eine besondere Problematik dar. Die Einzelmolekülspektroskopie wird mithilfe von zwei Methoden durchgeführt. Zum einen werden auf einer Oberfläche immobilisierte Moleküle untersucht, da dann sichergestellt ist, dass das zu detektierende Molekül unbewegt im Fokus verharrt. Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass sich der Fluorophor lange im Fokalvolumen des Lasers befindet und es hierdurch zum Ausbleichen kommen kann. Bei einer Messung in Lösung mit frei diffundierenden Molekülen, muss man hingegen sicherstellen, dass die Konzentration des zu untersuchenden Farbstoffs so gering ist, dass sich im Mittel nur ein Molekül im konfokalen Volumen befindet. Durch diese Diffusionsprozesse ist die Beobachtungszeit auf ca. 200 ms beschränkt. Rückschlüsse auf die Struktur der fluoreszierenden Moleküle können durch die Änderung der Diffusionszeit gezogen werden. Ein einzelnes fluoreszenzmarkiertes Protein hat eine kürzere Diffusionszeit als ein multimeres oder an ein Liposom gebundenes Protein aufgrund des geringeren hydrodynamischen Radius.

### 3.37. Fluoreszenzmarkierung der M13 procoat-Proteine mit Atto520-maleimid

Für die Einzelmolekülmessungen wurden die Proteine Procoat H5-M13C und H5EE-M13C mit dem membrangängigen Fluoreszenzfarbstoff Atto520-maleimid markiert (siehe Abb31 A). Das Absorptionsmaximum von Atto520-maleimid liegt bei einer Wellenlänge von 516 nm, das Emissionsmaximum bei 538 nm (siehe Abb31 B). Die Fluoreszenzlebenszeit liegt bei  $\tau_f = 3,8$  ns in Wasser, die Quantenausbeute bei 90%. Dieser Fluoreszenzfarbstoff hat eine Größe von 690 Da und ist membrangängig, wenn er an ein Cystein gebunden vorliegt. Atto520-maleimid besitzt eine von Rhodamin 6G abgeleitete Struktur und ist trotz Membrangängigkeit mäßig hydrophil.

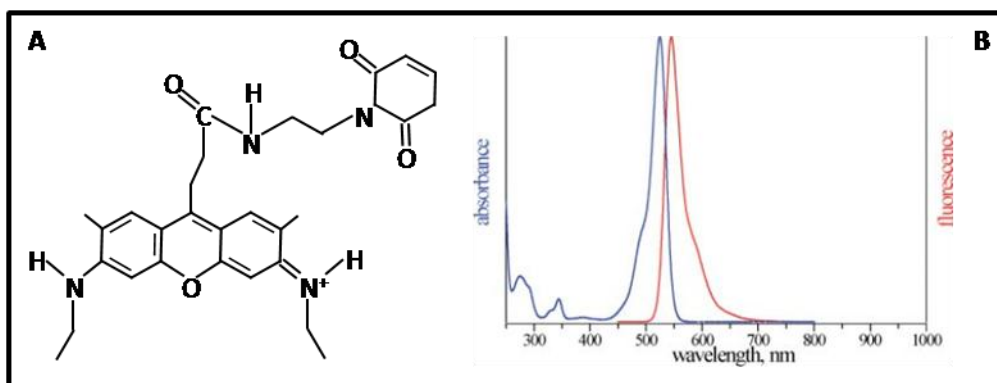


Abb31. Struktur (A) und Spektrum der Absorptions- und Emissionsmaxima (B) des Atto520-maleimids von ATTO-TEC (Quelle: ATTO-TEC)

Der Farbstoff Atto520-maleimid wurde bis zu einer Konzentration von ca. 1 mM in **Dimethylsulfoxid** (DMSO) gelöst. Die Konzentration des Atto520-maleimid-Pulvers in DMSO wurde bestimmt, indem 1  $\mu$ l der Atto520-DMSO-Lösung zu 1 ml MeOH gegeben wurde und bei 450 nm bis 600 nm in einem Spektrophotometer gegen 1 ml MeOH gemessen wurde. Die Konzentration wurde nach folgender Formel bestimmt.

$$A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} * c * x$$

$A_{\lambda}$  = Absorption am Absorptionsmaximum des Farbstoffs

$\epsilon_{\lambda}$  = Extinktionskoeffizient [ $M^{-1}cm^{-1}$ ] ( $\epsilon_{\lambda, \text{Atto520}} = 110\,000$ )

c = Konzentration [Mol/l]

x = Länge der Küvette [cm]

## Methoden

Die Menge an Atto520-maleimid, die für die Markierung des Proteins notwendig war, hing vom Molekulargewicht und der Konzentration des gereinigten Proteins ab. Zunächst wurde das zu markierende Protein mit Stickstoff begast, so dass kein Sauerstoff mehr in der Lösung vorhanden war. Die Markierung mittels Atto520-maleimid erfolgte am Cystein des Proteins, weshalb mögliche Disulfidgruppen reduziert werden mussten. Vor der Zugabe des Farbstoffs wurde TCEP in 10-fachem Überschuss zu dem Protein in Puffer A (1% Lauroylsarcosin, 20 mM Tris/HCl pH 7.9, 500 mM NaCl) gegeben, um zusätzlich die Disulfidbrücken zu spalten. Der Ansatz wurde unter Stickstoffatmosphäre für 15 min bei RT mit einem Minirührfisch gerührt ( $\varnothing$  2 mm). Die Zugabe des Farbstoffs erfolgte in einfach molarem Verhältnis unter Begasung mit Stickstoff, so dass die Cysteinreste reduziert blieben. Es folgte eine 30-minütige Inkubation unter Rühren bei RT. Der freie Farbstoff, der nach der Inkubation nicht an Proteinmoleküle gebunden hatte, musste mittels Gelfiltration entfernt werden. Hierfür wurde eine Säule (High Resolution Column HR 10/30, Pharmacia) mit dem Säulenmaterial Sephadex 200 (S 200, Amicon) verwendet. Das Säulenvolumen betrug 30 ml, der Durchmesser der Säule betrug 1 cm und die Höhe 30 cm. Diese wurde zu Beginn mit 50 ml entgastem 20% Ethanol gewaschen und dann mit 60 ml entgastem Puffer A (1% Lauroylsarcosin, 20 mM Tris/HCl pH 7.9, 500 mM NaCl) äquilibriert. Eine peristaltische Pumpe (Peristaltic Pump P1, Pharmacia) ermöglichte eine konstante Laufgeschwindigkeit von 1 ml/min. Da der Farbstoff nicht nur Sauerstoff-, sondern auch lichtempfindlich war, mussten die Säule und die Fraktionen vor Licht geschützt werden, indem man sie in Alufolie einhüllte. Die mit Farbstoff inkubierte Proteinlösung wurde mithilfe der Pumpe direkt aus dem Eppendorfgefäß auf die Säule gesaugt, dabei musste darauf geachtet werden, dass keine Luft in das System gelangte, da das Säulenmaterial sonst trocken laufen konnte. Es wurden 30 Fraktionen zu jeweils 1 ml gesammelt und bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Die Fraktionen wurden auf ein Tricin-SDS-Gel aufgetragen, um die fluoreszenzmarkierten Fraktionen zu ermitteln. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte mittels eines konfokalen Scanners (Typhoon Trio Plus Scanner, Amersham) bei einer Wellenlänge von 532 nm (555 BP 20R6G, Hex Alexa Fluor 532) und einer Pixelgröße von 100 microns. Die Reinigungswirkung der S 200-Säule reichte für die Proteine Procoat H5-M13C und Procoat H5EE-M13C nicht aus, da sich das Protein auf der Säule ähnlich verhielt wie der freie Farbstoff und mit diesem in denselben Fraktionen von der Säule eluierte. Aus diesem Grund wurde anschließend an die Gelfiltration eine erneute Ionenmetallaffinitätschromatographie (IMAC) mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose (Ni-NTA-Superflow, Qiagen) durchgeführt. Die Fraktionen, die am meisten markiertes Protein enthielten, wurden im „batch-Verfahren“ für 2 h unter Drehen bei 4°C an 1 ml mit Puffer A (1% Lauroylsarcosin, 20 mM Tris/HCl pH 7.9, 500 mM NaCl) äquilibrierter Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose gebunden. Man überführte die Suspension in eine Minisäule (BD Plastipak™, 5 ml, Becton Dickinson) und ließ sie mit einer Laufgeschwindigkeit von 0,5 ml/min durchlaufen. Es folgten Waschschrte mit je 1,5 ml Puffer A

## Methoden

(1% Lauroylsarcosin, 20 mM Tris/HCl pH 7.9, 500 mM NaCl), Puffer A1 (1% Lauroylsarcosin, 20 mM Tris/HCl pH 7.9, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazol), Puffer A2 (1% Lauroylsarcosin, 20 mM Tris/HCl pH 7.9, 500 mM NaCl, 100 mM Imidazol), Puffer A3 (1% Lauroylsarcosin, 20 mM Tris/HCl pH 7.9, 500 mM NaCl, 200 mM Imidazol) und abschließend mit Puffer B (1% Lauroylsarcosin, 20 mM Tris/HCl pH 7.9, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol). Im Falle des Procoat H5-M13C musste eine weitere IMAC angeschlossen werden, da die Elutionen weiterhin Proteinverunreinigungen enthielten. Dafür wurde die Elution zunächst gegen Puffer A (1% Lauroylsarcosin, 20 mM Tris/HCl pH 7.9, 500 mM NaCl) dialysiert und dann erneut an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose gebunden. Die erneute Reinigung über IMAC erfolgte nach obiger Anleitung. Die reinen, fluoreszenzmarkierten Proteinfractionen wurden bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Vor den spektroskopischen Messungen musste der freie Farbstoff vollständig entfernt werden, hierfür wurde eine weitere Gelfiltration mittels einer Sephadex G25-Säule durchgeführt. Eine 1 ml Minispritze (Omnifix®-F, ø 4 mm, Braun) wurde mit der Matrix Sephadex G25 (G25 Fine, Amersham) befüllt, mit drei Säulenvolumen Puffer A\* (0,34 mM Dodecyl-β-D-maltosid, 20 mM Tris/HCl pH 7.9, 500 mM NaCl) äquilibriert und durch das Anlegen von leichtem Druck dicht gepackt. Es folgte eine Zentrifugation der Minisäule für 2 min bei 195 *g*, um den Puffer A\* restlos zu entfernen. Nun wurden 100 µl der Proteinlösung auf die Sephadex G25-Säule geladen. Durch Zentrifugation mit 195 *g* für 2 min bei RT wurde die Proteinlösung eluiert. Hierbei blieben die Farbstoffmoleküle im oberen Drittel auf der Säule zurück, dies konnte durch das Beleuchten mit ultraviolettem Licht kontrolliert werden. Bei der anschließenden Messung im konfokalen Mikroskop sollte die Proteinlösung so weit verdünnt werden, dass ca. 9 kcounts erreicht wurden und im Untergrund keine Verunreinigungen mehr zu erkennen waren.

Für die Tricin-SDS-PAGE der fluoreszenzmarkierten Proteine wurde ein Probenpuffer ohne Bromphenolblau (10 Vol PP:1 Vol 1 M DTT; 300 mM Tris/HCl pH 6.8, 5% SDS, 50% Glycerin) benötigt, da der Farbstoff bei der Wellenlänge von 532 nm ebenfalls leuchtete.

### 3.38. Setup des konfokalen Mikroskops

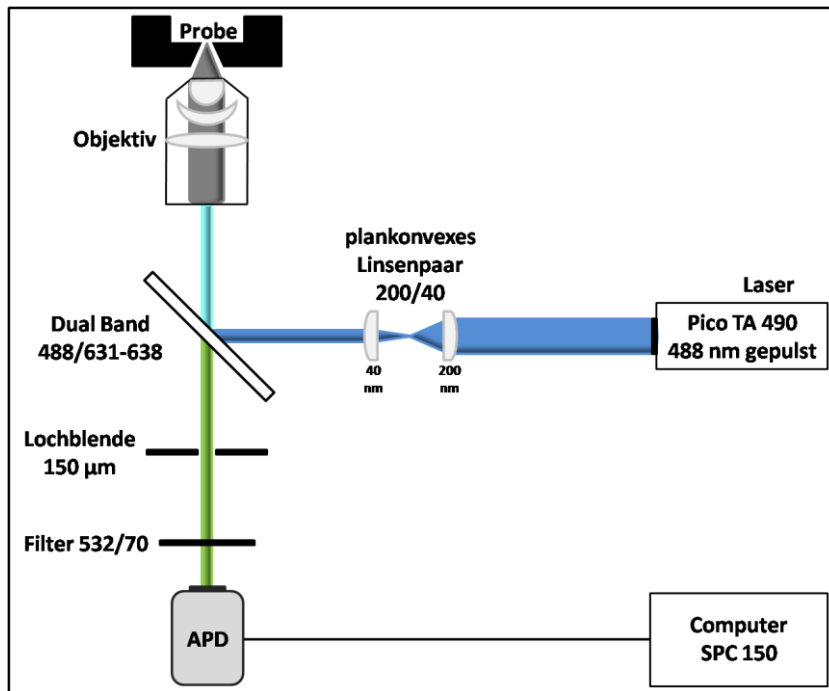


Abb32. Schematische Aufbauskitze der Einzelmoleküldetektion

(3. Physikalisches Institut, Universität Stuttgart)

Der Laserstrahl wurde von Pico TA 490 ausgesendet, durch das plankonvexe Linsenpaar gebündelt, durch den dichroiden Strahlteiler zur Probe abgelenkt und von dieser zur APD reflektiert. Ein Computer mit der Karte SPC 150 speicherte die gesammelten Daten.

Das konfokale Mikroskop wurde gemäß Düser *et al.*, 2009 aufgebaut (siehe Abb32). Ein Diodenlaser (hier „Pico TA 490“ von Picoquant) sendet gepulstes Laserlicht mit der Wellenlänge 488 nm mit einer Repetitionsrate von 80 MHz aus. Der Laserstrahl (100 µW) wird durch das plankonvexe Linsenpaar (200 nm/40 nm) komprimiert, um ein möglichst großes Detektionsvolumen zu erhalten. Die Photonen werden mithilfe des dichroiden Spiegels („Dual Band 488 nm/631-638 nm“, AHF) in Richtung des invertierten Mikroskops (modifiziertes „Olympus IX71“) abgelenkt. Dort trifft es auf die Probe, welche sich auf dem Objektträger des Wasserimmersions-Objektivs („UPlanSApo 60xW, 1.2 N.A., Olympus) befindet. Das Detektionsvolumen hat die Form eines gaussförmigen Ellipsoides (siehe Abb33). Das Fluoreszenzlicht der Probe gelangt durch eine Lochblende mit 150 µm Durchmesser auf den Photodetektor („Avalanche Photodiode“, APD, Perkin Elmer). Durch einen zusätzlichen Filter (532/70, AHF) vor der APD wird nur Licht mit der Wellenlänge 532 +/- 35 nm transmittiert, um möglichst genau das Emissionsspektrum von Atto520 abzudecken. Die Daten wurden mithilfe von einer Messkarte („SPC150, Becker & Hickl) gespeichert.

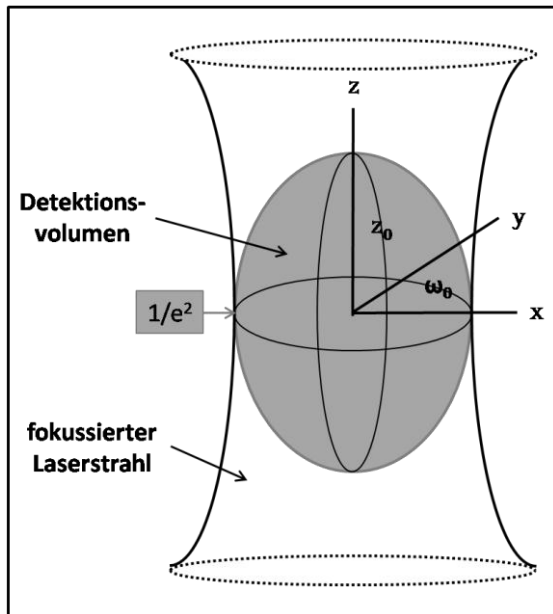


Abb33. Gaussförmiges Ellipsoid mit einer Begrenzung von  $1/e^2$ .

Die Radien  $z_0$  und  $\omega_0$  markieren die Ausdehnung des Ellipsoides bei der die Intensität der Fluoreszenz auf den  $1/e^2$  Teil des Maximalwertes abgefallen ist.

### 3.39. Fluoreszenzlöschung (Quenching)

(Joseph R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy)

Als Fluoreszenzlöschung oder Quenching bezeichnet man alle Prozesse, die die Abnahme von Fluoreszenz bewirken. Bei dem im Versuch mit den M13 procoat-Proteinen verwendeten Kaliumiodid findet eine sogenannte Stoßlöschung statt, welche auch als Kollisions- oder dynamisches Quenching bezeichnet wird. Sie kann mit der Stern-Volmer-Gleichung beschrieben werden.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_D [Q]$$

#### Stern-Volmer-Gleichung

$F_0$  Fluoreszenz in Abwesenheit des Quenchers

$F$  Fluoreszenz in Anwesenheit des Quenchers

$K_D$  Stern-Volmer-Quenching-Konstante

$Q$  Konzentration des Quenchers

## Methoden

Beim Kollisionsquenching diffundiert der Quencher zum Fluorophor. Durch den Kontakt gelangt der Fluorophor ohne Emission von Photonen in seinen Grundzustand zurück. Die molekulare Struktur der beiden Partner bleibt unverändert, die Lifetime nimmt bei diesem Prozess ab. Eine weitere Form der Fluoreszenzlöschung ist das statische Quenchen, welches Informationen über die Bindung zwischen der fluoreszierenden Probe und dem Quencher liefern kann. Beim statischen Quenching bilden Fluorophor und Quencher einen nicht fluoreszierenden Komplex, welcher, ausgelöst durch die Absorption von Licht, emissionslos in seinen Grundzustand zurückkehrt. Die Lifetime bleibt bei diesem Prozess unverändert.

Bei der Löschung der Rhodaminfluoreszenz durch Iodid handelt es sich hauptsächlich um Kollisionsquenching des Fluorophors und wird nicht durch die Bildung von Grundzustand-komplexen ausgelöst (Börsch *et al.*, 1998).

### 3.40. Ermittlung der Quencherkonzentration

Die notwendige Konzentration des Quenchers Kaliumiodid (KI) wurde mittels eines Stern-Volmer-Plots ermittelt. Dafür wurde zunächst der Puffer A\* (0,34 mM Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid, 20 mM Tris/HCl pH 7.9, 500 mM NaCl) gemessen, um dessen Eigenfluoreszenz zu bestimmen. Die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Atto520-maleimid markierten Proteine Procoat H5-M13C und Procoat H5EE-M13C wurden dann mit Puffer A\* (0,34 mM Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid, 20 mM Tris/HCl pH 7.9, 500 mM NaCl) so weit verdünnt, dass Einzelmoleküle messbar waren. Zu den auf Einzelmolekülniveau verdünnten Proteinen wurden anschließend steigende Konzentrationen (0, 2, 10, 25, 50, 75, 100, 150 und 200 mM) des Quenchers Kaliumiodid (KI) gegeben und diese für jeweils 100 s gemessen. Die Intensität der gemessenen Signale wurde mittels des Programms Burst Analyzer (siehe Abb35) analysiert. Dafür wurde die Eigenfluoreszenz des Puffers A\* (0,34 mM Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid, 20 mM Tris/HCl pH 7.9, 500 mM NaCl) von den Mittelwerten der Intensitäten der unterschiedlichen KI-Konzentrationen abgezogen. Das Intensitätssignals der ungequenchten Probe (0 mM KI) wurde mit denen der gequenchten (10 mM bis 200 mM) verglichen und eine Gerade mithilfe der Stern-Volmer-Gleichung erstellt. Die Lifetime des Fluoreszenzfarbstoffs Atto520-maleimid nahm in Abhängigkeit der steigenden Konzentration des Quenchers Kaliumiodid ab. Bei diesem Prozess handelte es sich um dynamisches Quenching. Mithilfe der Stern-Volmer-Plots konnte gezeigt werden, dass eine Konzentration von 200 mM KI ausreichend war, um mehr als 87% (Procoat H5-M13C) bzw. mindestens 93% (Procoat H5EE-M13C) der Fluoreszenzintensität der Atto520-markierten Proteine zu löschen. Eine höhere Konzentration wäre für die Qualität der Liposomen nicht vorteilhaft und sollte aus diesem Grund vermieden werden.

### **3.41. Diffusionszeit von Atto520-markiertem Procoat H5-M13C und H5EE-M13C**

Um die Diffusionskonstante der Proteine Procoat H5-M13C und Procoat H5EE-M13C zu ermitteln, eignet sich die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS). Die FCS kann für frei diffundierende Moleküle verwendet werden, da es die Fluktuationen von einer kleinen Anzahl an Molekülen messen kann, die sich in einem Laserfokus befinden. Sie ermöglicht somit die Ermittlung der Diffusionszeit  $\tau_D$  von auf Einzelmolekülniveau verdünnten Teilchen. Durch die Bindung eines Proteins an ein (Proteo) Liposom wird der hydrodynamische Radius vergrößert. Dieser größere Durchmesser bewirkt eine Verlängerung der Diffusionszeit, welche bestimmt werden kann. Der Vesikel mit markiertem Protein befindet sich länger im Fokalvolumen und diffundiert deshalb länger durch dieses hindurch. Zunächst wurde die Diffusionszeit des Farbstoffmoleküls Atto520-maleimid für 100 s gemessen. Dann wurde das zu untersuchende M13 procoat-Protein, welches mit Atto520-maleimid markiert wurde, so weit in Puffer A\* (0,34 mM Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid, 20 mM Tris/HCl pH 7,9, 500 mM NaCl) verdünnt, bis sich nur ein Molekül im Fokalvolumen des Lasers befand. Die Probe wurde auf den Objektträger des konfokalen Mikroskops pipettiert und für 100 s gemessen. Des Weiteren erfolgte eine Messung von Liposomen mit markiertem M13 procoat-Protein für 100 s.

### **3.42. Einzelmoleküldetektion zum Nachweis von Bindung und Einbau von fluoreszenzmarkierten M13 procoat-Proteinen an Lipidvesikel**

Mithilfe der Einzelmoleküldetektion können die Bindung und der Einbau von fluoreszenzmarkierten Proteinen an Lipidvesikel in Echtzeit untersucht werden. Das Ziel ist die Auflösung des Insertionsprozesses und die Bestimmung der Einbaukinetik. Die Vesikel werden erst dann als lange „Photonenbursts“ sichtbar, wenn das fluoreszenzmarkierte Protein an diese gebunden hat. Dieser „Burst“ stellt eine Anhäufung von Photonen dar und kann im Programm „Burst Analyzer“ (Zarrabi *et al.*, 2009) dargestellt werden. Diese zeigen das Durchqueren eines fluoreszierenden Moleküls durch das Fokalvolumen. Die Unterscheidung zwischen freien Farbstoffmolekülen bzw. Proteinen und an die Vesikel gebundenem Protein erfolgt durch die Änderung der Diffusionszeit  $\tau_D$ . Die Erkennung von eingebautem Protein in das (Proteo) Liposom erfolgt durch die Zugabe von Kaliumiodid, welches als Quencher das Fluoreszenzsignal des Atto520 bei einer Konzentration von 200 mM löscht. Für die Durchführung musste zunächst das zu analysierende Protein mit dem Fluoreszenzfarbstoff Atto520-maleimid markiert werden. Dafür erforderlich war, dass sich nur ein einzelner Cysteinrest in der Aminosäuresequenz des



## Methoden

Proteins befand, da diese Aminosäure als Bindungspartner für den Farbstoff Atto520-maleimid diente. Bei den Proteinen M13 procoat H5 und H5EE wurde hierzu ein Austausch von Serin gegen Cystein an der Position +13 des periplasmatischen Bereichs vorgenommen, woher der Name der Mutation M13C rührt. Die Proteine besaßen zusätzlich beide die H5-Mutation, welche die Prozessierung durch die Leaderpeptidase verhinderte. Diese Mutation beinhaltet einen Austausch des Aminosäurerestes Serin gegen Phenylalanin an der Position -3, welche die Erkennungsregion für die Leaderpeptidase darstellt. Während der Proteinexpression kann somit verhindert werden, dass das Präprotein gespalten und während der Proteinreinigung nur matures M13 coat gewonnen wird. Des Weiteren besitzt das Protein M13 procoat H5EE eine Insertion von zwei zusätzlichen Glutaminsäureresten nach der Position +2, wodurch die Nettoladung des Loops bei -5 statt -3 (H5) liegt. Dies macht das Protein M13 procoat H5EE noch stärker vom Membranpotential abhängig als M13 procoat H5.

Für die Fluoreszenz-Einzelmoleküldetektion wurde das mit dem Fluoreszenzfarbstoff Atto520-maleimid markierte Protein zu frisch extrudierten (Proteo-) Liposomen gegeben. Die Vesikel mussten selbst fluoreszenzarm sein, da bei der Analyse der Bursts nicht zwischen der Eigenfluoreszenz der Vesikel und den leuchtenden M13 procoat-Proteinen unterschieden werden konnte. Für die Herstellung der Liposomen wurde aus diesem Grund das semi-synthetische Phospholipidmolekül 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC) verwendet, welches annähernd keine Eigenfluoreszenz aufwies. Die (Proteo-) Liposomen erschienen erst dann als lange „Photonenbursts“, wenn das fluoreszenzmarkierte Protein an diese gebunden hatte oder eingebaut wurde. Die zehn Messungen erfolgten über einen Zeitraum von 8 min, welcher in Abschnitte von 30 s eingeteilt wurde. Jeder Burst der zehn einzelnen 30 Sekunden-Intervalle wurde anschließend addiert und in einem Graphen über die Zeit aufgetragen. Es konnte somit ermittelt werden, wie viele Proteine im Mittel an die Vesikel gebunden hatten bzw. in diese eingebaut wurden. Für die Detektion der eingebauten Proteine wurde der Quencher Kaliumiodid (KI) verwendet, welcher zu einer Konzentration von 200 mM zugegeben wurde und die Fluoreszenz des Farbstoffs Atto520-maleimid löscht. Er quencht die Fluoreszenzsignale der zugänglichen, also nicht über die Membran transportierten Atto520-Moleküle und ermöglichte somit deren Unterscheidung (siehe Abb34). Nur Proteine, die in die Membran eingebaut wurden, sollten weiterhin fluoreszieren, da sich der Farbstoff für den Quencher unzugänglich im Inneren des Liposoms befände.



## Methoden

(Proteo-) Liposomen in Puffer sollte im Trace so bei ca. 2-3 kcounts liegen, während die Puffer alleine eine Intensität von ca. 1-2 kcounts besaßen. Da die Puffer keine Eigenfluoreszenz aufweisen durften, wurden alle Lösungen zuvor mindestens für einen Tag in Aktivkohle gerührt, so dass eventuelle Verunreinigungen entfernt wurden. Die Aktivkohle wurde vor Verwendung der Puffer mit einem Spritzenfilter (Zelluloseacetat, Porengröße 0,2 µm) abfiltriert.

Für die Messungen ohne Membranpotential wurden die (Proteo-) Liposomen in Puffer N\* (20 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), für die mit generiertem Membranpotential in Puffer K\* (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) resuspendiert. Die Puffersubstanz HEPES war für die spektroskopischen Messungen ungeeignet, da sie eine starke Eigenfluoreszenz aufwies, deshalb wurde Tris verwendet. Für jede Messung wurde der Ansatz unmittelbar vor dem Beginn der Messung frisch pipettiert und direkt auf den Objektträger des Mikroskops gegeben. Das Messvolumen betrug 50 µl. Für die Bindungsstudien wurden die Ansätze wie folgt vorbereitet. Zunächst wurde so viel Puffer (N\* oder K\*) vorgelegt, dass das Endvolumen 50 µl betrug, dann fügte man 400 µg (Proteo-) Liposomen zu und mischte vorsichtig, so dass eine gleichmäßige Verteilung der Vesikel erreicht wurde. Nun gab man ca. 0,1 µg des zu messenden Proteins dazu, welches so stark in Puffer A\* (0,34 mM Dodecylmaltosid, 20 mM Tris/HCl pH 7,9, 500 mM NaCl) verdünnt wurde, dass Einzelmoleküle messbar waren. Das Detergenz Lauroylsarcosin war für die spektroskopischen Messungen ungeeignet, da es eine starke Eigenfluoreszenz aufwies, deshalb wurde das nicht fluoreszierende Dodecyl-β-D-maltosid (GERBU Biotechnik, 99,7% HPLC) verwendet. Das auf Einzelmolekülniveau verdünnte Protein wurde jeweils unmittelbar vor der Zugabe zum Ansatz durch 1 M Guanidiniumhydrochlorid entfaltet. Für die Messungen des Einbaus wurde anfangs zu dem vorgelegten Puffer N\* oder K\*, Kaliumiodid bis zu einer Endkonzentration von 200 mM gegeben und gut gemischt. Die Probe wurde mittig auf den Objektträger pipettiert, der Fokus in die richtige Ebene gefahren und die Messung für 480 s bei 100 µW gestartet (Dauer ca. 10 s). Es wurden jeweils 10 Messungen pro Ansatz durchgeführt, um Schwankungen in der Einzelmessung auszugleichen.

**Bindung:**     x µl Puffer N\* (ohne MP) oder K\* (mit MP)  
                  400 µg (Proteo-) Liposomen  
                  ggf. 0,25 µM Valinomycin (nur für Messungen mit MP)  
                  7,5 µl Procoat H5-M13C oder Procoat H5EE-M13C  
                  -----  
                  50 µl Gesamtmenge

<b>Einbau:</b>	x µl Puffer N* (ohne MP) oder K* (mit MP)
	200 mM KI
	400 µg (Proteo-) Liposomen
	ggf. 0,25 µM Valinomycin (nur für Messungen mit MP)
	7,5 µl Procoat H5-M13C oder Procoat H5EE-M13C
	<hr/>
	50 l Gesamtmenge

### 3.43. Auswertung der Daten

Das Auswerten der Daten erfolgte mithilfe des von Nawid Zarrabi entwickelten Computerprogramms „Burst Analyzer“ (Zarrabi, 2003; Zarrabi *et al.*, 2009), welches in Abb35 dargestellt ist. Es ermöglicht das Zählen der Bursts in großen Datenmengen gemäß festgelegter Parameter. Die Bursterkennung erfolgte nach festgelegten Kriterien automatisch. Die Daten wurden von einer Messkarte abgespeichert. Die Messdauer (480 s) kann mit diesem Programm in beliebig große Abschnitte unterteilt werden (30 s). Die Dateien mit identischem Zeitcode wurden mittels des Burst Analyzers jeweils addiert und in einer Datei zusammengefasst. Das Programm stellt verschiedene Auswertemöglichkeiten zur Verfügung. Das Fenster in Abb35 oben rechts zeigt die einzelnen Zeitabschnitte einer Messung an, aus der man dann die gewünschte Zeitspur auswählt. Das große Hauptfenster zeigt die momentan eingeladene Fluoreszenzintensitätsspur eines ausgewählten Zeitabschnittes. Das Fenster unten rechts ermöglicht unter anderem das Zählen der gefundenen Bursts. In der Toolbar des Programms kann das automatische Erfassen der Bursts ausgewählt werden, die dann in dem Fenster oben rechts angezeigt werden. Das Auswählen der Bursts kann mit Parametern festgelegt werden. Die jeweilige Datei kann dann angewählt und die Zeitspur mit dem Burst Analyzer betrachtet werden.

# Methoden

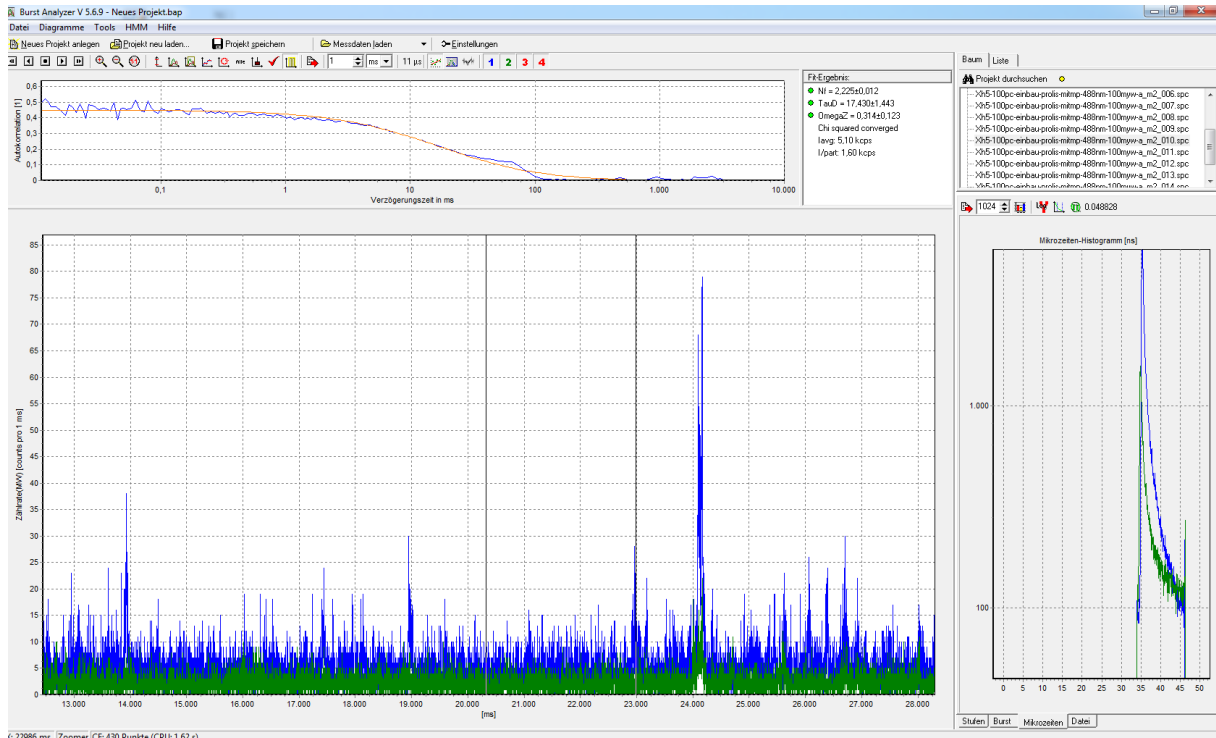
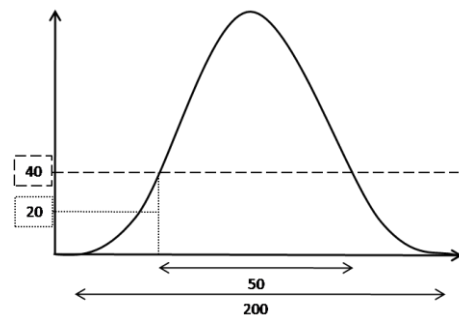


Abb35. Beispiel für das Hauptfenster des „Burst Analyzers“

## Parameter für die Analyse der Bursts: nach standardisierten Auswahlkriterien

Ausmaße eines Bursts	Min Pegel	40
	Flanken	20
Dauer eines Bursts	Dauer Min [ms]	50
	Dauer Max [ms]	200
	Dauer Aus [ms]	2



Die ermittelten Bursts wurden in das Programm „Matlab“ kopiert und dort weiter analysiert. Die jeweils 10 Dateien wurden zu einem Graphen, unterteilt in 30 Sekunden-Abschnitte, zusammengefügt und die Verteilung der Bindungs- und Einbauzeiten analysiert.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Reinigung der Translokationskomponenten der inneren Membran von *Escherichia coli*

Um die verschiedenen Komponenten der Präproteintranslokation von *E. coli* wie YidC, SecYEG und SecA untersuchen zu können, wurden diese separat in *E. coli*-Stämmen überproduziert und aus diesen isoliert. Die Reinigung der einzelnen Proteine erfolgte mittels Ionenmetallaffinitätschromatographie (IMAC) über eine His-tag-Modifikation, wodurch die Co-Reinigung von wildtypischem Protein ausgeschlossen werden konnte. Die gereinigten Membranproteine wurden für *in vitro*-Translokationsexperimente in Lipidvesikel rekonstituiert und ihre Funktionalität mithilfe von gereinigten Substratproteinen überprüft.

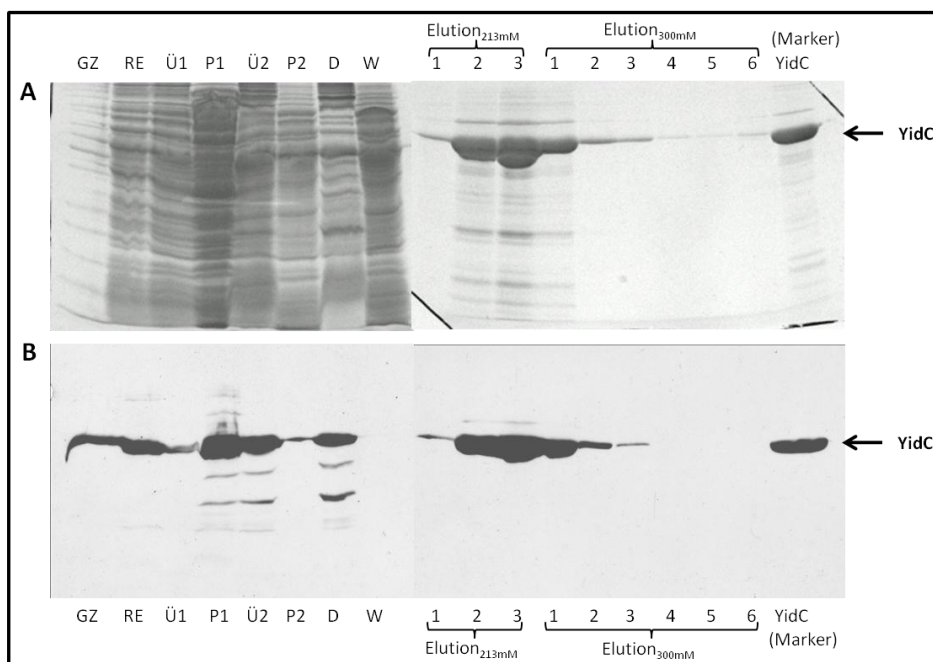
#### 4.1.1. Reinigung der Membraninsertase YidC

##### 4.1.1.1. YidC-Reinigung mittels Dodecylphosphocholin (Fos-cholin12)

Die induzierten *E. coli* C43-Zellen mit dem Plasmid pET-16b IM60 N-His<sub>10</sub> (siehe Abb36, Spur GZ) wurden mithilfe einer French Press aufgeschlossen und das Lysat zentrifugiert. Die Analyse von Überstand (Spur Ü1) und Pellet (Spur P1) zeigte, dass das YidC-Protein zum größten Teil in der cytoplasmatischen Membran eingebaut vorlag. Daher wurde die Membranfraktion mit 1% Dodecylphosphocholin (Fos-cholin12) solubilisiert, um das Protein aus der Membran zu lösen. Das Detergenz Dodecylphosphocholin ist gut geeignet, um YidC über längere Zeit in solubilisierter Form funktionell aktiv zu halten (Serek *et al.*, 2004). Die übrigen Membranbestandteile und geringe Mengen an nicht solubiliertem Protein (Spur P2) wurden in einer Ultrazentrifugation abgetrennt und das mit zehn aminoterminalen Histidin-Resten modifizierte Protein YidC (Spur Ü2) im „batch-Verfahren“ an die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose gebunden. Das Vorhandensein von nicht an die Säule gebundenem YidC im Durchlauf (Spur D) kann auf endogenes YidC ohne His-tag zurückzuführen sein. Ebenfalls ist denkbar, dass die Bindungszeit an das Säulenmaterial nicht ausreichend war. Der Waschschrift (Spur W) mit 40 mM Imidazol war ausreichend, um unspezifisch gebundene Proteine von der Säule zu entfernen. Somit konnte das Protein zunächst mit 213 mM Imidazol (Spuren Elution<sub>213mM</sub> 1-3) und anschließend mit 300 mM Imidazol (Spuren Elution<sub>300mM</sub> 1-6) vollständig von der Säulenmatrix eluiert werden. Jeder Reinigungsschritt wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Spuren auf das Vorhandensein von YidC (Kontrolle in Spur YidC) untersucht. Hierfür wurden die zu analysierenden Proben zunächst mit SDS-Probenpuffer vermischt und auf 12% SDS-Gele aufgetragen, wobei diese mit

## Ergebnisse

Coomassie gefärbt (siehe Abb36 A) bzw. geblottet und anschließend immungefärbt wurden (siehe Abb36 B). Die Reinheit der Elutionsfraktionen war für die Durchführung der folgenden Experimente ausreichend, weshalb auf weitere Reinigungsmaßnahmen verzichtet wurde. Die Konzentration der Elutionen wurde mittels Bradford-Reagenz (siehe 3.18.1) und einem 12% SDS-Gel abgeschätzt. Als Referenzprotein wurde BSA eingesetzt. Die relevanten Elutionen ( $E_{213\text{mM}}$  2+3,  $E_{300\text{mM}}$  1+2) hatten eine YidC-Konzentration von 1-3 mg/ml. Die Elution $_{213\text{mM}}$  3 hatte eine Konzentration von 3 mg/ml (insgesamt 1 ml) und wurde für die Translokations- und Topologieexperimente verwendet. Die YidC-enthaltenden Fraktionen wurden gegen Dialysepuffer (0,2% Fos-cholin12, 20 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 10% Glycerin, pH 8.0) dialysiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.



### Abb36. Reinigung von YidC mit Dodecylphosphocholin (Fos-cholin12)

Dargestellt sind die Schritte der YidC-Reinigung mittels Dodecylphosphocholin (Fos-cholin12) über IMAC. Die Aliquots wurden über ein 12% SDS-PAGE aufgetrennt und die Banden mittels Coomassie Brilliant Blau (A) bzw. über Western Blot und anschließender Immunfärbung (B) nachgewiesen. Verwendet wurde der Antikörper, der spezifisch gegen den C-Terminus von YidC gerichtet ist. GZ: Ganze Zellen nach Induktion mit 1 mM IPTG (2  $\mu\text{l}$ ), RE: Rohextrakt (2  $\mu\text{l}$ ), Ü1: Überstand nach der 1. Zentrifugation (5  $\mu\text{l}$ ), P1: Pellet nach der 1. Zentrifugation (5  $\mu\text{l}$ ), Ü2: Überstand nach der 2. Zentrifugation (5  $\mu\text{l}$ ), P2: Pellet nach der 2. Zentrifugation (5  $\mu\text{l}$ ), D: Durchlauf (10  $\mu\text{l}$ ), W: Waschschrift (10  $\mu\text{l}$ ), Elution $_{213\text{mM}}$  1-3: Elutionen 1-3 mit 213 mM Imidazol (je 10  $\mu\text{l}$ ), Elution $_{300\text{mM}}$  1-6: Elutionen 1-6 mit 300 mM Imidazol (je 10  $\mu\text{l}$ ), YidC: gereinigtes YidC-Protein als Kontrolle (15  $\mu\text{g}$ ).

#### 4.1.1.2. YidC-Reinigung mittels Dodecylmaltosid

Alternativ wurde die Membranfraktion aus *E. coli* C43/pET-16b IM60 N-His<sub>10</sub> mit 1% Dodecylmaltosid solubilisiert, um YidC aus der Membran herauszulösen (siehe Abb37). Die Reinigungsschritte waren analog der Reinigung mit Dodecylphosphocholin. Die Reste an nicht solubiliertem Protein sind in Spur P2 zu sehen. Der korrespondierende Überstand 2 wurde im „batch-Verfahren“ mit der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose inkubiert. Im Durchlauf (Spur D) ist eine relativ große Menge an YidC-Protein sichtbar, welches nicht an die Nitrilotriacetat-Matrix gebunden hatte. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass das Solubilisieren mit Dodecylmaltosid nicht ganz vollständig war. Dieses Detergenz ist milder als Fos-cholin12 und somit nicht so effizient im Herauslösen von Membranproteinen aus Phospholipiddoppelschichten. Im Waschschritt (Spur W) mit 25 ml kam ebenfalls etwas gebundenes YidC-Protein mit den unspezifisch gebundenen Proteinen von der Säule, eventuell hätte mit einem größeren Volumen gewaschen werden sollen. Das Protein wurde mit 213 mM Imidazol (Elution<sub>213mM</sub> 1-3) und dann mit 300 mM Imidazol (Elution<sub>300mM</sub> 1-5) von der Säulenmatrix eluiert. Von jedem Reinigungsschritt wurde ein Aliquot durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Spuren untersucht. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels einer Bicinchoninsäure (BCA)-Bestimmung (siehe 3.18.2). Die relevanten Elutionen (E<sub>213mM</sub> 3 (1 ml), E<sub>300mM</sub> 1 (2 ml)) hatten eine YidC-Konzentration von ca. 1 mg/ml und wurden für die Translokationsexperimente im Vergleich zu SecYEG verwendet. Die YidC-enthaltenden Fraktionen wurden gegen Dialysepuffer (0,2% DDM, 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 10% Glycerin, pH 8,0) dialysiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Aufgrund der höheren Proteinkonzentration nach der Reinigung von YidC mittels Fos-cholin12 wurde der Großteil der Experimente mit diesem Protein durchgeführt, da weniger Proteinlösung und somit weniger Detergenz eingesetzt werden musste.

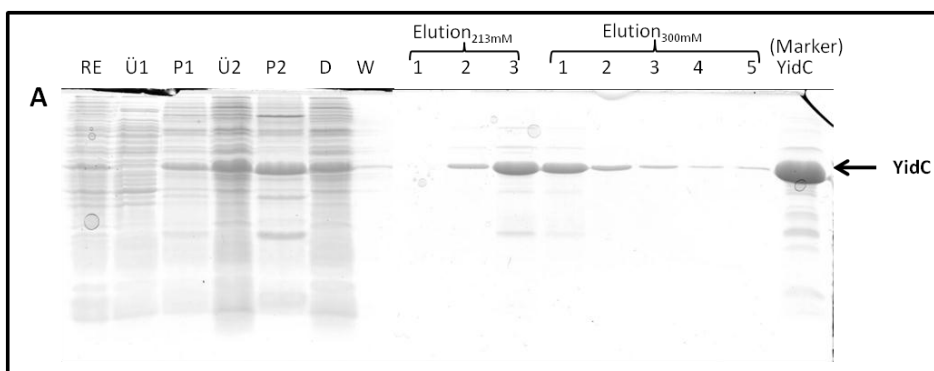


Abb37. **Reinigung von YidC mit Dodecylmaltosid**

Dargestellt sind die Schritte der YidC-Reinigung mittels Dodecylmaltosid über IMAC. Die Aliquots wurden mittels 12%-igem SDS-PAGE aufgetrennt und die Banden mittels Coomassie Brilliant Blau nachgewiesen. RE: Rohextrakt (2 µl), Ü1: Überstand nach der 1. Zentrifugation (5 µl), P1: Pellet nach der 1. Zentrifugation (5 µl), Ü2: Überstand nach der 2. Zentrifugation (5 µl), P2: Pellet nach der 2. Zentrifugation (5 µl), D: Durchlauf (10 µl), W: Waschschritt (10 µl), Elution<sub>213mM</sub> 1-3: Elutionen 1-3 mit 213 mM Imidazol (je 10 µl), Elution<sub>300mM</sub> 1-5: Elutionen 1-5 mit 300 mM Imidazol (je 10 µl), YidC: gereinigtes YidC-Protein als Kontrolle (15 µg).



### 4.1.2. Reinigung der ATPase SecA

Das cytosolische Protein SecA wurde in *E. coli* BL21/pZH52-SecA-His überexprimiert und mittels Metallionenaffinitätschromatographie gereinigt. Hierfür wurden die Zellen durch die French Press aufgeschlossen (siehe Abb38, Spur RE) und das Lysat zentrifugiert, um die Membranfraktion abzutrennen. Eine geringe Menge an SecA war vermutlich membranassoziiert und im Pellet (Spur P). Der größte Teil aber befand sich im Überstand (Spur Ü). Nach Inkubation mit der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose wurde ungebundenes Protein (Spur D) separiert und die Matrix mit 10 mM Imidazol gewaschen (Spur W). Möglicherweise war die Kapazität der Nitrilotriacetat-Säule erreicht und alle Bindungsstellen abgesättigt, wodurch geringe Mengen an SecA von der Säule gewaschen wurden, eventuell sollte weniger Zell- oder mehr Säulenmaterial verwendet werden. Der Waschschriff fand mit einer ausreichenden Menge an Puffer statt, so dass ein Großteil der Verunreinigungen von der Säule entfernt wurde. Die Elution (Spuren Elution<sub>150mM</sub> 1-10) erfolgte mit einer Imidazolkonzentration von 150 mM und erbrachte eine SecA-Proteinkonzentration von ca. 6 mg/ml in den Elutionen 2-4 (jeweils 1 ml). Die Bestimmung der Konzentration erfolgte mithilfe der Bradford-Proteinbestimmung und quantitativer SDS-PAGE. Die Elutionsfraktionen 2-4 wurden dialysiert, um das Imidazol zu entfernen, wurden für spätere Experimente in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

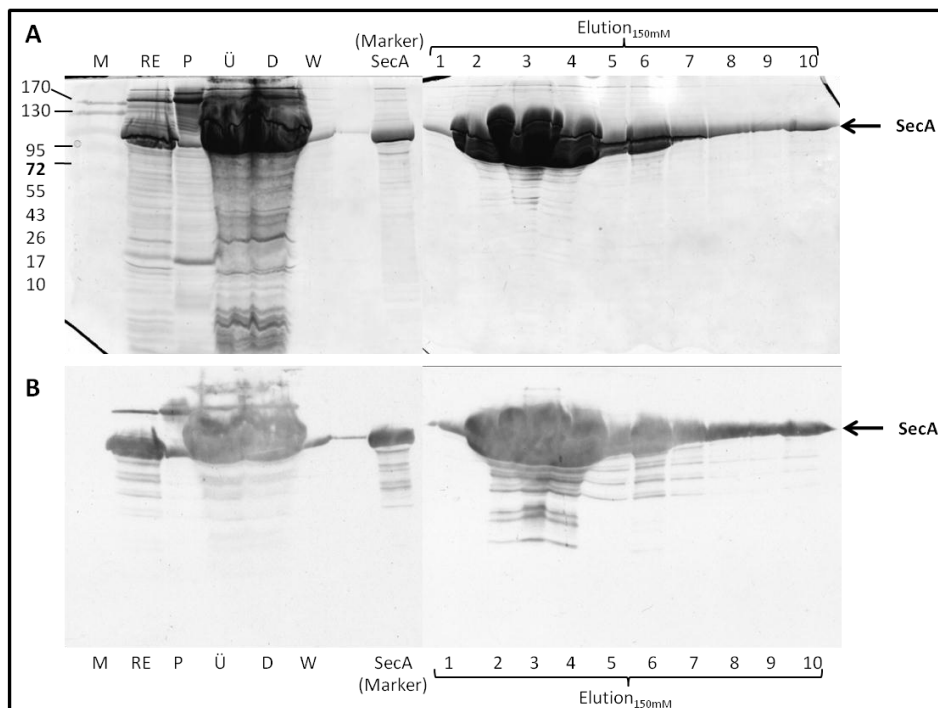


Abb38. **Reinigung von SecA**

Die SecA-Reinigung erfolgte über IMAC. Die Aliquots wurden über ein 12% SDS-PAGE aufgetrennt und die Banden mittels Coomassie Brilliant Blau (A) bzw. über Western Blot und anschließender Immunfärbung (B) mit dem spezifischen Antikörper gegen SecA nachgewiesen. M: Page Ruler Prestained Protein Ladder (5 µl), RE: Rohextrakt (1 µl), P: Pellet nach der Zentrifugation (3 µl), Ü: Überstand nach der Zentrifugation (10 µl), D: Durchlauf (10 µl), W: Waschschriff (10 µl), SecA: gereinigtes SecA-Protein als Kontrolle (10 µg), Elution<sub>150mM</sub> 1-10: Elutionen 1-10 mit 150 mM Imidazol (je 10 µl).

### 4.1.3. Reinigung der Translokase SecYEG

Für die *in vitro*-Translokationsexperimente wurde der Proteinkomplex in *E. coli* C43 (DE3)/pHis-EYG überexprimiert und mittels IMAC gereinigt. Hierfür wurden die Zellen durch die French Press aufgeschlossen (siehe Abb39, Spur RE) und das Zelllysate zentrifugiert, um die Membranfraktion (Spur P1) von der cytosolischen (Spur Ü1) zu trennen. Das Pellet wurde mit Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Proteinkomplex wurde durch Zugabe von 1,25% Octylglucosid solubilisiert, nicht solubilisiertes Protein separiert (Spur P3) und der Überstand 3 (Spur L) mit der mit Nickelionen beladenen Sepharose im „batch-Verfahren“ inkubiert. Der Hexahistidylrest an SecE ermöglicht das Immobilisieren des gesamten SecYEG-Komplexes an das Säulenmaterial und im Durchlauf (Spur D) war Protein SecY, SecE oder SecG zu erkennen. Der darauf folgende Waschschrift (Spur W) erfolgte mit 30 mM Imidazol und bewirkte das Entfernen von unspezifisch gebundenen Proteinen von der Säulenmatrix. Zusätzlich wurde dabei ein Austausch des Detergenz nach Dodecylmaltosid erreicht, was vermutlich nicht zum vollständigen Eliminieren von Octylglucosid führte. Eine abschließende Elution mit 330 mM Imidazol (Spuren Elution<sub>330 mM</sub> 1-10) in 0,05% Dodecylmaltosid erbrachte eine relativ konstant gleich bleibende Proteinkonzentration in den zehn Fraktionen. Die durch den BCA-Test erfolgte Proteinbestimmung erbrachte eine durchschnittliche Konzentration von ca. 1 mg/ml (zu jeweils 1 ml). Die Elutionen 3-10 (je 1 ml) wurden dialysiert, um das Imidazol zu entfernen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Für die Translokationsexperimente wurde die Elution 8 verwendet. Die Elutionen wurden mittels Immunfärbung mit einem Antikörper auf YidC überprüft. In keiner der Elutionen konnte YidC nachgewiesen werden, im Gegensatz zu Scotti und seinen Mitarbeitern (2000), welche die Co-Reinigung von YidC mit dem Sec-Komplex beobachteten.

## Ergebnisse

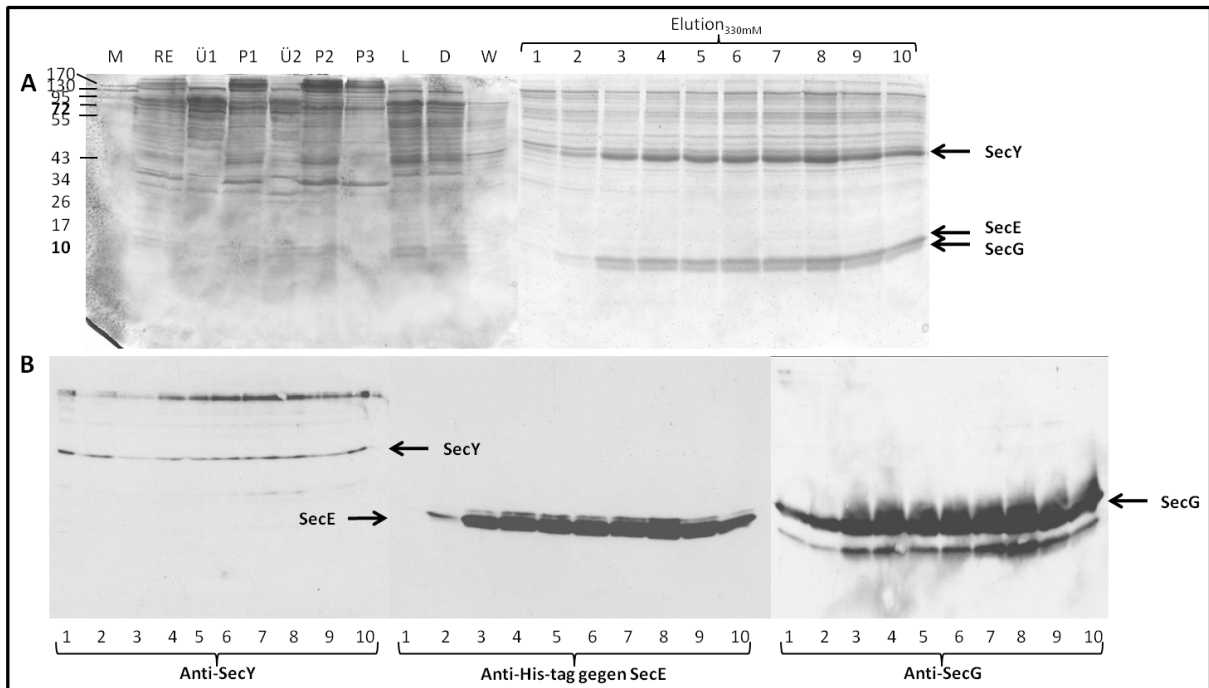


Abb39. **Reinigung von SecYEG**

Dargestellt sind die Schritte der SecYEG-Reinigung mittels IMAC. Die Aliquots wurden über ein 15% SDS-PAG aufgetrennt und die Banden mittels Coomassie Brilliant Blau (A) bzw. über Western Blot und anschließender Immunfärbung (B) visualisiert. Der Nachweis erfolgte mit den spezifischen Antikörpern gegen SecY und SecG, sowie dem gegen den His-tag, welcher sich an SecE befindet. M: Page Ruler Prestained Protein Ladder (5  $\mu$ l), RE: Rohextrakt (2  $\mu$ l), Ü1: Überstand nach der 1. Zentrifugation (5  $\mu$ l), P1: Pellet nach der 1. Zentrifugation (5  $\mu$ l), Ü2: Überstand nach der 2. Zentrifugation (5  $\mu$ l), P2: Pellet nach der 2. Zentrifugation (5  $\mu$ l), P3: Pellet nach der 3. Zentrifugation (5  $\mu$ l), L: Überstand nach der 3. Zentrifugation (10  $\mu$ l), D: Durchlauf (10  $\mu$ l), W: Waschschrift (10  $\mu$ l), Elution<sub>330mM</sub> 1-10: Elutionen 1-10 mit 330 mM Imidazol (je 10  $\mu$ l).

## 4.2. Reinigung von Substratproteinen

Verschiedene Substratproteine (siehe Abb40) in gereinigter Form wurden auf ihren Membraneinbaumechanismus durch die Insertase YidC und die Sec-Translokase untersucht. Bei diesen Proteinen handelte es sich unter anderem um den Vorläufer des Haupthüllproteins des Bakteriophagens M13 (M13 procoat), das Präprotein des Außenmembranproteins proOmpA, sowie Hybridproteine aus M13 procoat mit Teilen der Aminosäuresequenzen von proOmpA bzw. der Leaderpeptidase.

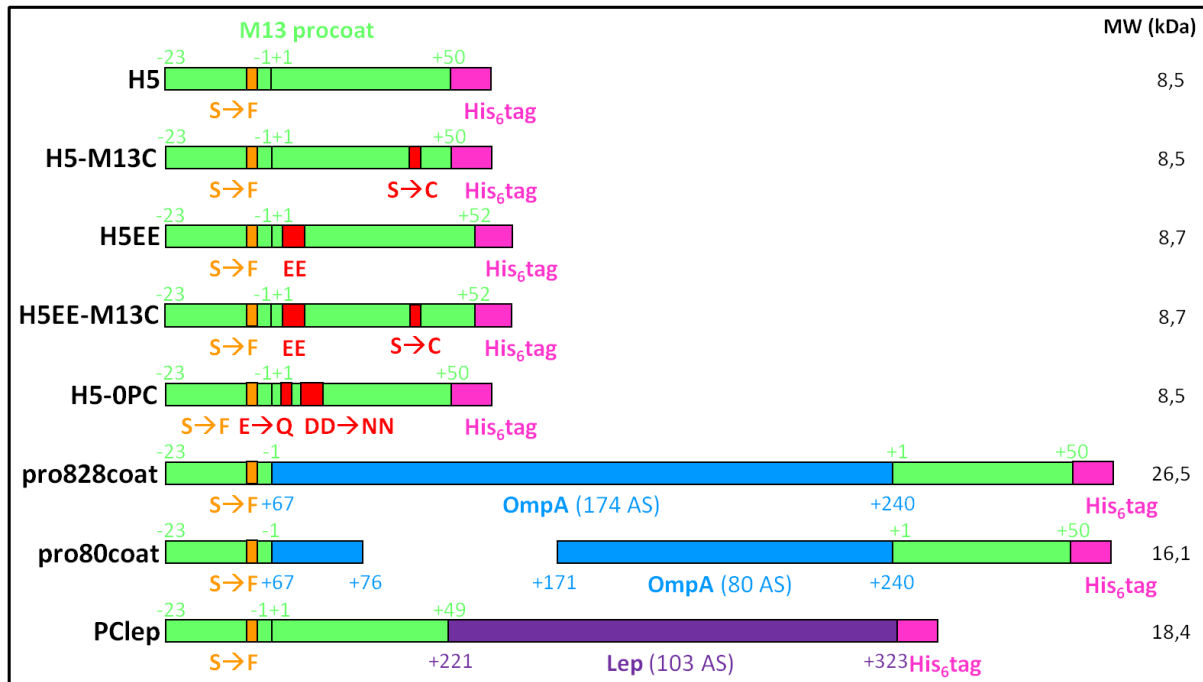


Abb40. **Schematische Darstellung der Varianten an M13 procoat-Proteinen**

Dargestellt sind die molekularen Modifikationen der Aminosäuresequenzen der unterschiedlichen M13 procoat-Proteine. Ausgehend vom wildtypischen M13 procoat wurden die Mutanten mit einem sechsfachen His-tag und einer H5-Mutation (Austausch Ser gegen Phe an der Position -3) versehen. Die Proteine H5EE und H5-OPC besitzen zusätzlich Modifikationen der Aminosäuresequenz zur Veränderung der Nettoladung des periplasmatischen Loops. Die Proteine Procoat H5-M13C und H5EE-M13C beinhalten einen Austausch von Ser gegen Cys an der Position +13. Die Proteine pro828coat und pro80coat besitzen neben der H5-Mutation eine Insertion von Teilen der Aminosäuresequenz +67 bis +240 von OmpA zwischen der Präsequenz und dem maturen Teil von M13 procoat. Das Protein PClep ist eine Fusion von M13 procoat H5 und carboxyterminal 103 AS der Aminosäuresequenz von Lep.

## 4.2.1. Reinigung von Procoatproteinen

### M13 procoat H5, Procoat H5-M13C, M13 procoat H5EE, Procoat H5EE-M13C, M13 procoat H5-OPC

Das Protein M13 procoat war molekulargenetisch mit einer Modifikation (H5) versehen, um die Prozessierungseffizienz der Leaderpeptidase herabzusetzen. Hierfür wurde ein Austausch der Aminosäure Serin gegen Phenylalanin (M13 procoat H5) an der Erkennungsregion der Leaderpeptidase (Position -3) vorgenommen (siehe Abb41). Somit konnte das Präprotein M13 procoat H5 (Kuhn & Wickner, 1985) unprozessiert isoliert werden, da die große Seitengruppe der Aminosäure Phenylalanin die Interaktion mit dem aktiven Zentrum der Leaderpeptidase unterbindet. Das Protein M13 procoat H5EE besitzt zudem eine Insertion von zwei Aminosäureresten Glutamat nach der Position +2, wodurch die Nettoladung des Proteins um zwei negative Ladungen auf -5 erniedrigt wurde (Roos *et al.*, 2001). Hierdurch wird die Membranintegration vollständig vom Membranpotential abhängig (Cao *et al.*, 1995). Die beiden Proteine Procoat H5-M13C bzw. H5EE-M13C tragen des Weiteren einen Austausch an der Position +13 von Serin gegen Cystein, an welcher eine Markierung mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Atto520-maleimid möglich wird. Das Protein M13 procoat H5-OPC (Samuelson *et al.*,

## Ergebnisse

2001) beinhaltet zusätzlich den Austausch der negativ geladenen Aminosäurereste Glutamat und Aspartat gegen die ungeladenen Aminosäurereste Glutamin und Asparagin an den Positionen +2 bzw. +4 und +5 (E2Q, D4N, D5N), wodurch der periplasmatische Bügel des Proteins keine Nettoladung trägt und das Protein vom Membranpotential unabhängig transloziert wird (Cao *et al.*, 1995).

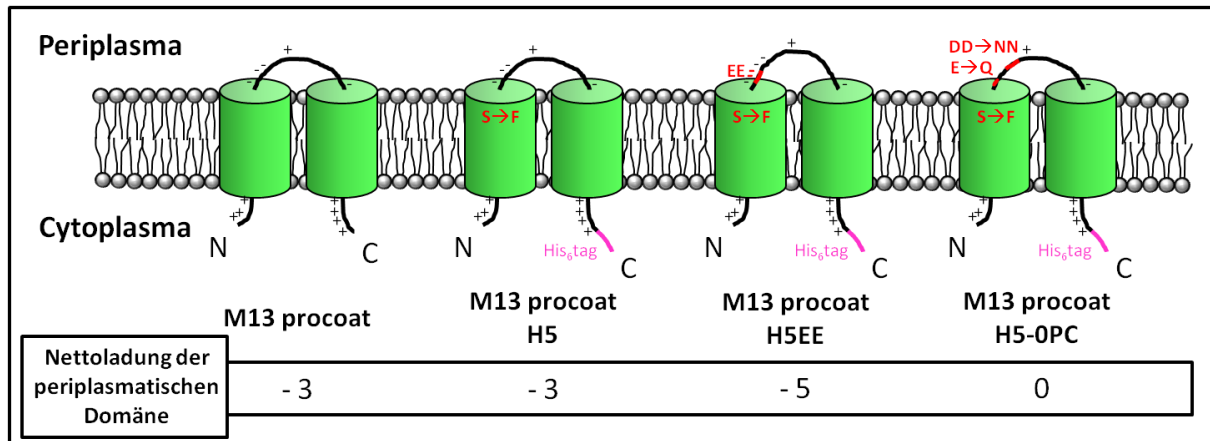


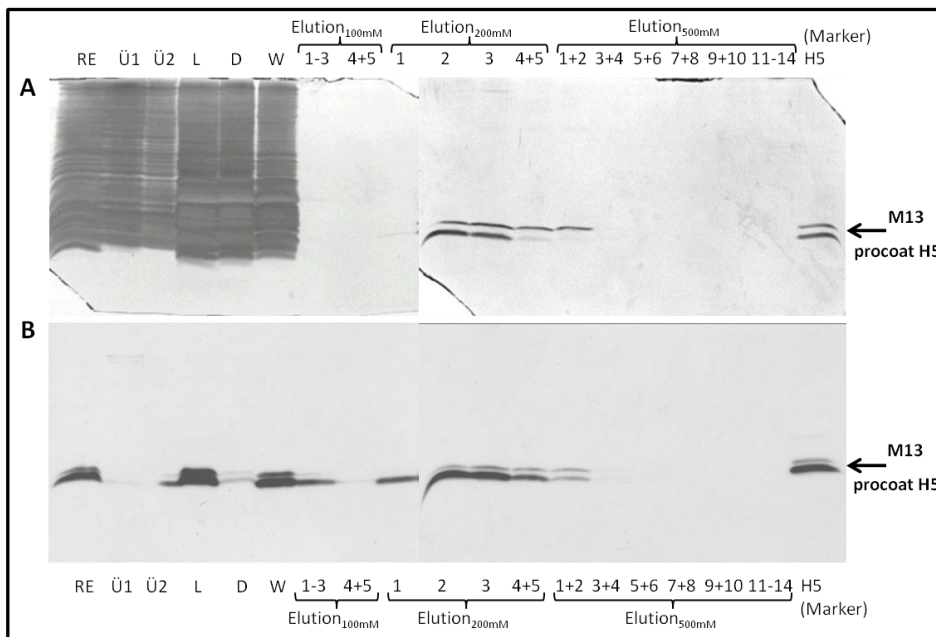
Abb41. Schematische Darstellung der M13 procoat-Proteine

Dargestellt sind die molekularen Modifikationen der unterschiedlichen M13 procoat-Proteine. Ausgehend vom wildtypischen M13 procoat wurden die Mutanten mit einem sechsfachen His-tag und einer H5-Mutation (Austausch Ser gegen Phe an der Position -3) versehen. Die Proteine H5EE und H5-OPC besitzen zusätzlich Modifikationen der Aminosäuresequenz zur Veränderung der Nettoladung des periplasmatischen Loops.

Das jeweilige Plasmid (pJQ H5 C-His<sub>6</sub>, pJQ H5-M13C C-His<sub>6</sub>, pJQ H5EE C-His<sub>6</sub>, pJQ H5EE-M13C C-His<sub>6</sub>) wurde in *E. coli* HB101-Zellen transformiert und die Zellen bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5 bei 37°C herangezogen. Nach erfolgter Induktion wurden die Zellen geerntet und durch die French Press aufgeschlossen (M13 procoat H5, siehe Abb42, Spur RE). Die Membranen wurden in einer ersten Zentrifugation von den cytosolischen Proteinen (Spur Ü1) separiert und durch das Aufnehmen in Puffer und anschließendem Zentrifugieren gewaschen. Der Überstand (Spur Ü2) wurde verworfen, während aus dem Pellet die Membranproteine durch die Zugabe von 1% Lauroylsarcosin solubilisiert wurden. Nicht solubilisierte Proteine und Membranfragmente wurden durch einen erneuten Zentrifugationsschritt abgetrennt und der Überstand (Spur L) auf die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Matrix geladen. Das inkubierte Säulenmaterial wurde in eine Minisäule überführt und der Durchfluss (Spur D) aufgefangen. Durch einen anschließenden Waschschritt (Spur W) wurden Verunreinigungen, die unspezifisch an die Säule gebunden hatten, entfernt. Die ersten beiden Elutionsstufen erfolgten mit je 10 ml 100 mM Imidazol (Spuren Elution<sub>100mM</sub> 1-5), sowie 200 mM Imidazol (Spuren Elution<sub>200mM</sub> 1-5) und abschließend folgte eine letzte Elution mit 20 ml 500 mM Imidazol (Spuren 13-18: Elution<sub>500mM</sub> 1-10), was zum vollständigen Entfernen der gebundenen Proteine von der Säulenmatrix führte. Das Protein wurde in den Elutionen 2 und 3 mit 200 mM Imidazol von der Säule eluiert. Das Protein M13 procoat H5 hatte in diesen

## Ergebnisse

Elutionen eine durchschnittliche Proteinkonzentration von 1 mg/ml zu je 2 ml Fraktionsvolumen. Die Proteinbestimmung erfolgte mithilfe der Bradford-Reagenz (siehe 3.18). Aus diesem Grund wurde nach jeder Reinigung eine Konzentrationsbestimmung mittels Tricin-SDS-PAGE vorgenommen. Die erkennbare Doppelbande, welche vom Antikörper gegen M13 coat erkannt wird, ist nicht erklärbar, eventuell handelte es sich um Konformationsvarianten des Proteins M13 procoat H5. Auch die anderen Mutanten von Procoat zeigten eine solche Doppelbande. Die relevanten Fraktionen wurden dialysiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.



### Abb42. Reinigung von M13 procoat H5

Dargestellt sind die Schritte der Reinigung der M13 procoat-Proteine H5, H5-M13C, H5EE und H5EE-M13C durch Ionenmetallaffinitätschromatographie (IMAC) am Beispiel M13 procoat H5. Die Reinigungen der anderen Proteine erfolgten nach gleicher Anleitung. Die Aliquots wurden über ein Tricin-SDS-PAGE aufgetrennt und die Banden mittels Silberfärbung (A) bzw. über Western Blot und anschließender Immunfärbung (B) nachgewiesen. Verwendet wurde eine Kombination der Antikörper AIII und RZ. RE: Rohextrakt (2 µl), Ü1: Überstand nach der 1. Zentrifugation (5 µl), Ü2: Überstand nach der 2. Zentrifugation (5 µl), L: Load = Überstand nach der 3. Zentrifugation, D: 1. Durchlauf (10 µl), W: Waschschrift (10 µl), Elution<sub>100mM</sub> 1-5: Elutionen 1-5 mit 100 mM Imidazol (gepoolt insgesamt 10 µl), Elution<sub>200mM</sub> 1-5: Elutionen 1-5 mit 200 mM Imidazol (gepoolt insgesamt 10 µl), Elution<sub>500mM</sub> 1-14: Elutionen 1-14 mit 500 mM Imidazol (gepoolt insgesamt 10 µl), H5: gereinigtes M13 procoat H5-Protein als Kontrolle (15 µg).

Die Reinigungsschritte erfolgten für die Proteine M13 procoat H5EE, H5-M13C und H5EE-M13C gemäß demselben Protokoll. Die Konzentration der Proteine (siehe Abb43) lag für M13 procoat H5EE bei ca. 2 mg/ml, für Procoat H5-M13C bei ca. 0,2 mg/ml und für Procoat H5EE-M13C bei ca. 0,5 mg/ml (bei jeweils 2 ml Volumen). Die Reinigung des Proteins M13 procoat H5-0PC (*E. coli* HB101/pJQ H5 AQGNN C-His<sub>6</sub>) erfolgte nach der Anleitung von Baud *et al.* (2005), unter denaturierenden Bedingungen mit 8 M Harnstoff. Die Proteinkonzentration von M13 procoat H5-0PC wurde mithilfe des Bradford-Tests bestimmt und betrug 2 mg/ml (500 µl).

## Ergebnisse

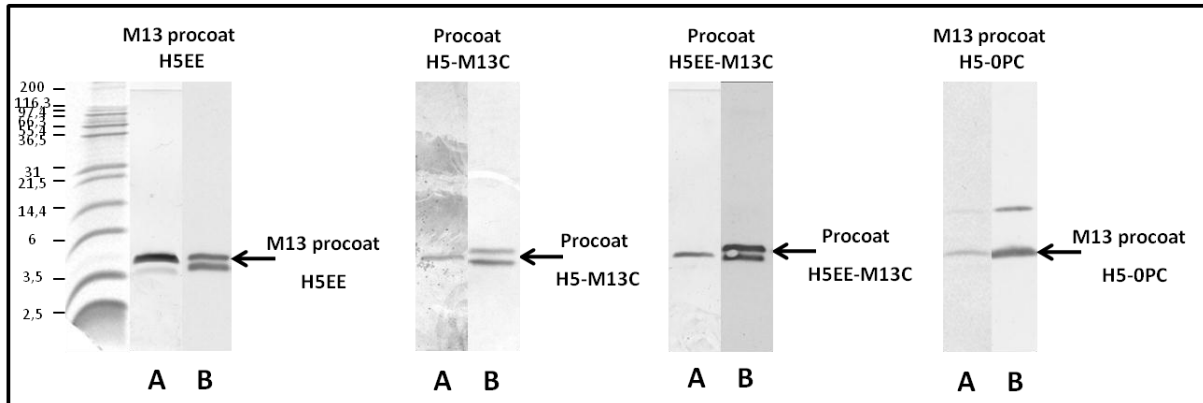


Abb43. **Darstellung der gereinigten M13 procoat-Proteine**

Dargestellt sind die verwendeten Elutionsfraktionen der Reinigungen der Procoatproteine H5EE, H5-M13C, H5EE-M13C und H5-0PC durch Ionenmetallaffinitätschromatographie (IMAC). Die Aliquots wurden über ein Tricin-SDS-PAG aufgetrennt und die Banden mittels Silberfärbung (A) bzw. über Western Blot und anschließender Immunfärbung (B) nachgewiesen. Verwendet wurde der M13-Antikörper, nur für das Protein M13 procoat H5-0PC wurde der His-tag-Antikörper verwendet. Dargestellt ist der Marker Mark12™ Unstained Standard (5 µl) und die für die weitergehenden Versuche verwendeten Elutionen der Reinigung von M13 procoat H5EE, Procoat H5-M13C, Procoat H5EE-M13C und M13 procoat H5-0PC.

### 4.2.2. Reinigung von Procoat-Hybridproteinen

#### Pro80coat, pro828coat und PClep

Um das Translokationsverhalten Sec-abhängiger und Sec-unabhängiger Proteine untersuchen zu können, wurden YidC und SecYEG in Lipidvesikel rekonstituiert und die Hybridproteine in diese Systeme transloziert. Die Hybridproteine pro828coat und pro80coat beinhalten die H5-Mutation und zusätzlich eine Insertion der Aminosäurereste (AS) +67 bis +240 von OmpA zwischen der Signalsequenz und dem maturen Teil von M13 coat (siehe Abb40 und Abb44), wodurch pro828coat für die Insertion in die Cytoplasmamembran die Translokase SecYEG und SecA (Kuhn, 1988) und zusätzlich YidC (Samuelson *et al.*, 2001) benötigt. Das Protein pro828coat (Kuhn, 1988) trägt eine Insertion der gesamten 174 Aminosäurereste. Das Protein pro80coat (Roos *et al.*, 2001) hingegen besitzt eine Insertion der Aminosäuresequenz von OmpA +67 bis +76, sowie +171 bis +240. Das Protein PClep (Kuhn *et al.*, 1986b) beinhaltet ebenfalls die H5-Mutation und eine Insertion von 103 Aminosäureresten (AS +221 bis +323) der Leaderpeptidase in der C-terminalen Region der Procoatsequenz hinter der Position +49. Es wird abhängig vom Membranpotential (Cao *et al.*, 1995) und YidC (Chen *et al.*, 2003) in die Membran integriert.

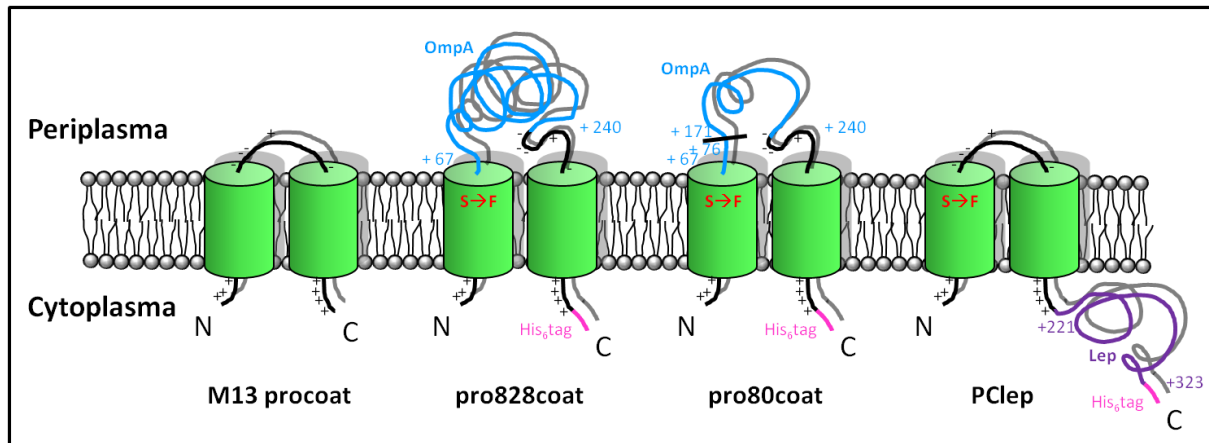


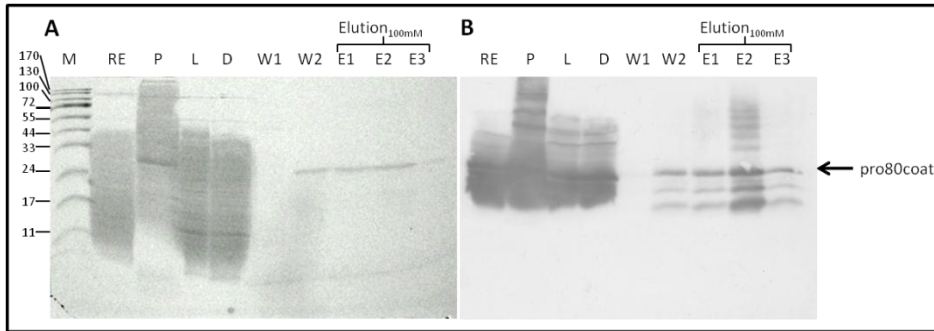
Abb44. **Schematische Darstellung der Hybridproteine aus M13 procoat und Teilen der Aminosäuresequenz der Proteine OmpA bzw. Leaderpeptidase (Lep)**

Dargestellt sind die molekularen Modifikationen der unterschiedlichen M13 procoat-Hybridproteine. Ausgehend von dem Protein M13 procoat wurden die Mutanten mit einem sechsfachen His-tag und einer H5-Mutation (Austausch von Ser gegen Phe an der Position -3) versehen. Die Proteine pro828coat und pro80coat besitzen zusätzlich eine Insertion von Teilen der Aminosäuresequenz +67 bis +240 von OmpA zwischen der Präsequenz und dem murenen Teil von M13 procoat. Das Protein PClep trägt eine Modifikation von 103 AS der Aminosäuresequenz +221 bis +323 von Lep nach dem murenen Teil von M13 procoat.

Das Plasmid kodierend für pro80coat (Plasmid pQNΔ80C-His<sub>6</sub>) wurde in *E. coli* HB101 transformiert, bei einer OD<sub>600nm</sub> von 0,7 mit Arabinose induziert und die Zellen nach erfolgter Expression geerntet. Die Zellen wurden durch die Zugabe von Lysozym, DNase II und MgCl<sub>2</sub> aufgeschlossen (siehe Abb45, Spur RE) und durch die Zugabe von 8 M Harnstoff vollständig lysiert. Die solubilisierten Membranproteine (Spur L) wurden von den Zelltrümmern (Spur P) separiert und mit der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose im „batch-Verfahren“ inkubiert, um das Protein mithilfe seines His-tags an das Säulenmaterial zu immobilisieren. Nach der Inkubation wurde das Material in eine Minisäule überführt und der Durchfluss (Spur D) aufgefangen. Unspezifisch an die Matrix gebundene Proteine wurden durch zwei aufeinander folgende Waschschritte (Spuren W1 und W2) von dieser verdrängt und das Protein mit 150 mM Imidazol von der Säule eluiert (Spuren Elution<sub>150mM</sub> 1-3). Die Bindung des pro80coat an die Matrix war nicht spezifisch, da das Protein bereits mit 50 mM Imidazol (W2) von der Säule verdrängt wurde. Das war eventuell auf den nur sechsfachen His-tag zurückzuführen, der möglicherweise durch die Zugabe von Harnstoff ein anderes Verhalten aufwies. Die Fraktionen wurden dialysiert, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Das Protein pro80coat hatte in den Elutionen 1 und 2 eine durchschnittliche Proteinkonzentration von 1 mg/ml (je 1 ml). Die Proteinbestimmung erfolgte mithilfe der Bradford-Reagenz und durch ein 15%-iges SDS-PAGE.



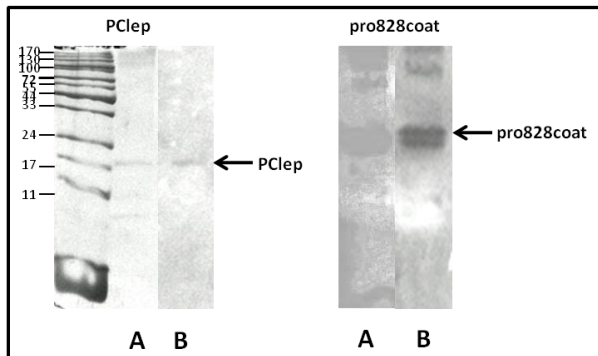
## Ergebnisse



### Abb45. Reinigung des Hybridproteins pro80coat

Dargestellt sind die Schritte der Reinigung der denaturierenden Reinigungsmethode mittels 8 M Harnstoff über IMAC am Beispiel pro80coat. Die Reinigung des pro828coat erfolgte nach gleicher Anleitung. Die Aliquots wurden über ein 15% SDS-PAGE aufgetrennt und die Banden mittels Coomassiefärbung (A) bzw. über Western Blot und anschließender Immunfärbung (B) nachgewiesen. Verwendet wurde der Antikörper AII. M: Page Ruler Prestained Protein Ladder (5  $\mu$ l), RE: Rohextrakt (2  $\mu$ l), P: Pellet nach der Zentrifugation, L: Load = Überstand nach der Zentrifugation, D: Durchlauf (10  $\mu$ l), W1: Waschschrift 1 ohne Imidazol (10  $\mu$ l), W2: Waschschrift 2 mit 50 mM Imidazol (10  $\mu$ l), Elution<sub>150mM</sub> 1-3: Elutionen 1-3 mit 150 mM Imidazol.

Das Protein pro828coat wurde nach demselben Protokoll aus *E. coli* HB101/pET22 H5-OmpA C-His<sub>6</sub> gereinigt und hatte ebenfalls eine Konzentration von 1 mg/ml zu 1 ml Gesamtvolumen (siehe Abb46). Die Reinigung des Hybridproteins PClep (siehe Abb46) erfolgte gemäß der Anleitung der nativen Procoatreinigung (vergleiche 3.17) aus *E. coli* C41/pMS H5-Lep C-His<sub>6</sub>. Die Proteinkonzentration von PClep wurde mithilfe des Bradford-Tests, sowie einem quantitativen 15% SDS-PAGE bestimmt und betrug 0,5 mg/ml (1 ml).



### Abb46. Darstellung der für die weiterführenden Versuche verwendeten Elutionen von PClep und pro828coat

Die Aliquots wurden über ein 15%-iges SDS-PAGE aufgetrennt und die Banden mittels Silberfärbung (A) bzw. über Western Blot und anschließender Immunfärbung (B) nachgewiesen. Für den Immunblot wurde der M13 procoat-Antikörper AII verwendet. Dargestellt ist der Marker Page Ruler Prestained Protein Ladder (5  $\mu$ l) und die für die weitergehenden Versuche verwendete Elutionen der Reinigungen von PClep und pro828coat.

### 4.2.3. Reinigung von proOmpA

Um das mit einem His-tag modifizierte Protein proOmpA reinigen zu können, wurde das Plasmid pTYE009-proOmpA-C-His<sub>6</sub> in *E. coli* TYE056 transformiert. Der *E. coli*-Stamm TYE056 besitzt eine temperatursensitive Mutation im *secY*-Gen (*secY24<sup>ts</sup>*), wodurch der Sec-Komplex bei höheren Temperaturen instabil wird. Durch die Wachstumstemperatur von 37°C wird somit die Translokation und Prozessierung von Präproteinen wie proOmpA behindert. Die Zellen wurden mithilfe der French Press aufgeschlossen (siehe Abb47, RE) und die löslichen Proteine wie auch die Membranproteine durch die Zugabe von Harnstoff denaturiert. Durch eine anschließende Zentrifugation wurden Zellfragmente (Spur P) von den denaturierten Proteinen (Spur Ü) separiert, welche dann über mit Nickelionen beladene Säulenmaterialien gereinigt wurden. Nach einstündiger Inkubation im „batch-Verfahren“ mit der Matrix wurde die Suspension in eine Minisäule überführt und der Durchfluss (Spur D) aufgefangen. Der Anteil an ungebundenem proOmpA im Durchlauf war sehr gering, was darauf hindeutet, dass die Affinität des sechsfachen His-tags zur Säulenmatrix ausreichend war. Durch zwei aufeinander folgende Waschschrte zunächst ohne (Spur W1) und dann mit 50 mM Imidazol (Spur W2) wurden Verunreinigungen von der Säule entfernt. Ein geringer Anteil an proOmpA wurde dabei ebenfalls von der Säule gewaschen, was eventuell darauf zurückzuführen sein könnte, dass nicht genügend Säulenmaterial eingesetzt wurde. Es erfolgte die Elution (Spuren E1-3) mit 150 mM Imidazol, welche zu je 1 ml fraktioniert wurde. Die Fraktionen wurden dialysiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Detektion von proOmpA in den Fraktionen erfolgte mittels Coomassie-Färbung (siehe Abb47), das Protein wurde auch immunologisch durch den spezifischen Antikörper gegen OmpA erkannt. Die Konzentration der Elutionen wurde mittels Bradford-Test und einem quantitativen 15%-igen SDS-PAGE durchgeführt. Die Elution 2 enthält eine ungefähre proOmpA-Konzentration von 0,8 mg/ml bei einem Gesamtvolumen von 1 ml.

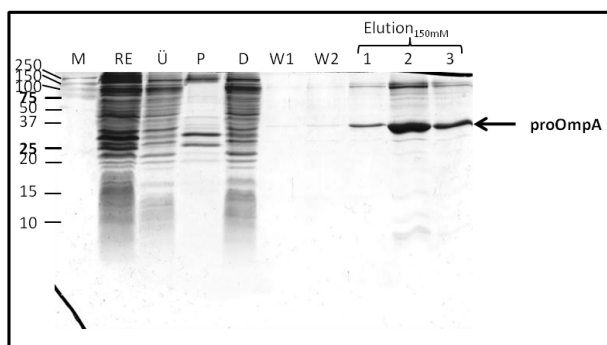


Abb47. **Reinigung von proOmpA**

Die Reinigung von proOmpA erfolgte mittels IMAC. Die Aliquots wurden über ein 15% SDS-PAGE aufgetrennt und die Banden mittels Coomassie Brilliant Blau nachgewiesen. M: Precision Plus Protein Standard (5 µl), RE: Rohextrakt (1 µl), Ü1: Überstand nach der Zentrifugation (3 µl), P1: Pellet nach der Zentrifugation (3 µl), D: Durchlauf (10 µl), W1: Waschschrte ohne Imidazol (10 µl), W2: Waschschrte mit 50 mM Imidazol (10 µl), Elution<sub>150mM</sub> 1-3: Elutionen 1-3 mit 150 mM Imidazol (je 10 µl).

### 4.3. Translokation von gereinigten Membranproteinen in invertierte Innenmembranvesikel (INV)

Die *in vitro*-Membraninsertion in Liposomen, YidC-Proteoliposomen oder SecYEG-Proteoliposomen wurde mit gereinigten Proteinen durchgeführt. Zunächst wurden die Proteine mit einer C-terminalen His-tag-Modifikation versehen und mittels IMAC gereinigt. Die gereinigten Proteine wurden vor Durchführung der Experimente mit 1 M Guanidiniumhydrochlorid versetzt, um diese in einen entfalteten Zustand zu bringen. Einige Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen (in 8 M Harnstoff) gereinigt. Die Membraninsertion wurde unmittelbar nach einer Verdünnung des denaturierenden Agens von 1/230 untersucht.

In diesem Versuch sollte die Translokationskompetenz der über die Ionenmetallaffinitätschromatographie gereinigten Substrate überprüft werden. Als Kriterium für die erfolgte Insertion in die invertierten Cytoplasmamembranvesikel (INV) wurde ein Verdau mit Proteinase K durchgeführt, um eventuell nicht inseriertes Protein zu verdauen. Für die Translokationsexperimente mit INV wurde ein Membranextrakt aus *E. coli* BL21 präpariert und die INV mittels eines Saccharosegradienten von den übrigen Bestandteilen der Membranfraktion separiert. Die INV wurden vor der Verwendung nicht mit Harnstoff gewaschen und enthielten somit membranassoziiertes SecA, was für die erfolgreiche Versuchsdurchführung von Bedeutung war. Die Translokation erfolgte für 30 min bei 37°C unter leichtem Rühren mit je 30 µg INV und 1 µg Substrat. Durch die Zugabe von 5 mM ATP und 5 mM MgCl<sub>2</sub> konnte die Funktionalität von SecA unterstützt werden.

Die Procoatproteine H5 und H5EE wurden in INV relativ effizient eingebaut (siehe Abb48). Das Protein M13 procoat H5 wird *in vivo* Sec-unabhängig mit der Hilfe von YidC und dem Membranpotential in die innere Membran von *E. coli* inseriert (Samuelson *et al.*, 2000 und 2001). Die Einbaurate *in vitro* lag bei nur ca. 30%. Das Protein M13 procoat H5EE wurde zu ca. 60% in die INV inseriert, wurde aber von der Protease nicht vollständig verdaut. *In vivo* ist es sowohl Sec-abhängig, wird aber auch mit der Hilfe von YidC und der protonenmotorischen Kraft in die Membran integriert (Samuelson *et al.*, 2000; Baud *et al.*, 2005).

## Ergebnisse

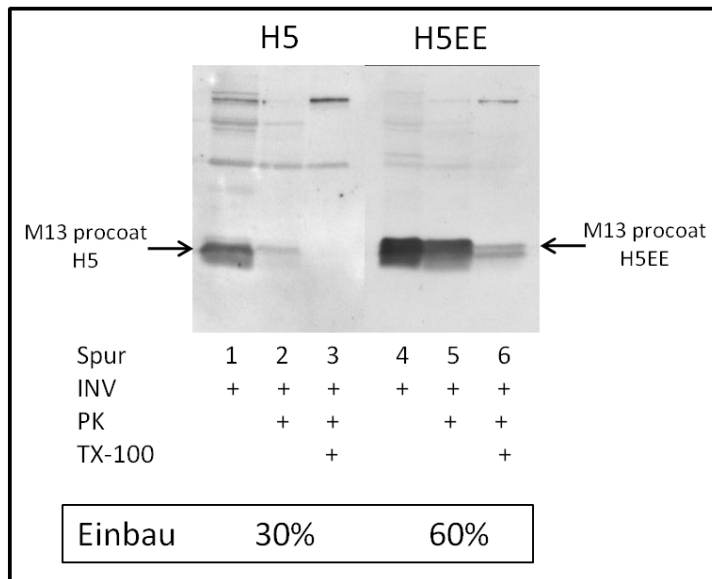


Abb48. **Translokation von M13 procoat H5 bzw. H5EE in invertierte Innenmembranvesikel (INV)**

Die Translokation der gereinigten Proteine in INV wurde für 30 min bei 37°C durchgeführt. Die erfolgte Insertion in die Membranvesikel wurde durch die Zugabe von Proteinase K in Ab- und Anwesenheit (PK +) von Detergenz überprüft. Die Proben von H5 (Spuren 1-3) und H5EE (Spuren 4-6) wurden mit 15% TCA gefällt, über ein Tricin-SDS-PAGE aufgetrennt, durch Western-Blotting transferiert und anschließend mittels Immunfärbung mithilfe des M13-Antikörpers nachgewiesen. Die Spur 1 zeigt die Gesamtmenge an eingesetztem M13 procoat H5, Spur 2 wurde mit Proteinase K versetzt und Spur 3 zusätzlich mit Triton X-100. Die Spuren 4-6 zeigen analog das Protein M13 procoat H5EE.

Die Translokation des Sec-Substrates proOmpA in INV wies eine Einbaurrate von 33% auf (siehe Abb49). Die Translokation von proOmpA über die cytoplasmatische Membran von *E. coli* erfolgt schrittweise (Wickner & Economou, 1994) durch das wiederholte Binden von SecA und der Hydrolyse von ATP. Den INV wurde für die Durchführung des Experimentes kein gereinigtes SecA zusätzlich zugegeben. Dieses war ausschließlich membranassoziiert vorhanden, wodurch eventuell der Transport von proOmpA durch die Membran nicht optimal war. Zusätzlich wird das Targeting von proOmpA zur Membran durch SecB vermittelt, welches dem Ansatz in gereinigter Form fehlte. Die Translokationsrate der Hybridproteine pro828coat (Stiegler *et al.*, 2011) und pro80coat aus M13 procoat und Teilen von OmpA war mit 82% für pro828coat und 90% für pro80coat sehr effizient. *In vivo* sind diese Proteine abhängig von SecA und SecY (Roos *et al.*, 2001). Das Hybridprotein PClep mit 103 Aminosäureresten der Leaderpeptidase inseriert *in vivo* abhängig von YidC und dem Membranpotential, aber unabhängig vom Sec-Komplex (Samuelson *et al.*, 2001) in die Innenmembran. Die Insertion in die INV erfolgte zu 25% und hatte die Bildung eines 7 kDa großen Procoat-Fragmentes zur Folge, welches durch \* gekennzeichnet wurde (Spur 11). Da der Proteaseverdau unvollständig war, blieb ein Großteil von PClep intakt.

## Ergebnisse

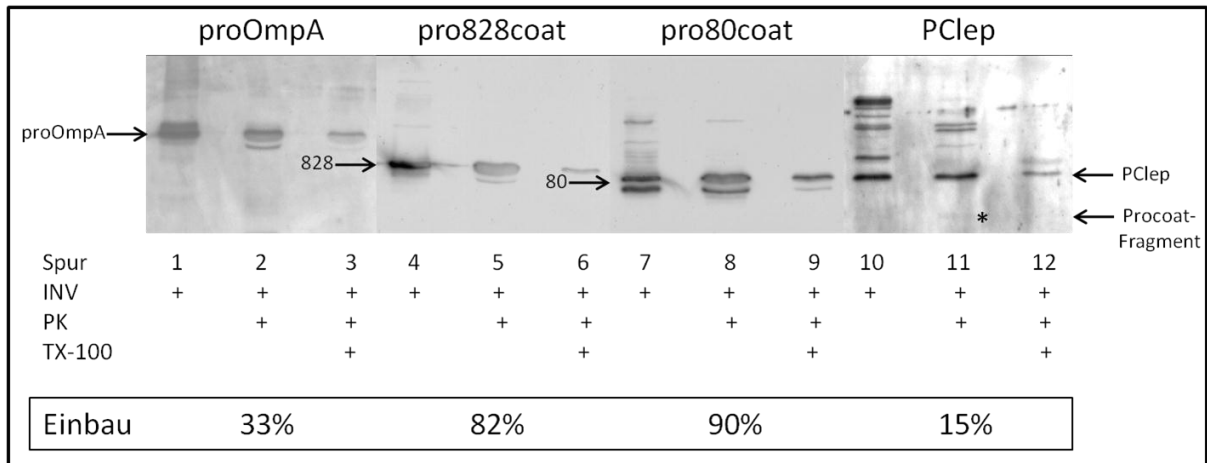


Abb49. **Translokation von proOmpA, sowie der Hybridproteine pro828coat, pro80coat und PClep in invertierte Innenmembranvesikel (INV)**

Die Translokation der gereinigten Proteine in INV wurde für 30 min bei 37°C durchgeführt. Die erfolgte Insertion in die Membranvesikel wurde durch die Zugabe von Proteinase K in Ab- und Anwesenheit (PK +) von Detergenz überprüft. Die Proben wurden mit 15% TCA gefällt, proOmpA (Spuren 1-3), sowie die OmpA-Hybridproteine pro828coat (Spuren 4-6) und pro80coat (Spuren 7-9) bzw. das Lep-Hybridprotein PClep (Spuren 10-12) mittels 15%-igem SDS-PAGE aufgetrennt. Die anschließende Immunfärbung erfolgte für die OmpA-enhaltenden Proteine mittels des OmpA-Antikörpers und für PClep durch den M13-Antikörper AI. Die Spuren 1, 4, 7 und 10 zeigen jeweils die Gesamtmenge an eingesetztem Protein, die Spuren 2, 5, 8 und 11 den Proteinase K-Verdau der jeweiligen Proteine und die Spuren 3, 6, 9 und 12 wurden zusätzlich mit Triton X-100 behandelt. \* markiert das entstandene 7 kDa große Procoat-Fragment von PClep nach dem Verdau der carboxyterminalen Lep-Sequenz.

## 4.4. Herstellung von Phospholipidvesikeln

Die Lipidextrakte aus *E. coli* (Avanti Polar Lipids Inc.) wurden zunächst auf ihre Reinheit überprüft, da für die *in vitro*-Translokationsexperimente Lipidvesikel ohne Proteinanteile verwendet werden sollten. Schon kleinste Mengen an Verunreinigungen können dazu führen, dass die Liposomen für Ionen, aber auch kleine Proteine durchlässig werden. In diesen Fällen kann eine YidC- oder SecYEG-Abhängigkeit nicht mit Bestimmtheit nachgewiesen und kein stabiles Membranpotential erzeugt werden. Der *E. coli* Gesamtextrakt bestand zu 57,5% aus Phosphatidylethanolamin (PE), zu 15,1% aus Phosphatidylglycerol (PG) und zu 9,8% aus Cardiolipin (CL), zusätzlich beinhaltete dieser Lipidextrakt 17,6% andere Bestandteile. Um den *E. coli* Polarextrakt zu erhalten, wurde der *E. coli* Gesamtextrakt bei der Herstellung bei Avanti Polar Lipids Inc. mit Aceton gefällt und mit Diethylether extrahiert. Nach der Acetonfällung bestand der Polarextrakt zu 67% aus PE, zu 23,2% aus PG und zu 9,8% CL. Zur Bestimmung der Reinheit von Phospholipiden wurde die Dünnschichtchromatographie (DC) angewandt. Die in Chloroform gelösten Lipide wurden hierfür auf eine Dünnschichtchromatographieplatte mittels eines Kapillarröhrchens aufgetragen (3 Tropfen) und anschließend visualisiert. Die in den *E. coli* Polar- und Gesamtextrakten vorhandenen Lipidspuren wie PE, PG und CL wurden durch Färbung mit Iod sichtbar gemacht. Vorhandene Aminogruppen in Spuren von Proteinen, aber

## Ergebnisse

auch im Phospholipid PE wurden durch Färbung mit Ninhydrin und dem daraus resultierenden „Ruhmann’schen Purpur“ nachgewiesen.

Die Färbung mit Iod machte alle Lipidbestandteile sichtbar (siehe Abb50). Die Phospholipide PE (719 Da) und PG (757 Da), sowie CL (1436 Da) wurden kommerziell in reiner Form erworben (Avanti Polar Lipids Inc.) und als Kontrolle aufgetragen. PE und PG liefen aufgrund ihrer Größe beinahe auf gleicher Höhe, jedoch waren sie durch die Ninhydrinfärbung zu unterscheiden, da hierbei nur die Aminogruppe des PE sichtbar wurde. Das Phospholipid CL war nur in stark verdünnter Form aufgetropft worden und ist deshalb nur schwach zu erkennen. Kurz unter der Lauffront sind in den Lipiden teilweise freie Fettsäuren, sowie über den Startpunkten deren Abbauprodukte sichtbar, welche die Qualität der Lipide herabsetzen und Spontaneinbau bewirken können. Diese sind aber weder im *E. coli* Gesamt- noch im Polarextrakt zu sehen, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass es bei den Lipidextrakten nicht zur Autooxidation der Lipidmoleküle gekommen war. Bei der Färbung mit Ninhydrin war ersichtlich, dass in dem *E. coli* Gesamtextrakt ein Restanteil an Proteinen vorhanden war, da es zu einer Färbung des Auftropfpunktes gekommen war. Dies entspräche auch den Herstellerangaben, welche einen Anteil an anderen Bestandteilen von 17,6% ausweisen, zu denen auch unterschiedlich große Mengen an Proteinen gehören könnten.

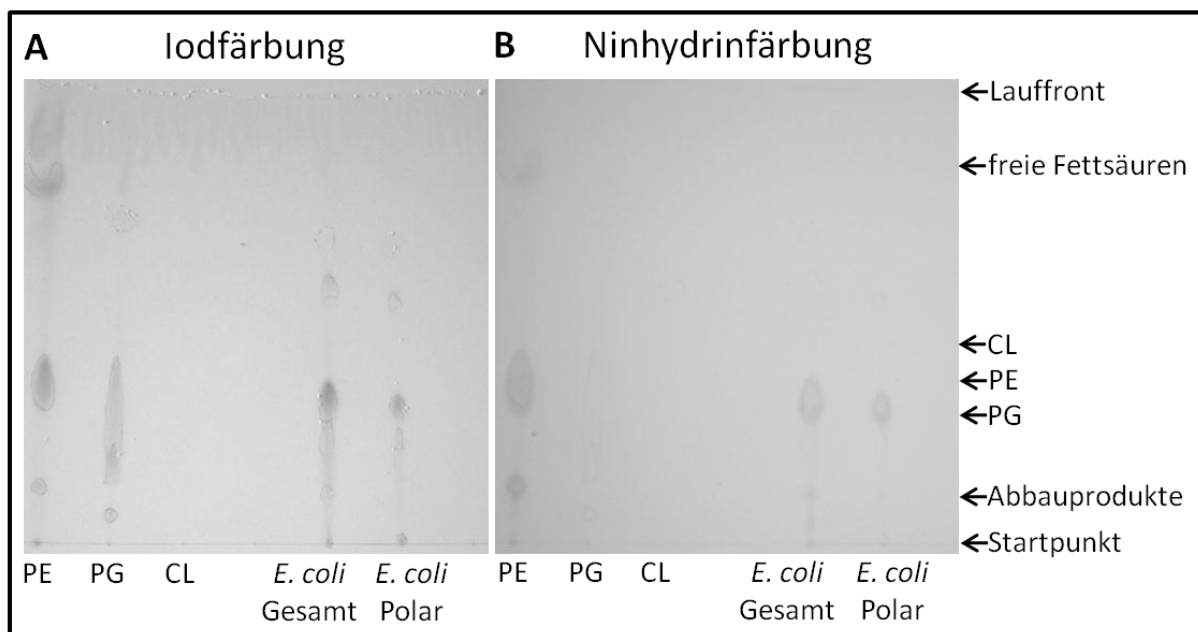


Abb50. **Dünnschichtchromatogramm der *E. coli* Gesamt- und Polarlipidextrakte**

Die Dünnschichtchromatographie wurde auf einer Silicagelplatte in einem Laufmittel aus  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$  in den Verhältnissen 85:30:4 (v/v/v) durchgeführt. Nach dem Trocknen wurde die DC-Platte reversibel mit Iod gefärbt (A) und die Lipidspuren mit einem Bleistift markiert. Nach dem Entfernen des Iods erfolgte die Ninhydrinfärbung (B), um Aminogruppen zu visualisieren. Aufgetragen wurde jeweils PE, PG und CL in reiner Form, sowie der *E. coli* Gesamt- und der Polarextrakt von Avanti.

## Ergebnisse

Die Durchführung einer Acetonfällung war notwendig, um die Proteinreste im *E. coli* Gesamtextrakt zu entfernen. Bei dem *E. coli* Polarextrakt von Avanti war dies nicht von Nöten, da dieser durch die Herstellung keine Anteile an Protein enthielt. Die Lipide wurden in Dichlormethan (DCM) gelöst, mit einem 10-fachen Überschuss an eiskaltem Aceton versetzt und für 2 h bei -20°C inkubiert. Hierbei wurden Teile der freien Fettsäuren und deren Abbauprodukte entfernt, welche sich anschließend gelöst im 1. Acetonüberstand (1. AÜ) befanden (siehe Abb51). Bei diesen Abbauprodukten könnte es sich um Lyso-PE bzw. Lyso-PG handeln, da die beiden höherlaufenden Abbauprodukte sowohl mit Iod als auch mit Ninhydrin angefärbt wurden (Lyso-PE), während die unterste nur mit Iod nachgewiesen wurde (Lyso-PG). Eine erneute Fällung mit Aceton führte zu keiner weiteren Reinigung, weshalb der *E. coli* Gesamtextrakt zukünftig nur einmalig mit eiskaltem Aceton gefällt wurde. Er war frei von Proteinen und anderen Verunreinigungen und konnte für Translokationsexperimente verwendet werden.

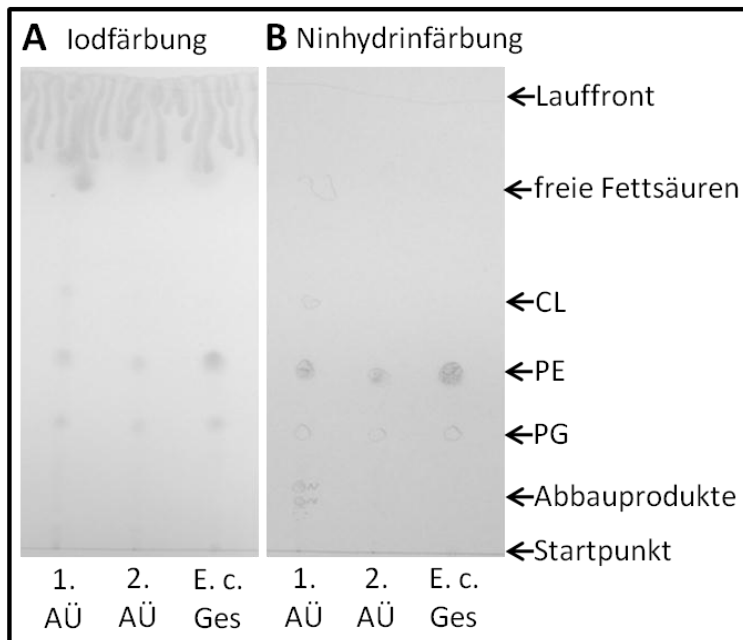


Abb51. **Dünnschichtchromatogramm einer Acetonfällung des *E. coli* Gesamtextraktes**

Die Dünnschichtchromatographie wurde auf einer Silicagelplatte in einem Laufmittel aus  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$  in den Verhältnissen 85:30:4 (v/v/v) durchgeführt. Nach dem Trocknen wurde die DC-Platte reversibel mit Iod gefärbt (A) und die Lipidspuren mit einem Bleistift markiert. Nach dem Entfernen des Iods erfolgte die Ninhydrinfärbung (B), um Aminogruppen zu visualisieren. Aufgetragen wurde der 1. und 2. Acetonüberstand (1. bzw. 2. AÜ) und der *E. coli* Gesamtextrakt (E. c. Ges) nach der Acetonfällung.

## 4.5. Transmembranpotential als Qualitätsnachweis der Liposomen

Für das Gelingen der Translokationsexperimente mit Substratproteinen war es von großer Bedeutung, dass kein Spontaneinbau von kleinen Proteinen wie M13 procoat in die Liposomen stattfinden konnte. Dieser Spontaneinbau erfolgt ohne das Vorhandensein von YidC oder SecYEG nur durch die instabile Integrität der Vesikelmembran. Ist der Zusammenhalt der Lipidmoleküle nicht ausreichend, wird die Membran undicht und kleine Membranproteine können sich einlagern. Die Integrität der Membran konnte durch die Stabilität eines Membranpotentials über einen Zeitraum von 20 min überprüft werden. Das Membranpotential von Bakterien entsteht durch die asymmetrische Verteilung von geladenen Ionen über der Cytoplasmamembran, was durch verschiedene Ionenpumpen ermöglicht wird. Dieses Transmembranpotential kann in künstlichen Lipidvesikeln als Folge eines Kalium-Diffusionspotentials simuliert werden. Hierfür wird ein Kaliumgradient mithilfe von Valinomycin über die Vesikelmembran generiert. Das Antibiotikum Valinomycin nimmt in wässrigem Medium eine Konformation ein, bei welcher die polaren Aminosäurereste mit dem Wasser in Wechselwirkung treten. Befindet es sich hingegen in dem hydrophoben Milieu der Membran, so bildet es eine Käfigstruktur, die den Durchtritt von Kaliumionen ermöglicht. Valinomycin ist ein spezifischer Kaliumtransporter und bindet mit den polaren Aminosäuren die  $K^+$ -Ionen. Im Inneren des Liposoms befinden sich Natriumionen durch Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM  $Na_2SO_4$ , pH 8.0), während der umgebende Puffer K (10 mM HEPES, 100 mM  $K_2SO_4$ , pH 8.0) Kaliumionen beinhaltet. Durch die Bildung eines Komplexes aus einem  $K^+$ -Ion und Valinomycin, welcher nach dem Durchtreten durch die Membran an der gegenüber liegenden Seite dissoziiert, werden die Kaliumionen transportiert. Das kleinere Natriumion vermag nicht mit Valinomycin zu interagieren und verbleibt somit im Lumen des Vesikels. Das künstliche Membranpotential stellt somit ein Überschuss an positiven Ladungen im Inneren des (Proteo-) Liposoms („inside-positive potential“) durch die ungleiche Verteilung von Natriumionen ausschließlich innen und einem Diffusionsgleichgewicht von Kaliumionen beiderseits der Membran dar. Im Inneren befindet sich somit eine theoretische Konzentration von 200 mM  $Na^+$  und ca. 200 mM  $K^+$ , während außen noch ungefähr 200 mM  $K^+$  vorhanden sind. Der Ladungsunterschied zwischen dem deutlich kleineren Volumen des Vesikellumens und dem größeren Volumen des umgebenden Mediums ermöglicht die Simulation eines Transmembranpotentials.

Als Kontrolle für die Messung des Membranpotentials wurden Liposomen verwendet, die in Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM  $Na_2SO_4$ , pH 8.0) bzw. in Puffer K (10 mM HEPES, 100 mM  $K_2SO_4$ , pH 8.0) mithilfe der Extrudermethode (siehe 3.27., Serek *et al.*, 2004) hergestellt wurden und nach der folgenden Zentrifugation erneut in jeweils demselben Puffer resuspendiert



## Ergebnisse

wurden. Die Herstellung der großen unilamellaren Vesikel (LUV) erfolgte gemäß der Anleitung von Ridder und Mitarbeitern (2001). Das Entfernen des Lösungsmittels, wie DCM oder Chloroform, erfolgte unter Stickstoffatmosphäre an einer Vaccumpumpe, das Resuspendieren der Lipide erfolgte in entgastem Wasser. Die Vesikel wurden vor der Verwendung zehnmal durch einen 0,4 µm Polycarbonatfilter extrudiert. Der Aufbau und die Verwendung des Extruders von Avanti Polar Lipids ist in MacDonald *et al.* (1991) beschrieben. Auf die Liposomen, welche mit Natriumionen innen und außen hergestellt wurden, hatte die Zugabe von Valinomycin keine Auswirkung, da Natriumionen von diesem Kanal nicht transportiert werden können (siehe Abb52 **A**). Die Liposomen mit Kaliumionen innen und außen bildeten ebenfalls kein Membranpotential (**B**), da sich durch die Zugabe von Valinomycin ein Kaliumionengleichgewicht zwischen innen und außen bildete. Ein Membranpotential konnte nur gemessen werden, wenn ein Ionengradient über die Vesikelmembran bestand.

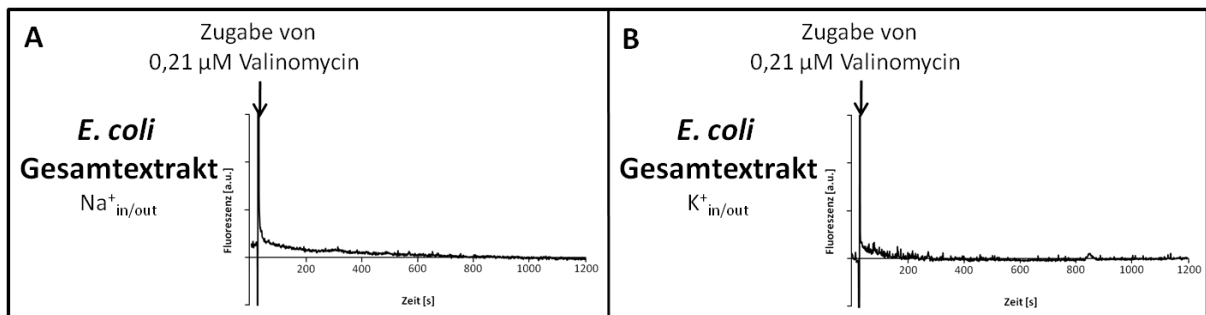


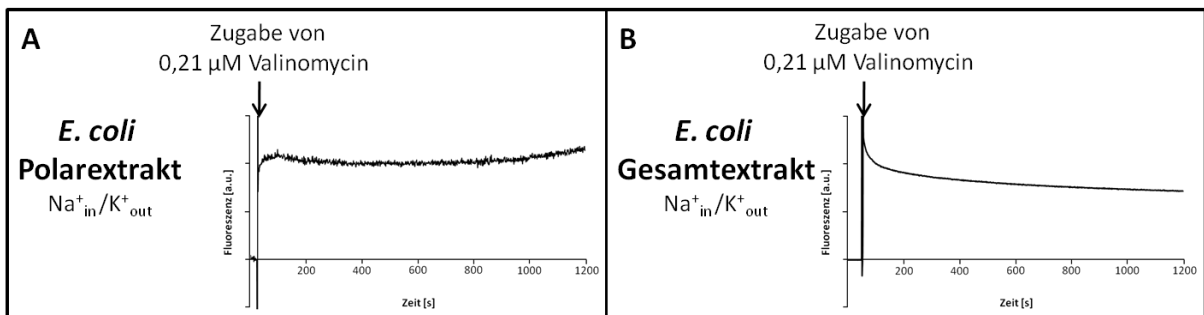
Abb52. **Die Messung eines Membranpotentials durch die Fluoreszenz von Oxonol VI war nur über ein Kaliumdiffusionspotential möglich**

Die Herstellung der Liposomen erfolgte mithilfe des Extruders in Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0, **A**) bzw. in Puffer K (10 mM HEPES, 100 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0, **B**). Nach der Zentrifugation wurden die Liposomen jeweils in demselben Puffer resuspendiert (Liposomen mit Na<sup>+</sup><sub>in</sub>/Na<sup>+</sup><sub>out</sub> in **A** bzw. K<sup>+</sup><sub>in</sub>/K<sup>+</sup><sub>out</sub> in **B**). Durch die Zugabe von 0,21 µM Valinomycin konnte kein Membranpotential generiert werden, wodurch es zu keiner Zunahme der Fluoreszenz von 0,34 µM Oxonol VI bei 599/634 nm Anregung/Emission kam.

Um ein Diffusionspotential zu erhalten, wurden die Liposomen mittels der Extrudermethode in Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0) hergestellt und in der Airfuge sedimentiert. Die Vesikel wurden in Puffer K (10 mM HEPES, 100 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0) resuspendiert und mit 0,21 µM Valinomycin versetzt (siehe Abb53). In Anwesenheit der polarisierten Vesikel wird das negativ geladene Oxonol VI-Molekül ausgerichtet und akkumuliert intravesikulär. Das sich generierende Membranpotential konnte mithilfe von Oxonol VI photometrisch bei einer Anregung mit 599 nm und einer Emission von 634 nm gemessen werden (Venema *et al.*, 1993; Apell & Bersch, 1987). Das unmittelbar ansteigende Signal nach Zugabe von Valinomycin wurde zunächst durch das Öffnen des Küvettenhalters erzeugt. Das Membranpotential wurde mit beiden *E. coli* Lipidextrakten gemessen, wobei ersichtlich wurde, dass die Membranen der verwendeten Liposomen dicht waren und somit keine Diffusion der Ionen erfolgte. Hierdurch

## Ergebnisse

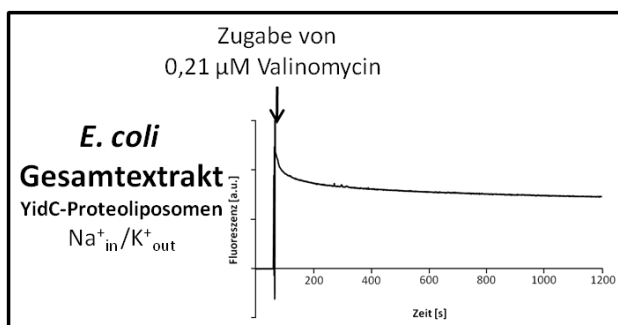
würde das Membranpotential langsam abgebaut werden und sich die Kurve der Nulllinie annähern.



### Abb53. Bestimmung des Membranpotentials durch Oxonol VI-Fluoreszenz der *E. coli* Lipidextrakte

Die Herstellung der Liposomen der *E. coli* Polar- (A) und Gesamtextrakte (B) erfolgte mithilfe des Extruders in Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , pH 8.0). Anschließend wurden die Liposomen pelletiert und in Puffer K (10 mM HEPES, 100 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , pH 8.0) resuspendiert (Liposomen mit  $\text{Na}^+_{\text{in}}/\text{K}^+_{\text{out}}$ ). Das Membranpotential wurde durch die Zugabe von 0,21 µM Valinomycin generiert und die Fluoreszenz von 0,34 µM Oxonol VI bei 599/634 nm Anregung/Emission aufgenommen.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die Rekonstitution von YidC in Proteoliposomen die Integrität der Membran beeinflusste und diese hierdurch undicht wurde (siehe Abb54). Es wurden Proteoliposomen des *E. coli* Gesamtextraktes hergestellt, indem vor dem Extrudieren den Vesikeln gereinigtes YidC im molaren Verhältnis von 1:25 000 (50 µM YidC auf 10,6 mM Lipid) zugefügt wurde. Die Herstellung erfolgte in Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , pH 8.0), während die Proteoliposomen nach erfolgter Zentrifugation in Puffer K (10 mM HEPES, 100 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , pH 8.0) resuspendiert und mit 0,21 µM Valinomycin versetzt wurden. Das Membranpotential der YidC-Proteoliposomen war vergleichbar stabil wie das der Liposomen. Die Rekonstitution von in Dodecylphosphocholin solubilisiertem YidC hatte somit keinen negativen Einfluss auf die Stabilität des Membranpotentials.



### Abb54. Bestimmung des Membranpotentials durch Oxonol VI-Fluoreszenz der Proteoliposomen des *E. coli* Gesamtextraktes

Die Herstellung der YidC-Proteoliposomen (YidC in Dodecylphosphocholin gereinigt) erfolgte mithilfe des Extruders in Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , pH 8.0) und anschließendem Resuspendieren nach der Zentrifugation in Puffer K (10 mM HEPES, 100 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , pH 8.0), somit handelte es sich um Proteoliposomen mit  $\text{Na}^+_{\text{in}}/\text{K}^+_{\text{out}}$ . Das Membranpotential wurde durch die Zugabe von 0,21 µM Valinomycin generiert und die Fluoreszenz von 0,34 µM Oxonol VI bei 599/634 nm Anregung/Emission für 20 min aufgenommen.

## Ergebnisse

Durch das Antibiotikum Alamethicin konnte das generierte Membranpotential zerstört werden, da hierbei ein Membrankanal gebildet wird, der ungehindert Kationen passieren lässt. Sechs Moleküle von Alamethicin können sich zu einem Aggregat zusammenlagern, wodurch in ihrem Inneren eine Pore gebildet wird, durch welche Ionen und kleine Moleküle treten können (Hanke & Hanke, 1997). Es kommt somit zu einem Ladungsausgleich zwischen innen und außen, wodurch die Fluoreszenz von Oxonol VI gequencht wird und die Kurve zur Nulllinie hin absinkt. Nach 800 s wurden 2,5  $\mu\text{M}$  Alamethicin in die Küvette pipettiert und das Membranpotential für weitere 200 s beobachtet. Unmittelbar nach der Zugabe des Alamethicins kam es zu einem Ladungsgleichgewicht und somit zur Zerstörung des Membranpotentials (siehe Abb55).

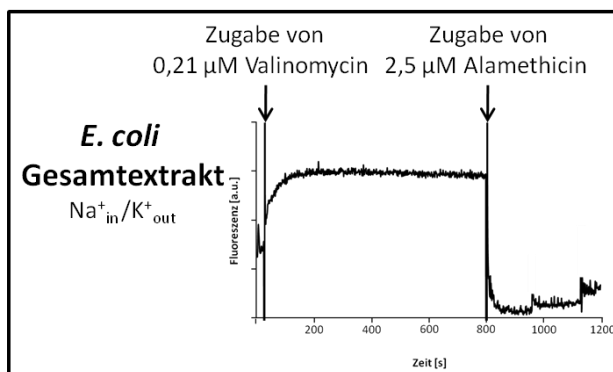


Abb55. **Das Membranpotential wird durch die Zugabe von Alamethicin zerstört**

Die Herstellung der Liposomen erfolgte mithilfe des Extruders in Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0). Nach der Zentrifugation wurden die Vesikel in Puffer K (10 mM HEPES, 100 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0) resuspendiert (Liposomen mit Na<sup>+</sup><sub>in</sub>/K<sup>+</sup><sub>out</sub>) und durch die Zugabe von 0,21  $\mu\text{M}$  Valinomycin ein stabiles Membranpotential generiert, wodurch es zu einer Zunahme der Fluoreszenz von 0,34  $\mu\text{M}$  Oxonol VI bei 599/634 nm Anregung/Emission kam. Nach 800 s wurden 2,5  $\mu\text{M}$  Alamethicin zugegeben, wodurch das Membranpotential unmittelbar zerstört wurde.

Der Transitionspunkt des *E. coli* Polar- und Gesamtextraktes wurde bestimmt (siehe Abb56), um sicherzustellen, dass die Translokationsexperimente oberhalb dieser Temperatur stattfanden. Es muss hierbei bedacht werden, dass die Puffereigenschaften, wie z.B. die Salzkonzentrationen, Einfluss auf die Phasenumwandlungstemperatur  $T_m$  haben könnten (White *et al.*, 2000). Hierfür wurden die Liposomen mittels der Extrudermethode in Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0) hergestellt und diese für die Messung in Puffer N mit 5 M Glycerin überführt. Die Messung fand bei ca. 5°C bis ca. 50°C statt. Der Farbstoff 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH) macht die fluoreszenzspektroskopische Messung der Anisotropie möglich. Die Phasenumwandlungstemperatur  $T_m$  der beiden *E. coli* Lipidextrakte wurde graphisch mittels Boltzmann-Fitting ermittelt und betrug für den Polarextrakt ca. 11°C, für den Gesamtextrakt lag der Transitionspunkt bei ca. 12°C.

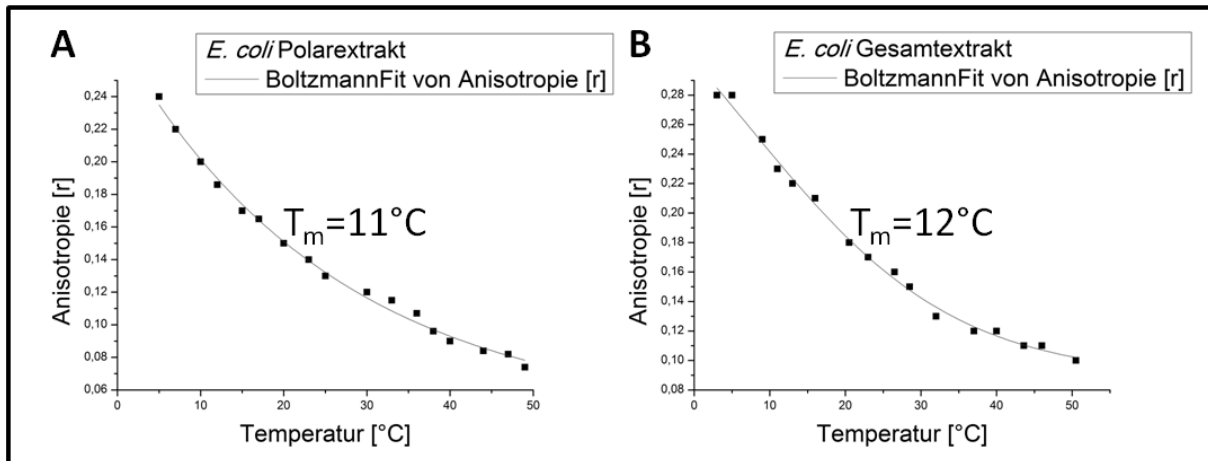


Abb56. **Anisotropie der *E. coli* Lipidextrakte**

Die Herstellung der Liposomen aus *E. coli* Polar- (A) und Gesamtextraktlipiden (B) erfolgte mithilfe des Extruders in Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0) mit 5 M Glycerin. Die Messung der Phasenumwandlungstemperatur ( $T_m$ ) wurde mithilfe des Farbstoffs 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH) und des Fluorologspektrometers durchgeführt.

## 4.6. Einbau und Topologiebestimmung des gereinigten YidC-Proteins

Die Rekonstitution von gereinigten Proteinen in Lipidvesikel ermöglicht die kontrollierte Untersuchung der Vorgänge während der Translokation *in vitro*. Die einzelnen Komponenten der Translokationsmaschinerie von *E. coli* können getrennt voneinander untersucht werden. Es wurden verschiedene Lipide für die Herstellung der Proteoliposomen eingesetzt. Darunter waren die natürlichen Membranextrakte der Innenmembran von *E. coli* (Gesamt- und Polarextrakt), sowie semi-synthetische Lipide wie DOPC, DOPE und DOPG in unterschiedlichen Zusammensetzungen. Die Rekonstitution von YidC erfolgte meist mittels der Extrudermethode, wobei das gereinigte Protein YidC vor dem Extrudieren zu den multilamellaren Vesikeln gegeben wurde (siehe 3.28.1.). Durch das Hin- und Herdrücken der Suspension aus multilamellaren Vesikeln durch die Polycarbonatmembran wurde das Protein in die Membran eingebaut. Als zweite Methode für die Rekonstitution von YidC und auch SecYEG wurde die Methode mit Bio Beads angewandt (siehe 3.28.2.), bei der das gereinigte Protein mit Detergenz (Dodecylmaltosid cmc: 0,008%) zu unilamellaren Liposomen (nach dem Extrudieren) gegeben wurde, dieses gemeinsam inkubiert und dann das Detergenz mittels poröser Polystyrolpolymere (z.B. Bio Beads) wieder entfernt wurde. Die Rekonstitution des gereinigten YidC in Membransysteme kann in zwei unterschiedliche Richtungen erfolgen. Diese Orientierung ist für die Funktionalität der Insertase von Bedeutung, weshalb zunächst die Topologie des Proteins überprüft wurde. Hierfür wurden Liposomen aus den *E. coli* Gesamt- und Polarextrakten hergestellt und das gereinigte YidC mittels der Extrudermethode (siehe 3.27.) in diese

## Ergebnisse

rekonstituiert. Die Bestimmung der Topologie erfolgte durch den spezifischen Verdau von Trypsin hinter den Aminosäuren Lysin und Arginin (siehe Abb57). Der Verdau wurde mithilfe des Trypsin-Inhibitors gestoppt. Die Positionen der Aminosäuren Lysin und Arginin in der Sequenz von YidC bewirken die Entstehung von mehreren Proteinfragmenten mit bekannter Größe.

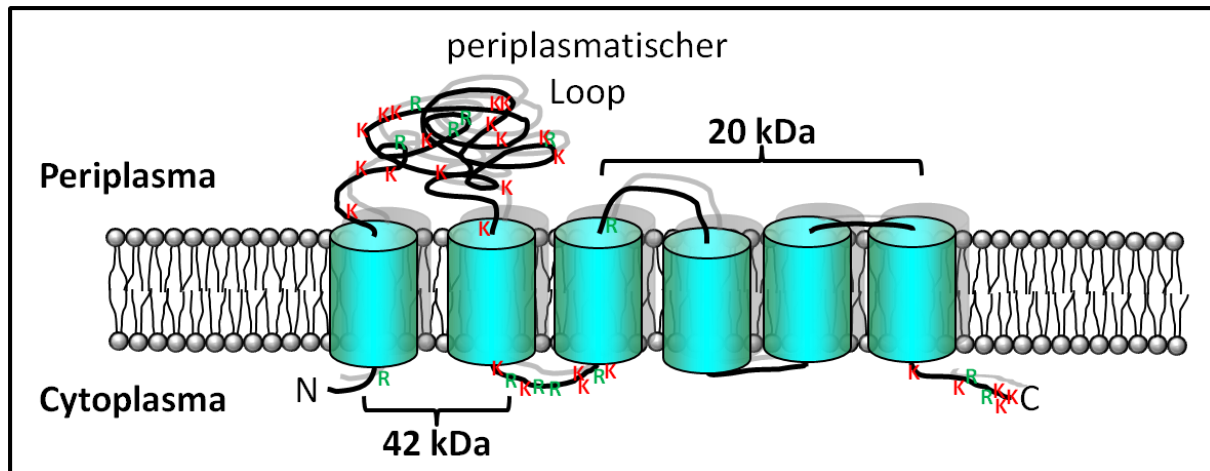


Abb57. **Darstellung der potentiellen Schnittstellen der Protease Trypsin in der Aminosäuresequenz von YidC**  
Die Protease Trypsin spaltet Proteine spezifisch hinter den Aminosäureresten Lysin (K) und Arginin (R). Nach der Rekonstitution in Lipidvesikel und dem anschließenden Verdau mit Trypsin können zwei Fragmente von YidC mit den Antikörpern gegen den C-Terminus (20 kDa) bzw. dem gegen den periplasmatischen Bereich (42 kDa) nachgewiesen werden. Das Fragment mit 42 kDa stellt die aktive Orientierung im Vesikel dar (cytoplasmic-out).

Zwei dieser Fragmente konnten jeweils mittels der Antikörper gegen den C-Terminus (Anti-C) bzw. den periplasmatischen Bereich (Anti-P1) von YidC nachgewiesen werden. Es konnte hiermit nachgewiesen werden, welche Antigenregion im Inneren des Liposoms vor der Protease geschützt vorlag. Der Verdau mit Trypsin generiert ein 42 kDa großes Fragment, welches von dem Antikörper gegen den periplasmatischen Bügel erkannt wird. Diese Orientierung weist eine Topologie mit den Termini nach außen auf (cytoplasmic-out). Liegt das YidC-Protein hingegen in der umgekehrten Orientierung vor, also mit den Termini im Vesikellumen, so kann ein Fragment von 20 kDa mit dem Antikörper gegen den C-Terminus detektiert werden (periplasmic-out).

In Proteoliposomen, die aus dem *E. coli* Gesamtextrakt hergestellt wurden, konnte das gereinigte YidC-Protein zu 52% in der Orientierung mit den Termini nach außen eingebaut werden (siehe Abb58), welche der aktiven Topologie entspricht. Lediglich 15% des Proteins konnten in der Orientierung mit dem periplasmatischen Bügel nach außen nachgewiesen werden. In Proteoliposomen des *E. coli* Polarextraktes konnten 40% des Proteins in der Termini-außen-Orientierung und 25% in der Orientierung detektiert werden, bei der der periplasmatische Bereich nach außen exponiert war. Aufgrund der bei beiden Lipidextrakten bevorzugt in der cytoplasmic-out-Orientierung vorhandenen YidC-Topologie, wurden die folgenden Experimente

## Ergebnisse

sowohl mit dem *E. coli* Polar- als auch dem Gesamtextrakt durchgeführt. Im Verlauf meiner Diplomarbeit (Stiegler, 2004) konnte gezeigt werden, dass die invertierte Topologie des YidC-Proteins einen negativen Effekt auf die Insertasefunktion hat. Die katalytische Aktivität von YidC wird durch die umgekehrte Orientierung inaktiv. Die vollständige Enzymaktivität ist nur in der Orientierung mit den cytoplasmatischen Termini nach außen gegeben.

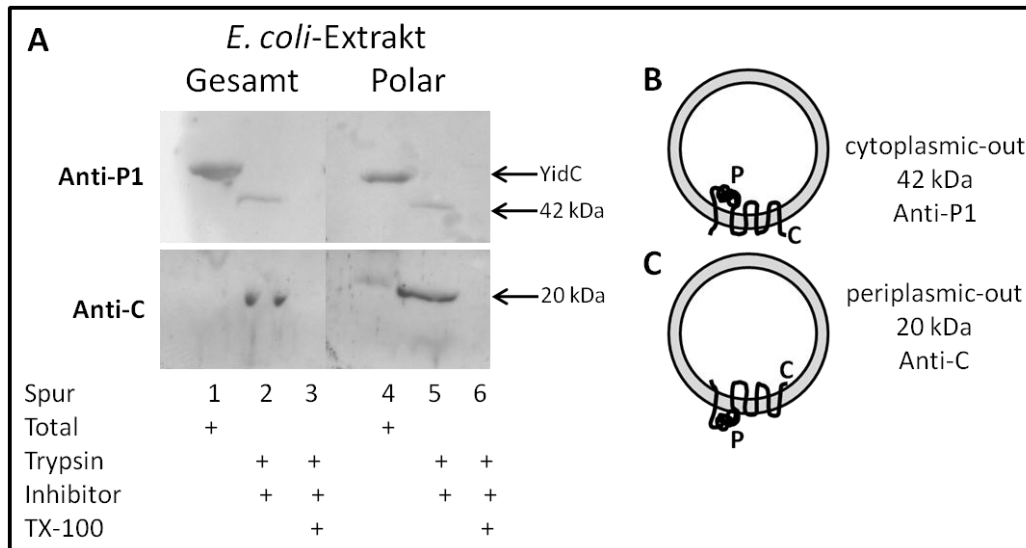


Abb58. **Topologiebestimmung von YidC**

YidC-Proteoliposomen (Spur 1 und 4) wurden mit gereinigtem YidC-Protein mithilfe des Extruders hergestellt. Die Proteoliposomen wurden mit der Protease Trypsin inkubiert (Spuren 2, 3, 5 und 6), welche Proteine spezifisch hinter den Aminosäuren Lysin und Arginin spaltet. Zur Kontrolle der Proteaseaktivität wurde zu den Ansätzen in den Spuren 3 und 6 zusätzlich 4% Triton X-100 gegeben. Die Proben wurden durch ein 12% SDS-PAGE aufgetrennt (A) und entweder mit dem Antikörper gegen den periplasmatischen Bereich (Anti-P1, 42 kDa) oder gegen den C-Terminus (Anti-C, 20 kDa) inkubiert. Durch die Trypsinbehandlung wurden zwei Fragmente generiert, die mithilfe der Antikörper detektiert werden konnten. Die Fragmente stellen die beiden möglichen Orientierungen von YidC dar. In B ist die aktive cytoplasmic-out-Orientierung mit den Termini nach außen dargestellt, welche mit dem P1-Antikörper ein 42 kDa großes Fragment nachweist. Die periplasmic-out-Orientierung (C) generiert ein 20 kDa großes Fragment mit dem Antikörper gegen den C-Terminus, welcher im Vesikellumen geschützt vorliegt.

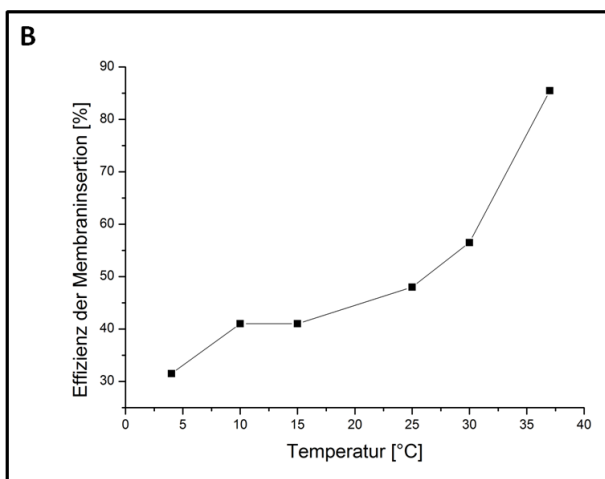
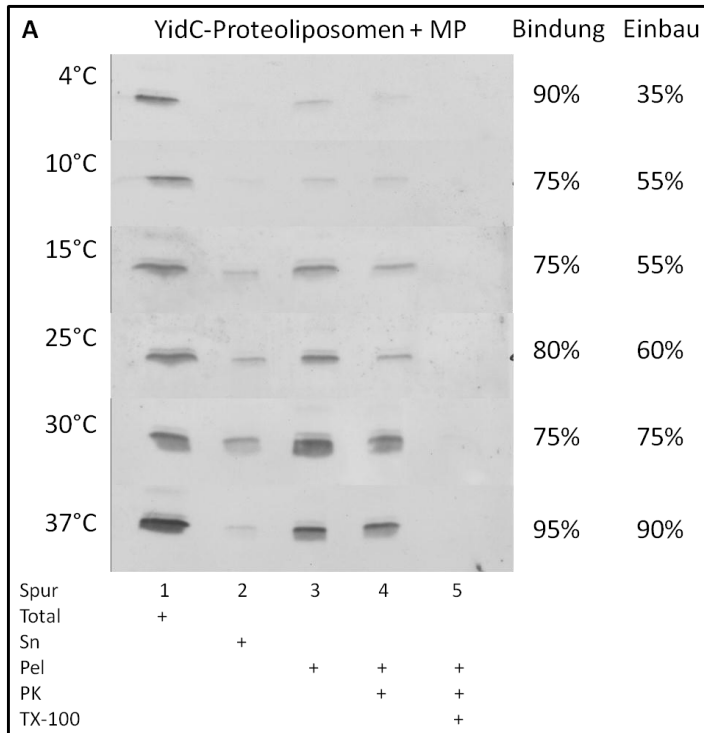
## 4.7. Membraninsertion von M13 procoat

Um die ideale Temperatur und Zeitspanne für die *in vitro*-Translokationsexperimente zu ermitteln, wurden diese variiert. Hierfür wurden YidC-Proteoliposomen aus *E. coli* Polar-extraktlipiden (50  $\mu$ M YidC auf 10,6 mM Lipid) mithilfe der Extrudertechnik (siehe 3.28.1.) hergestellt und ein elektrochemisches Membranpotential angelegt.

Die Translokationsansätze wurden nach der Zugabe von je 1  $\mu$ g M13 procoat H5 bei 4°C, 10°C, 15°C, 25°C, 30°C und 37°C für 30 min inkubiert (siehe Abb59 A). Die Banden wurden quantifiziert und die prozentuale Bindungsrate des Proteins bestimmt (Signal der Bande in Spur 3 von der Summe der Signale in Spur 2+3 abgezogen). Die Einbaurrate bezieht sich auf die Gesamtmenge an gebundenem Protein (Signal der Bande in Spur 4 von dem Signal in Spur 3)

## Ergebnisse

und wurde in einem Graph aufgetragen (siehe Abb59 B). Die Bindungsrate des Proteins an die Vesikelmembran erfolgte unabhängig von der Inkubationstemperatur. Die Einbaurrate hingegen stieg mit zunehmender Temperatur deutlich an, während sie bei 4°C nur ca. 35% der Gesamtmenge des Proteins betrug, lag sie bei 15°C bei ca. 55% und bei 37°C sogar bei ca. 90%.

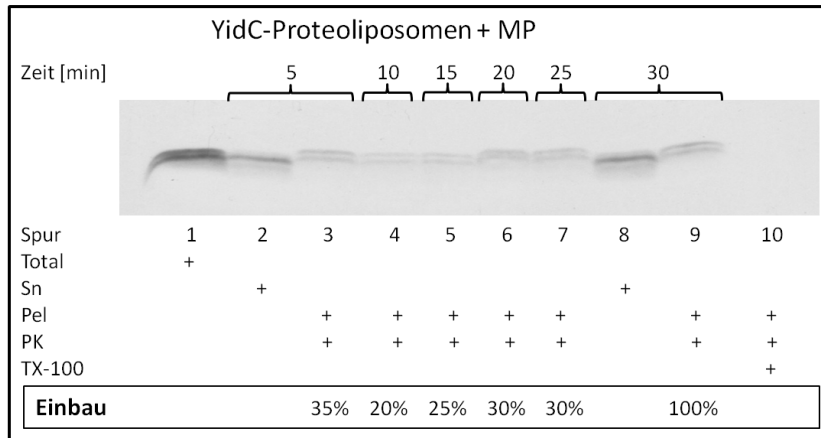


### Abb59. Temperaturabhängigkeit der Membraninsertion von M13 procoat H5

Die Herstellung der YidC-Proteoliposomen (*E. coli* Polarextrakt) erfolgte mithilfe der Extrudermethode durch die Zugabe von gereinigtem YidC. Die Translokation des gereinigten Proteins M13 procoat H5 in YidC-Proteoliposomen mit Membranpotential (0,25 µM Valinomycin) wurde für 30 min bei 4°C, 10°C, 15°C, 25°C, 30°C und 37°C in Puffer K (10 mM HEPES, 100 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0) durchgeführt. **A** Die Proben wurden sedimentiert und in Überstand (Sn) und Pellet (Pel) aufgeteilt, die Bindung an die Vesikel wurde analysiert. Die Einbaurrate in die Lipidvesikel wurde durch die Zugabe von Proteinase K in Ab- und Anwesenheit (PK +) von Detergenz überprüft. Die Proben wurden mit 15% TCA gefällt, über ein Tricin-SDS-PAG aufgetrennt und durch eine anschließende Immunfärbung mithilfe des M13-Antikörpers visualisiert. **B** Die Banden von M13 procoat H5 der Translokation in YidC-Proteoliposomen mit Membranpotential wurden quantifiziert und die Membraninsertion analysiert. Hierbei wurde der Prozentsatz der Rate an gebundenem Protein und dessen Insertionsrate im Verhältnis zur Summe an Protein der Spuren 2+3 berücksichtigt.

## Ergebnisse

Um die optimale Dauer der Translokation zu ermitteln, wurde diese für 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min und 30 min bei 37°C durchgeführt (siehe Abb60). Die Ansätze wurden in der Airfuge sedimentiert, die Proben von 5 min und 30 min wurden in Überstand und Pellet unterteilt, während von den restlichen nur das Pellet analysiert wurde. Die Pellets wurden mit Proteinase K versetzt und auf das Vorhandensein von M13 procoat H5 untersucht. Die effizienteste Einbaurrate war nach 30 min Inkubation erreicht. Die Einbaurrate in Spur 9 wurde als 100%-Wert herangezogen, um die relativen Prozentsätze der kürzeren Zeiten zu bestimmen.



### Abb60. Membraninsertion von M13 procoat H5 nach verschiedenen Inkubationszeiten

Die Herstellung der YidC-Proteoliposomen (*E. coli* Polarextrakt) erfolgte mithilfe der Extrudermethode durch die Zugabe von gereinigtem YidC. Die Translokation des gereinigten Proteins M13 procoat H5 in YidC-Proteoliposomen mit Membranpotential (0,25  $\mu$ M Valinomycin) wurde für 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min und 30 min bei 37°C in Puffer K (10 mM HEPES, 100 mM  $K_2SO_4$ , pH 8.0) durchgeführt. Die Proben wurden sedimentiert und die Ansätze 5 min und 30 min in Überstand (Sn) und Pellet (Pel) aufgeteilt, von den restlichen Proben wurde das Pellet analysiert. Die Einbaurate in die Lipidvesikel wurde durch die Zugabe von Proteinase K in Ab- und Anwesenheit (PK +, Spur 10) von Detergenz überprüft. Die Proben wurden mit 15% TCA gefällt, über ein Tricin-SDS-PAG aufgetrennt und durch eine anschließende Immunfärbung mithilfe des M13-Antikörpers visualisiert. Die Translokation nach 30 min (Spur 9) wurde als maximal angenommen und die relativen Anteile nach kürzeren Zeiten berechnet.

## 4.8. Aggregiert das ungebundene Substratprotein?

Während der Dauer der Translokation von M13 procoat H5 bzw. H5EE wurde nicht das gesamte eingesetzte Protein in die großen unilamellaren Vesikel eingebaut. Nun stellte sich die Frage, ob das nicht eingebaute Procoatprotein aggregiert war.

Hierfür wurden YidC-Proteoliposomen aus *E. coli* Polarextraktlipiden (50  $\mu$ M YidC auf 10,6 mM Lipid) mithilfe des Extruders (Mini Extruder Set, Avanti Polar Lipids Inc.) in Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM  $Na_2SO_4$ , pH 8.0) hergestellt (siehe 3.28.1.). Die YidC-Proteoliposomen wurden vor der Translokation sedimentiert, um diese in Puffer K (10 mM HEPES, 100 mM  $K_2SO_4$ , pH 8.0) resuspendieren zu können. Die Translokation von je 1  $\mu$ g M13 procoat H5 bzw. M13 procoat H5EE wurde für 30 min bei 37°C in Puffer K durchgeführt, wobei durch die Zugabe von 0,21  $\mu$ M Valinomycin ein Membranpotential generiert wurde (siehe Abb61). Die Translokationsansätze



## Ergebnisse

in den Spuren 1 (H5) und 7 (H5EE) blieben unverändert, während die in den Spuren 2 und 3, sowie 8 und 9 für 10 min bei 120 000 *g* in der Airfuge zentrifugiert und in Überstand und Pellet unterteilt wurden. Die Bindung von beiden Proteinen war unvollständig (Spuren 3 und 9), ungebundenes Protein fand sich im Überstand (Spuren 2 und 8). Um eventuell aggregiertes Procoatprotein zu detektieren, wurde ein weiterer Translokationsansatz auf ein 60%-iges Saccharosekissen gegeben, für 20 min bei 142 000 *g* zentrifugiert und die unterschiedlichen Schichten analysiert. Im Überstand befand sich ungebundenes Procoat (Spuren 4 und 10), während die gebundenen Proteine mit den YidC-Proteoliposomen auf der Grenzschicht des Saccharosekissens floateten (Spuren 5 und 11). Im Pellet nach der Zentrifugation auf Saccharose (Spuren 6 und 12) war kein M13 procoat H5 bzw. H5EE zu finden, was darauf hindeutete, dass es während der Translokation keine größeren Aggregate gebildet hatte.

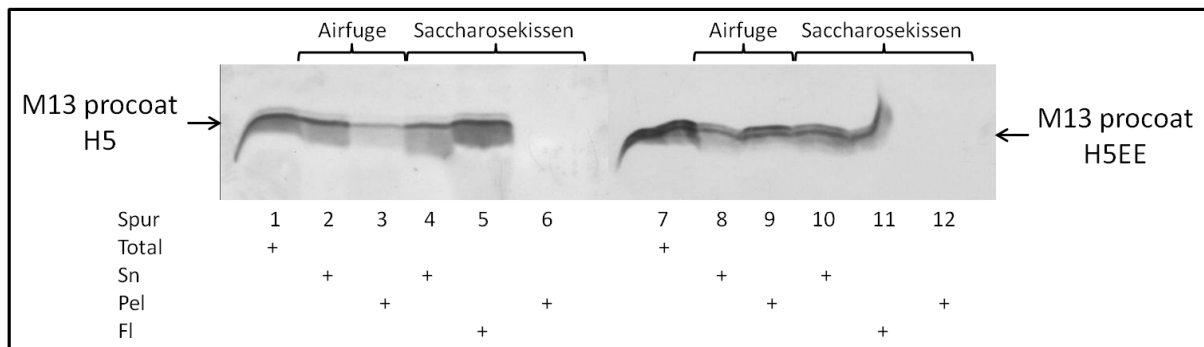


Abb61. **Suche nach Aggregaten von M13 procoat H5 und H5EE**

Die Herstellung der YidC-Proteoliposomen (*E. coli* Polarextrakt) erfolgte mithilfe der Extrudermethode durch die Zugabe von gereinigtem YidC. Die Translokation der gereinigten Proteine M13 procoat H5 (Spuren 1 bis 6) und M13 procoat H5EE (Spuren 7 bis 12) in YidC-Proteoliposomen mit Membranpotential (0,25  $\mu$ M Valinomycin) wurde für 30 min bei 37°C in Puffer K (10 mM HEPES, 100 mM  $K_2SO_4$ , pH 8.0) durchgeführt. Die Proben der Spuren 2 und 3 (H5) sowie 8 und 9 (H5EE) wurden in der Airfuge für 10 min bei 120 000 *g* sedimentiert und in Überstand (Sn) und Pellet (Pel) aufgeteilt. Die Proben der Spuren 4 bis 6 (H5) und 10 bis 12 (H5EE) wurden auf einem 60%-igen Saccharosekissen für 20 min bei 142 000 *g* zentrifugiert. Eventuelle Aggregate von M13 procoat H5 bzw. H5EE befänden sich nach der Zentrifugation im Pellet (Spuren 6 und 12), waren aber nicht zu detektieren. Ungebundenes Protein war im Überstand (Spuren 4 und 10) zu finden und die Proteoliposomen mit gebundenem Procoat waren auf der Grenzschicht zur Saccharose detektierbar (Spuren 5 und 11). Die Proben wurden mit 15% TCA gefällt, über ein Tricin-SDS-PAG aufgetrennt und durch eine anschließende Immunfärbung mithilfe des M13-Antikörpers visualisiert.

## 4.9. Das gereinigte YidC kann mit verschiedenen Methoden in Liposomen rekonstituiert werden

Zur Überprüfung der Funktionalität der gereinigten Insertase YidC wurde die Translokation von M13 procoat H5-Protein in *E. coli* Gesamtextraktvesikel untersucht. Das Protein YidC wurde über Ionenmetallaffinitätschromatographie (IMAC) mittels  $Ni^{2+}$ -NTA-Agarose gereinigt. Das Solubilisieren des YidC-Proteins erfolgte hierbei entweder mit Dodecylphosphocholin (FOS) oder mit Dodecylmaltosid (DDM). Das YidC-Protein wurde hierfür entweder in gereinigter Form vor dem Extrudieren zu den Vesikeln gegeben (Methode Extruder in A) oder hinterher nach

## Ergebnisse

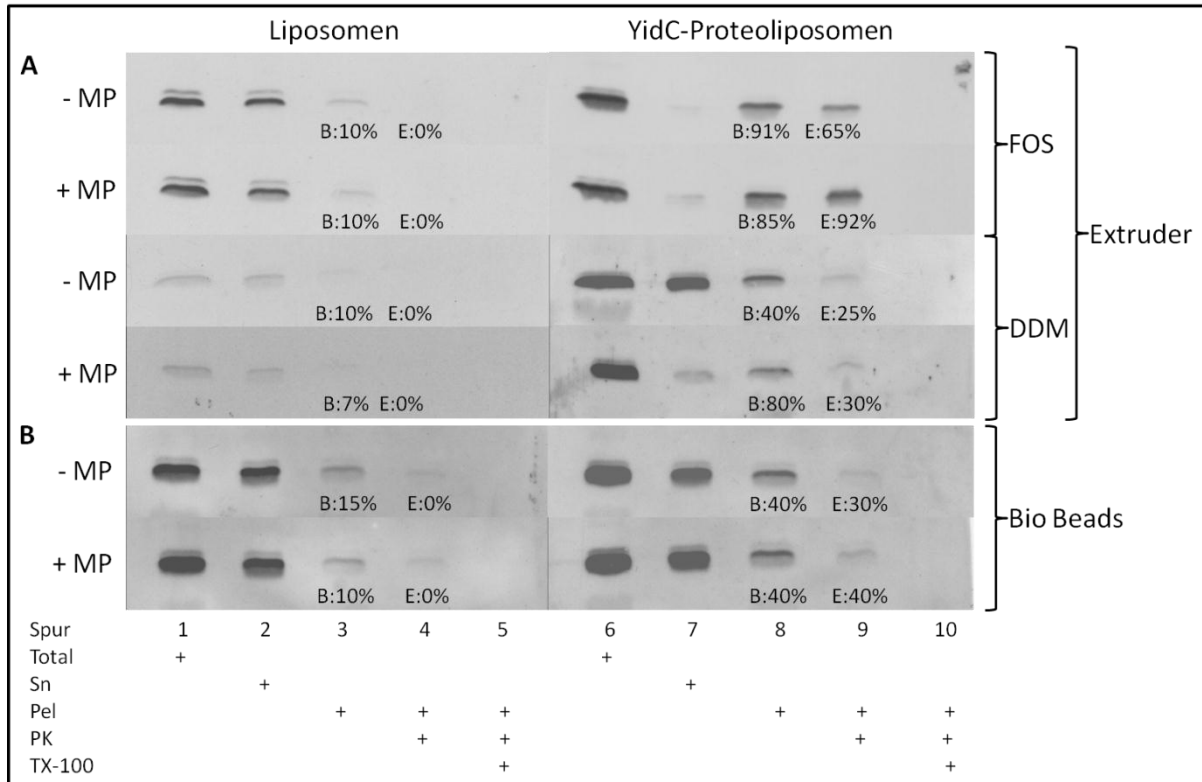
Inkubation mit dem Detergenz Dodecylmaltosid und anschließender Behandlung mit Bio Beads (Bio Beads in **B**). Die Herstellung der (Proteo-) Liposomen erfolgte zunächst mittels der Extrudermethode (siehe 3.28.1.). Die Membranintegrität der *E. coli* Gesamtextraktvesikel wurde mittels Membranpotentialmessung überprüft und zeigte ein stabiles Membranpotential. Nach dem Sedimentieren in der Airfuge wurden die Proben in Überstand (Sn) und Pellet (Pel) getrennt. Die Banden wurden quantifiziert, indem die Intensitäten von Überstand und Pellet addiert und davon die prozentuale Bindungsrate des Pellets (B) bestimmt wurde. Die Einbaurate (E) bezieht sich auf die Menge an gebundenem Protein.

Die Bindungsrate von M13 procoat H5 an Liposomen mit und ohne Membranpotential (siehe Abb62 **A**, Spuren 1-5), welche mit der Extrudermethode hergestellt wurden, lag jeweils bei ca. 10%, wobei kein Protein in diese inseriert wurde. Wurden entsprechende Proteoliposomen ohne Membranpotential verwendet, bei welchen das YidC-Protein in Dodecylphosphocholin (FOS) gereinigt wurde, so lagen die Bindungsrate bei ca. 91% und die Einbaurate bei ca. 65%. Proteoliposomen hingegen mit Membranpotential wiesen eine Bindungseffizienz von 85% auf, wobei ca. 92% des gebundenen Proteins auch eingebaut wurde. Wurde dagegen das Detergenz Dodecylmaltosid (DDM) für die Reinigung von YidC verwendet, wiesen die Proteoliposomen ohne Membranpotential eine Bindungsrate von 40% auf, wobei davon ca. 25% inseriert wurden. Bei den Proteoliposomen mit Membranpotential hatten ca. 80% des M13 procoat H5 gebunden und wurden zu ca. 30% in die Membran inseriert. Der Unterschied der Bindungsraten mit und ohne Potential war hierbei deutlich zu erkennen. Die Liposomen, die bei diesem Versuch als Kontrolle mit getestet wurden, wiesen eine schwache Bindung auf und daraus resultierend fand keine Insertion statt. In den meisten folgenden Versuchen wurde das YidC-Protein verwendet, welches in Dodecylphosphocholin gereinigt wurde. Die Reinigung in diesem Detergenz war effizienter und das Protein konnte in konzentrierterer Form (3 mg/ml) und reiner gewonnen werden als mit Dodecylmaltosid (1 mg/ml). Aus diesem Grund wurde dieses Protein für die meisten *in vitro*-Translokationsexperimente verwendet, da weniger Detergenz bei der Rekonstitution von YidC in die Vesikel eingebracht wurde (0,00015% Fos-cholin<sup>12</sup> im Translokationsansatz).

Des Weiteren wurde die Effizienz der YidC-Rekonstitutionsmethoden mittels des Extruders (siehe Abb62 **A**) oder der Harzkügelchen Bio Beads (**B**) untersucht. Wurden die Vesikel mithilfe der Bio Beads und vorheriger Inkubation mit Detergenz (DDM) hergestellt, so wiesen die YidC-Proteoliposomen mit jeweils 40% nahezu identische Bindungsraten auf, unabhängig ob ein Membranpotential vorlag oder nicht. Die Einbaurate des Substrates M13 procoat H5 war bei beiden Methoden mit 30-40% ähnlich effizient. Aufgrund der effizienteren Bindungs- und Einbauraten mittels des Extruders (**A**) wurde in den folgenden Versuchen meist diese Methode

## Ergebnisse

angewandt, da diese schneller und einfacher war. Für die Kontrollstudien der Experimente mit rekonstituiertem SecYEG wurde das YidC-Protein verwendet, welches in Dodecylmaltosid gereinigt und mittels der Bio Beads-Methode rekonstituiert wurde (siehe 3.28.2.). Dieses Detergenz war mit Harzkügelchen besser zu entfernen und die Ergebnisse waren vergleichbarer, da auch SecYEG in Dodecylmaltosid gereinigt wurde.



**Abb62. Translokation von M13 procoat H5 in *E. coli* Gesamtextraktlipidvesikel mit rekonstituiertem YidC**

Die Translokationseffizienz der über IMAC mit den Detergenzien Dodecylphosphocholin (FOS) bzw. Dodecylmaltosid (DDM) gereinigten Insertase YidC wurde überprüft (A). Zusätzlich wurde die Rekonstitutionsmethode von YidC variiert (B). Die Herstellung der Lipidvesikel erfolgte mithilfe des Extruders alleine (A) bzw. der anschließenden Inkubation mit Bio Beads (B). Die Translokation des gereinigten Proteins M13 procoat H5 erfolgte in Liposomen und YidC-Proteoliposomen mit (+ MP) und ohne Membranpotential (-MP) mit 0,25  $\mu$ M Valinomycin für 30 min bei 37°C. Die Proben wurden sedimentiert und in Überstand (Sn) und Pellet (Pel) aufgeteilt, die Bindung (B) an die Vesikel wurde analysiert. Die Einbaurate (E) in die Lipidvesikel wurde durch die Zugabe von Proteinase K in Ab- und Anwesenheit (PK +) von Detergenz überprüft. Die Proben wurden mit 15% TCA gefällt, über ein Tricin-SDS-PAG aufgetrennt und durch eine anschließende Immunfärbung mithilfe des M13-Antikörpers visualisiert.

## 4.10. Das Membranpotential wird durch die Insertion von M13 procoat nicht beeinflusst

Die Translokation der kleinen Substratproteine M13 procoat in die cytoplasmatische Membran von *E. coli* erfordert das Vorhandensein eines elektrochemischen Membranpotentials. Es sollte nun untersucht werden, ob das Membranpotential während des Insertionsprozesses verbraucht wird. Hierfür wurden YidC-Proteoliposomen aus dem *E. coli*-Polarextrakt (50  $\mu\text{M}$  YidC auf 10,6 mM Lipid) mittels des Extruders (siehe 3.28.1.) hergestellt und deren Oxonol VI-Fluoreszenz während der Insertion der Procoatproteine beobachtet. Es wurden unterschiedlich geladene Procoatproteine verwendet. Das wildtypische M13 procoat H5 mit einer Nettoladung von -3 im periplasmatischen Bereich. Das Protein M13 procoat H5EE mit zwei zusätzlichen Glutaminsäureresten, dessen Nettoladung im Loop -5 beträgt. Das M13 procoat H5-0PC, bei welchem die geladenen Aminosäurereste an den Positionen +2, +4 und +5 durch ungeladene ersetzt wurden, trägt keine Nettoladung im Loop. Zunächst wurde das Membranpotential der Proteoliposomen durch die Zugabe von 0,21  $\mu\text{M}$  Valinomycin generiert und durch die Zunahme der Fluoreszenz von 0,34  $\mu\text{M}$  Oxonol VI beobachtet. Je 1  $\mu\text{g}$  der Proteine wurde nach 300 s stabilen Potentials zu den Proteoliposomen in der Küvette gegeben und die Fluoreszenz für weitere 200 s beobachtet (siehe Abb63). Die unmittelbare Veränderung des Fluoreszenzsignals rührt vom Öffnen des Küvettenhalters bei Zugabe von Valinomycin und des Proteins her. Das Protein M13 procoat H5-0PC (Samuelson *et al.*, 2001) inseriert *in vivo* aufgrund der fehlenden Ladung im Bügel unabhängig vom Membranpotential (Cao *et al.*, 1995). Die Insertion des ungeladenen M13 procoat H5-0PC (A) veränderte die Oxonol VI-Fluoreszenz nicht, wahrscheinlich weil keine Ladung in das Vesikelinnere transportiert wurde. Wurde das Protein H5-0PC in YidC-Proteoliposomen des *E. coli* Polarextraktes transloziert, so war die Bindungs- und Einbaurrate unabhängig vom Vorhandensein eines Membranpotentials bei 100% (Proteoliposomen, Spuren 3 bzw. 4), wodurch die *in vivo* beobachtete Unabhängigkeit vom Membranpotential auch *in vitro* bestätigt wurde (Stiegler *et al.*, 2011). Das Protein M13 procoat H5 (Kuhn & Wickner, 1985) inseriert mithilfe der Insertase YidC (Samuelson *et al.*, 2001) und aufgrund seiner negativen Ladung (-3) im periplasmatischen Bereich abhängig vom Membranpotential (Kuhn *et al.*, 1990). Wurde das Membranpotential während der Zugabe von M13 procoat H5 (B) gemessen, welches drei negative Ladungen trägt, wurde die Fluoreszenz und somit das Membranpotential nicht wesentlich verändert. YidC bewirkte die Membraninsertion, da eine Insertion von H5 in Liposomen nicht stattfand (Liposomen, Spuren 4). Lediglich der Einbau des Proteins M13 procoat H5EE (C), welches fünf negativ geladene Aminosäurereste über die Membran transportiert, veränderte das Potential geringfügig. Das Protein M13 procoat H5EE besitzt zwei zusätzliche negativ geladene Aminosäurereste im Loop und trägt somit eine Nettoladung von -5

## Ergebnisse

(Roos *et al.*, 2001). Es inseriert sowohl via der SecYEG-Translokase nach der Bindung an SecA (Baud *et al.*, 2005) als auch mit YidC alleine. Zusätzlich ist es stärker vom Membranpotential abhängig, da es eine stärkere negative Ladung im Loop trägt (Cao *et al.*, 1995). In den Liposomen waren ca. 10-15% des gebundenen H5EE-Proteins vor der Protease geschützt (Liposomen, Spuren 4). Die Translokationsrate in YidC-Proteoliposomen war bei Vesikeln mit Membranpotential deutlich effizienter (100%) als in diese ohne Potential (15%). Man kann somit davon ausgehen, dass die Membranintegrität durch ein einbauendes Protein nicht verändert wird und das Membranpotential durch den Prozess der Proteininsertion nicht wesentlich konsumiert wird. Die Höhe der transportierten negativen Ladung hat lediglich einen geringen Effekt auf das Fluoreszenzsignal von Oxonol VI (vergleiche A und B mit C).

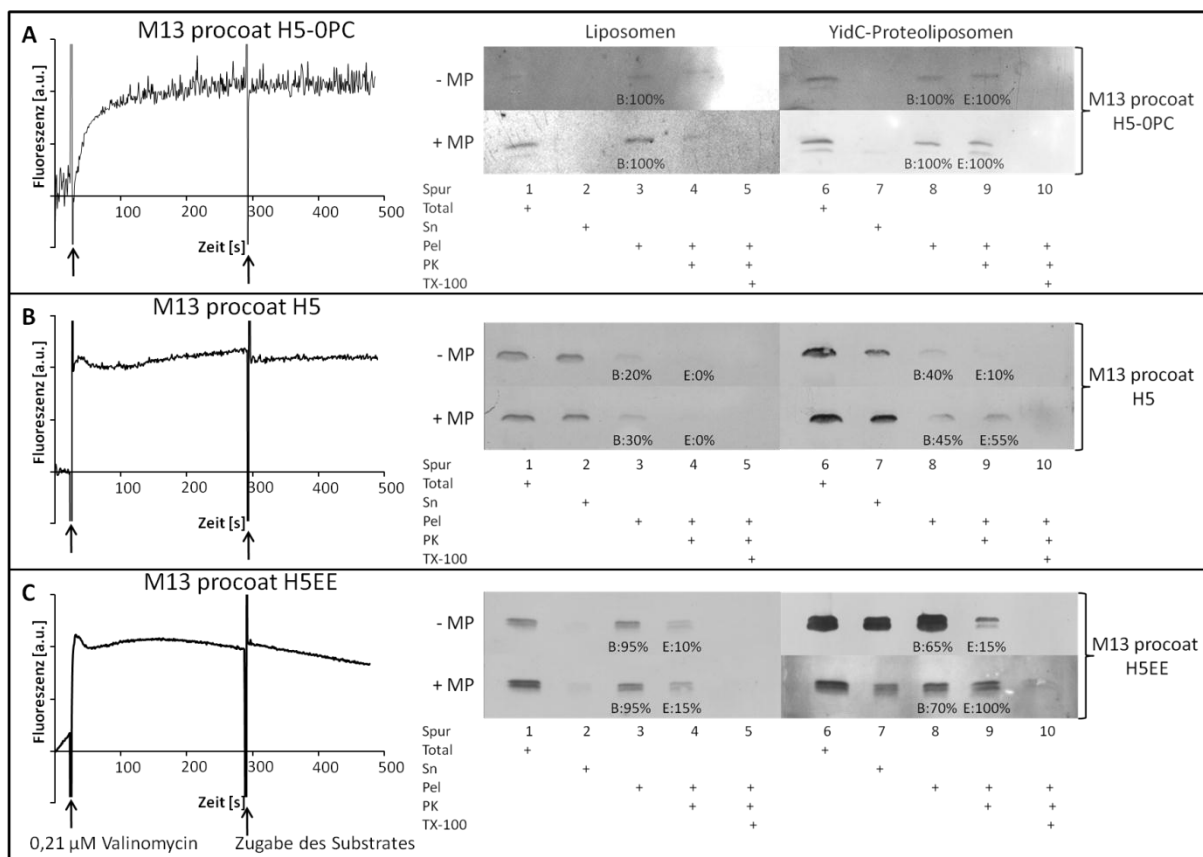


Abb63. **Veränderung des Membranpotentials während der Insertion der Procoatproteine H5-0PC, H5 und H5EE**

Links: Die Herstellung der YidC-Proteoliposomen (*E. coli* Polarextrakt) erfolgte mithilfe des Extruders in Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0) mit gereinigtem YidC. Nach der Zentrifugation bei 120 000 *g* wurden die Vesikel in Puffer K (10 mM HEPES, 100 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0) resuspendiert (Proteoliposomen mit Na<sup>+</sup><sub>in</sub>/K<sup>+</sup><sub>out</sub>). Durch die Zugabe von 0,21  $\mu$ M Valinomycin (gekennzeichnet durch  $\uparrow$ ) konnte ein stabiles Membranpotential generiert werden, wodurch es zu einer Zunahme der Fluoreszenz von Oxonol VI bei 599/634 nm Anregung/Emission kam. Nach 300 s wurde jeweils 1  $\mu$ g von M13 procoat H5-0PC (A), M13 procoat H5 (B) bzw. M13 procoat H5EE (C) zugegeben und das Membranpotential für weitere 200 s beobachtet.

Mitte und rechts: Die Herstellung der Lipidvesikel für die Translokationsexperimente erfolgte mithilfe der Extrudermethode in Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0). Die Translokation der gereinigten Proteine M13 procoat H5-0PC (A), M13 procoat H5 (B) und M13 procoat H5EE (C) in Liposomen und YidC-Proteoliposomen wurde für 30 min bei 37°C durchgeführt. Es wurden (Proteo-) Liposomen mit (+MP) und ohne (-MP) Membranpotential untersucht. Die Proben wurden sedimentiert und in Überstand (Sn) und Pellet (Pel) aufgeteilt, die

Bindungsrate (B) an die Vesikel wurde analysiert. Die Einbaurate (E) in die Lipidvesikel wurde durch die Zugabe von Proteinase K in Ab- und Anwesenheit (PK +) von Detergenz überprüft. Die Proben wurden mit 15% TCA gefällt, über ein Tricin-SDS-PAG aufgetrennt und durch eine anschließende Immunfärbung mithilfe des M13-Antikörpers visualisiert.

### **4.11. Diacylglycerin in *E. coli* Gesamtextraktlipiden**

#### **verhindert die Spontaninsertion von M13 procoat**

Die Lipide des *E. coli* Gesamtextraktes von Avanti Polar Lipids Inc. wiesen eine große Varianz in der Qualität auf. Je nach Charge führten diese zu stark undichten Liposomen und zeigten Spontaneinbau der kleinen Proteine wie M13 procoat (diese Arbeit) und Pf3 coat (Schönbauer, 2011) in Liposomen. Vor deren Verwendung musste zunächst die Reinheit und Integrität der Liposomenmembran überprüft werden. Der Lipidextrakt wies häufig Verunreinigungen auf, welche möglicherweise die spontane Insertion begünstigen konnten, weshalb zunächst eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt wurde. Da der *E. coli* Gesamtextrakt laut Herstellerangaben 17% andere Bestandteile enthält, wurden die Verunreinigungen zunächst mittels einer Fällung mit eiskaltem Aceton entfernt (siehe 3.22). Da die Lipidkonzentration nach der Fällung mit Aceton nicht bekannt war, wurde eine Konzentrationsbestimmung und genaue Analyse der Lipidzusammensetzung mittels einer Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Während der Fällung werden Verunreinigungen, aber auch geringe Mengen an Lipiden im Acetonüberstand gelöst und gehen verloren. Für die Konzentrationsbestimmung der Lipide wurden 100 mg *E. coli* Gesamtextrakt in 5 ml Dichlormethan (DCM) und 2 Tropfen Methanol (MeOH) gelöst. Aus dieser Lösung wurden Proben von 0, 5, 10, 15, 20 und 25 µl für die Erstellung einer Eichgerade entnommen und auf die Dünnschichtchromatographie (DC)-Platte aufgetropft. Der Lipidniederschlag wurde nach der Fällung in 4 ml DCM und 2 Tropfen MeOH gelöst und zweimal je 5 µl Probe entnommen. Die Eichlösung hatte eine Konzentration von 20 mg/ml, wobei laut Herstellerangaben von 100 mg 17% andere Bestandteile darstellten. Die Gesamtlipidmenge in der Eichlösung betrug daher 83 mg in 5 ml DCM (16,6 mg/ml), die Proben hatten somit jeweils eine Lipidmenge von 0, 83, 166, 249, 332 und 415 µg Lipid. Die beiden Flecken des *E. coli* Gesamtextraktes nach erfolgter Acetonfällung hatten einen Durchmesser, der vergleichbar mit der 83 µg Probe der Eichlösung war (siehe Abb64). Die Ermittlung der Lipidkonzentration des *E. coli* Gesamtextraktes nach der Acetonfällung (gelöst in 4 ml DCM) ergab eine Restmenge von ca. 70 mg an Lipid, wodurch sich ein Verlust von 13 mg Lipiden bei einer Acetonfällung von 100 mg *E. coli* Gesamtlipidextrakt (83 mg Gesamtlipid) ergab. Somit betrug der Verlust an Lipid ca. 15%.

## Ergebnisse

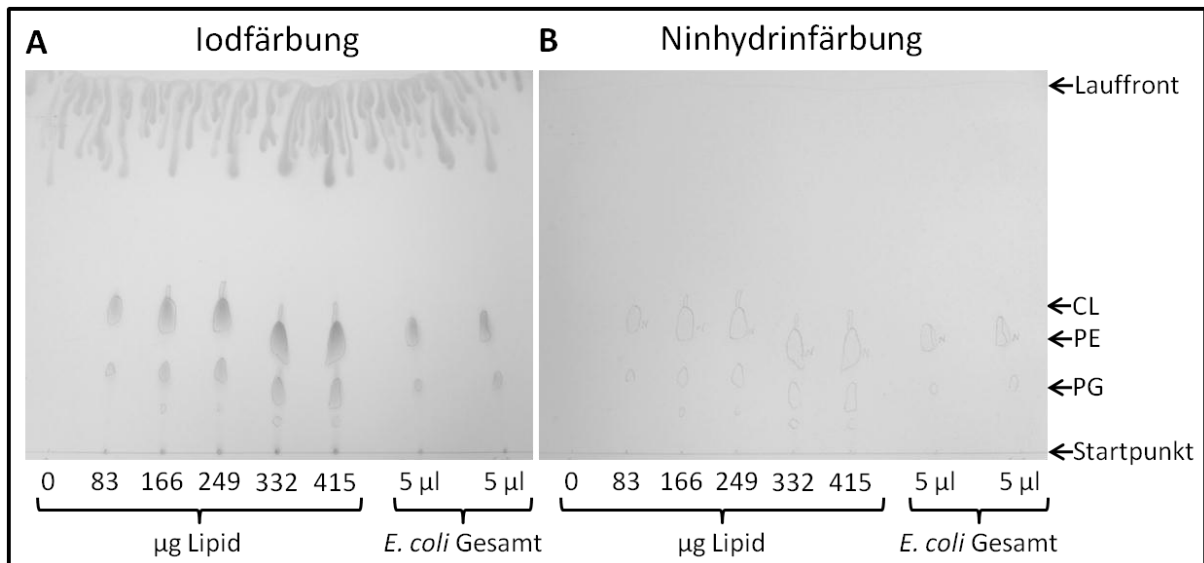


Abb64. **Dünnschichtchromatogramm zur Konzentrationsbestimmung des *E. coli* Gesamtextraktes nach erfolgter Acetonfällung**

Die Dünnschichtchromatographie wurde auf einer Silicagelplatte in einem Laufmittel aus  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$  in den Verhältnissen 85:30:4 (v/v/v) durchgeführt. Nach dem Trocknen wurde die DC-Platte reversibel mit Iod gefärbt und die Lipidspuren mit einem Bleistift markiert. Nach dem Entfernen des Iods erfolgte die Ninhydrinfärbung, um Aminogruppen zu visualisieren. Aufgetragen wurden jeweils 0, 5, 10, 15, 20 und 25 µl einer 16,6 mg/ml Lipidlösung in DCM (entspricht jeweils 0, 83, 166, 249, 332, 415 µg Lipid), sowie je 5 µl des *E. coli* Gesamtextraktes nach der Acetonfällung (gelöst in 4 ml DCM). Der Lipidverlust des *E. coli* Gesamtextraktes nach der Fällung mit Aceton betrug ca. 15%.

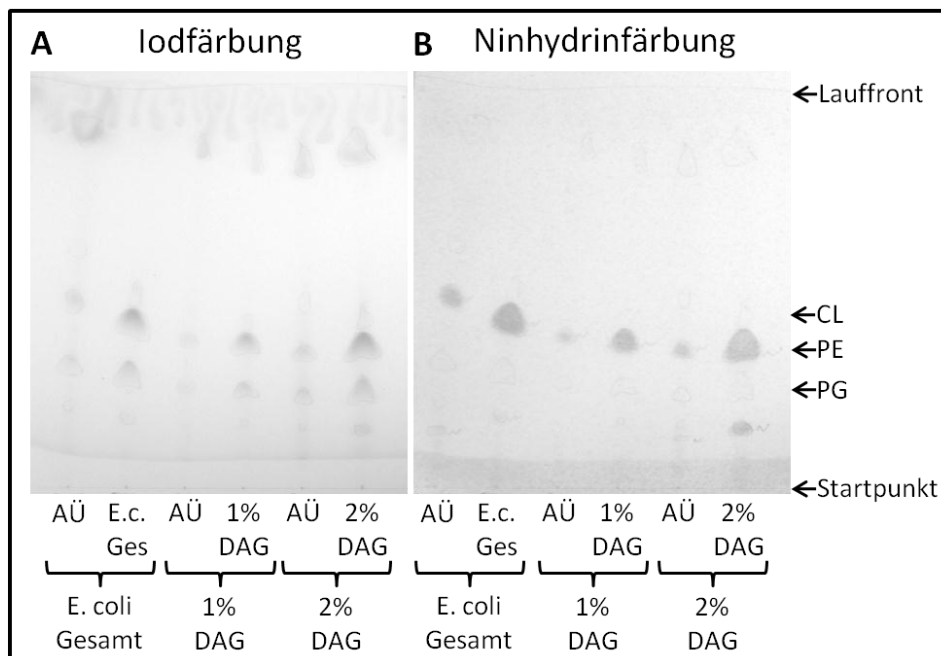


Abb65. **Dünnschichtchromatogramm des *E. coli* Gesamtextraktes mit unterschiedlichen Konzentrationen an DAG**

Die Dünnschichtchromatographie wurde auf einer Silicagelplatte in einem Laufmittel aus  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$  in den Verhältnissen 85:30:4 (v/v/v) durchgeführt. Nach dem Trocknen wurde die DC-Platte reversibel mit Iod gefärbt und die Lipidspuren mit einem Bleistift markiert. Nach dem Entfernen des Iods erfolgte die Ninhydrinfärbung, um Aminogruppen zu visualisieren. Aufgetragen wurden jeweils der Acetonüberstand und die korrespondierende Lipidmischung (*E. coli* Gesamtextrakt ohne DAG, mit 1 und 2% DAG) nach der Acetonfällung.

## Ergebnisse

Vor der Zugabe von Diacylglycerin (DAG) wurde eine Acetonfällung des *E. coli* Gesamtextraktes durchgeführt. Der ermittelte Verlust an Lipid ermöglichte die Berechnung der DAG-Menge, die zugefügt werden musste. Die Reinheit der *E. coli* Gesamtextraktlipide ohne, mit 1% und 2% DAG sind in Abb65 dargestellt. Es wurde vor der Zugabe von DAG eine Acetonfällung des *E. coli* Gesamtextraktes zur Entfernung von Proteinbestandteilen durchgeführt. Anschließend wurde die erforderliche Menge an DAG zugegeben und die Proben auf eine DC-Platte aufgetragen.

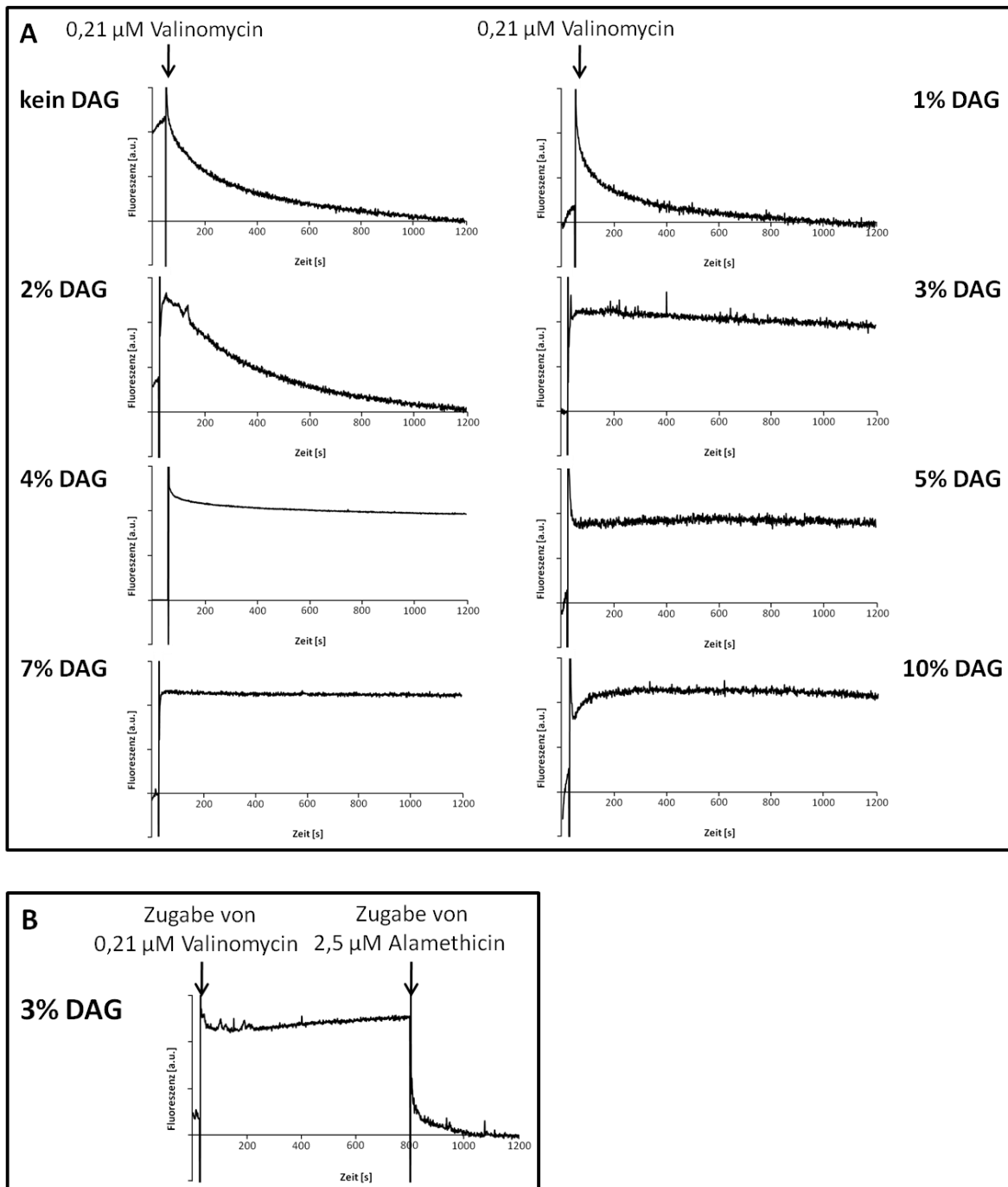
Für die Herstellung der Liposomen wurde ein Extruder verwendet. Hierbei wurden die multilamellaren Vesikel mehrmals durch die Polycarbonatmembran des Extruders gedrückt und erhielten somit eine gleichmäßige Größenverteilung. Die Membran besaß eine Porengröße von 400 nm, wodurch die extrudierten Vesikel eine durchschnittliche Größe von 250-350 nm erhielten. Die Bestimmung der Liposomengröße wurde mithilfe des Sub Micron Particle Analyzer Model N4SD durchgeführt und ergab eine gleichmäßige Größenverteilung (siehe Abb19). Aufgrund der Qualitätsunterschiede der Liposomen wurde zunächst die Stabilität des Membranpotentials der *E. coli* Gesamtextraktlipide untersucht, um die Membranintegrität bestimmen zu können. War das Membranpotential dieser Vesikel nicht über 20 min stabil (Abb66 A, kein DAG), wurde Diacylglycerin in steigender Konzentration zugegeben, bis die Liposomen für den Durchtritt von Kaliumionen dicht waren und das Membranpotential stabil blieb (Stiegler *et al.*, 2011). Um ein Diffusionspotential zu erhalten, wurden die Liposomen mittels der Extrudermethode in Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0) hergestellt und nach einer Zentrifugation bei 120 000 *g* in Puffer K (10 mM HEPES, 100 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0) resuspendiert. Das Membranpotential wurde durch die Zugabe von 0,21 µM Valinomycin generiert. Dieses Antibiotikum transportiert spezifisch Kaliumionen. Als Folge ist im Inneren des Vesikels ein Überschuss an positiver Ladung vorhanden. Das sich generierende Membranpotential kann mithilfe von Oxonol VI photometrisch bei einer Anregung mit 599 nm und einer Emission von 634 nm gemessen werden (Venema *et al.*, 1993; Apell & Bersch, 1987).

Nachdem die Liposomen ohne DAG ein Membranpotential nur wenige Sekunden halten konnten (siehe Abb66 A, kein DAG), wurde dem *E. coli* Gesamtextrakt 1% oder 2% DAG zugegeben. Mit diesen Liposomen war für ca. 400 s ein Membranpotential messbar, dieses war jedoch sehr instabil und sank ab (Abb66, 1% und 2%). Bei den Phospholipidvesikeln mit 3% DAG hingegen blieb das Potential über 20 min stabil, was darauf hindeutet, dass die Liposomen für den Durchtritt von Ionen dicht waren. Die Vesikel mit 4%, 5%, 7% und 10% DAG waren ebenfalls dicht und wiesen ein stabiles Potential über mehr als 20 min auf. Somit wurde gezeigt, dass eine Konzentration von mindestens 3% DAG die Membranintegrität der *E. coli* Gesamtextraktlipide stabilisierte und undichte Lipidvesikel repariert werden konnten. Diese Liposomen zeigten nicht nur ein stabiles Membranpotential, sondern auch keinen spontanen Einbau von M13 procoat



## Ergebnisse

(siehe Abb68), wie schon Nishiyama *et al.* (2006) und Kawashima *et al.* (2008) zeigen konnten. Für die folgenden Versuche wurden den Lipiden des *E. coli* Gesamtextraktes 3% DAG zugegeben, da diese Konzentration ausreichend war, um ein Membranpotential stabil zu halten.



### Abb66. Die Zugabe von steigenden Konzentrationen an DAG bewirkte die Stabilisierung des Membranpotentials

Die Herstellung der Liposomen erfolgte mithilfe des Extruders in Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , pH 8.0). Nach der Zentrifugation bei 120 000  $g$  wurden die Vesikel in Puffer K (10 mM HEPES, 100 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , pH 8.0) resuspendiert (Liposomen mit  $\text{Na}^+_{\text{in}}/\text{K}^+_{\text{out}}$ ). Durch die Zugabe von 0,21  $\mu\text{M}$  Valinomycin sollte ein Membranpotential generiert werden, welches durch die Zunahme der Fluoreszenz von 0,34  $\mu\text{M}$  Oxonol VI bei 599/634 nm Anregung/Emission für 20 min gemessen wurde. Die Stabilität des Membranpotentials verbesserte sich mit zunehmender DAG-Konzentration (A). In B wurden nach 800 s 2,5  $\mu\text{M}$  Alamethicin zugegeben, wodurch das Membranpotential unmittelbar zerstört wurde.

## Ergebnisse

Zur Kontrolle des Transmembranpotentials wurde Alamethicin in die Kuvette gegeben, um das generierte Membranpotential zu zerstören (siehe Abb66 B). Dies führte zu einem Ladungsausgleich zwischen innen und außen, wodurch die Fluoreszenz von Oxonol VI gequenchet wurde und die Kurve unmittelbar nach der Zugabe (nach 800 s) von 2,5  $\mu\text{M}$  Alamethicin zur Nulllinie hin absank.

Es wurde die Phasenumwandlungstemperatur des *E. coli* Gesamtextraktes mit unterschiedlichen DAG-Konzentrationen bestimmt, um eventuelle Unterschiede durch das Diacylglycerin zu detektieren (siehe Abb67). Hierfür wurden die Liposomen mittels der Extrudermethode in Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , pH 8.0) hergestellt und in Puffer N mit 5 M Glycerin gemessen. Die Phasenumwandlungstemperatur  $T_m$  der *E. coli* Lipidextrakte mit steigenden Konzentrationen an DAG wurde graphisch mittels Boltzmann-Fitting ermittelt. Der Transitions- punkt stieg mit zunehmender DAG-Konzentration leicht an.

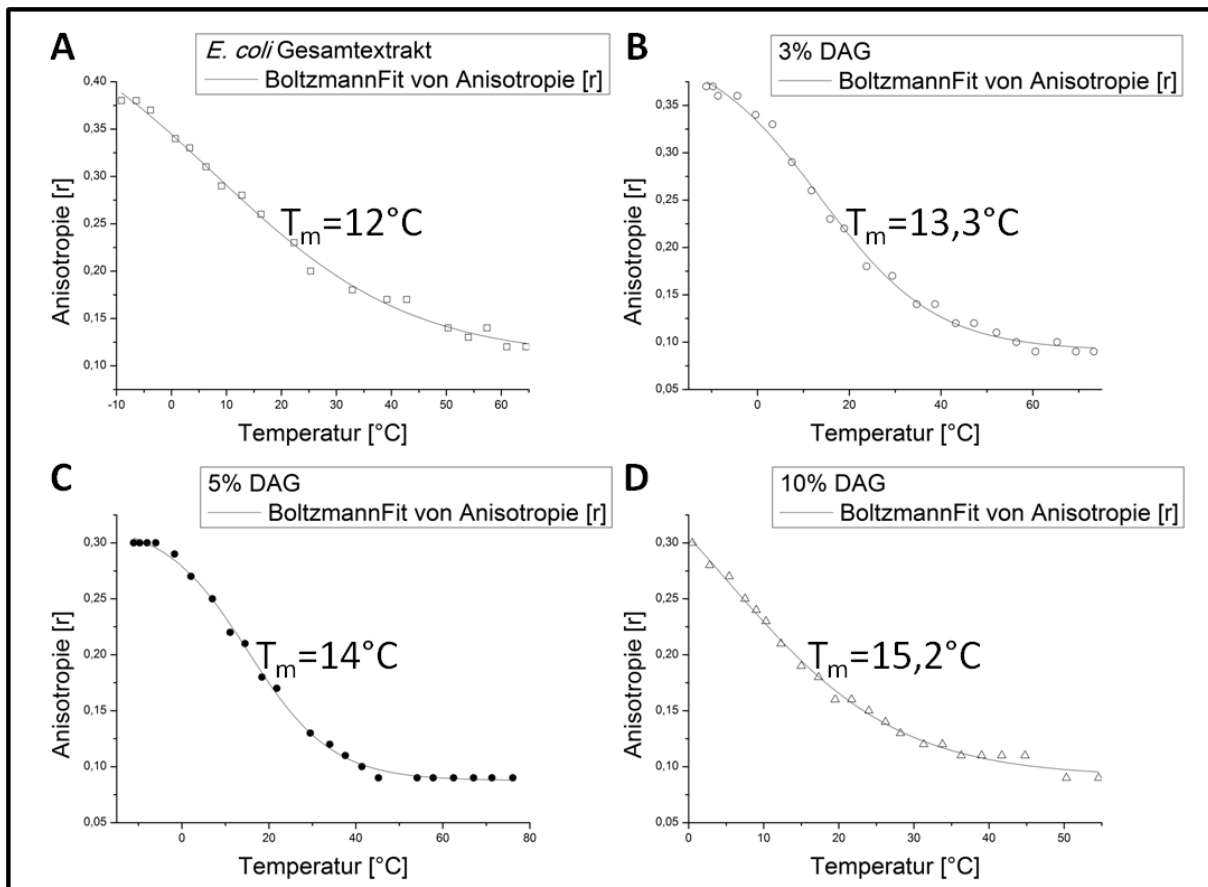
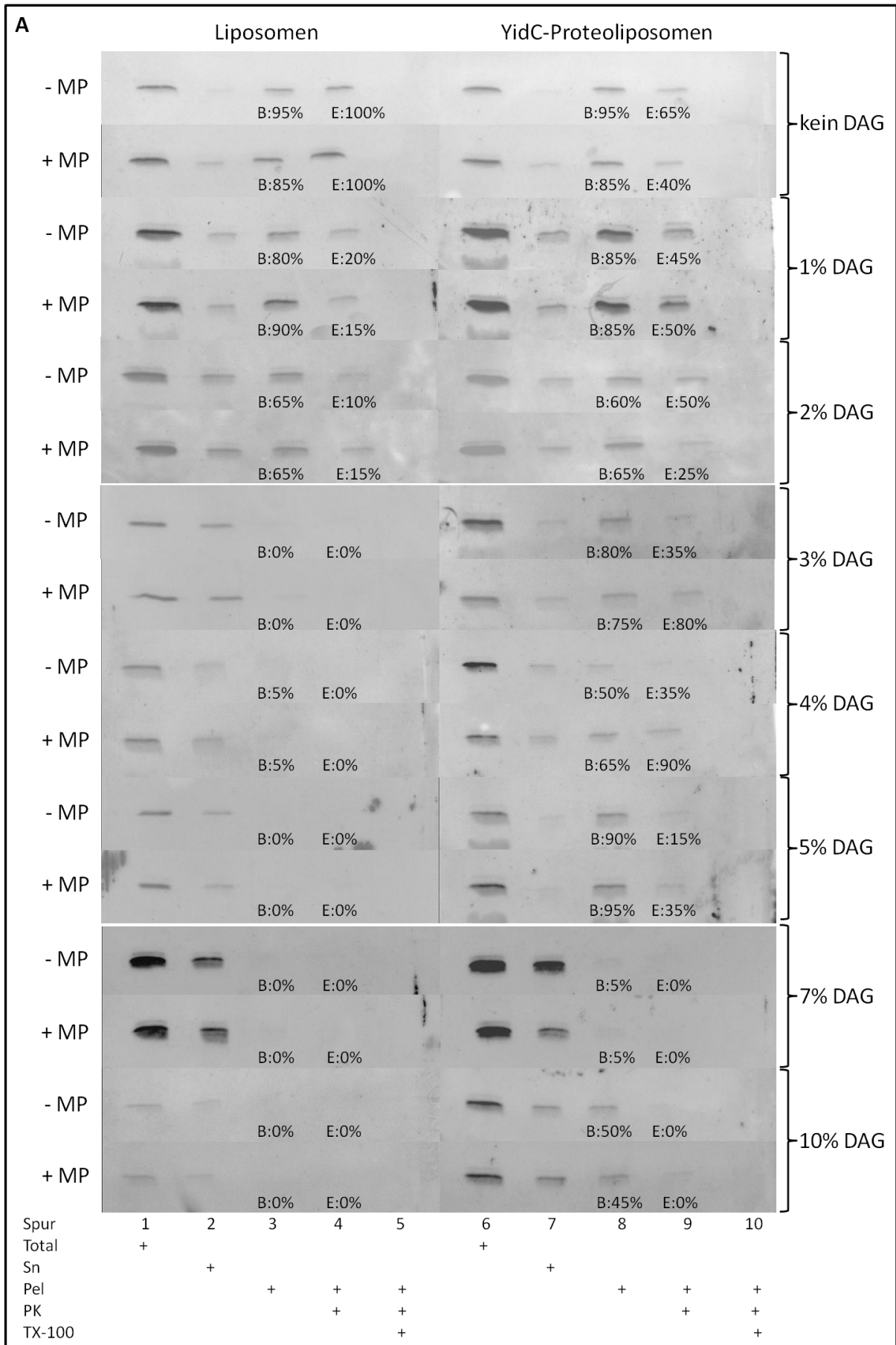


Abb67. **Anisotropie der *E. coli* Lipidextrakte mit unterschiedlichen Konzentrationen an DAG**

Die Herstellung der Liposomen erfolgte mithilfe des Extruders in Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , pH 8.0). Die Messung der Phasenumwandlungstemperatur ( $T_m$ ) wurde mithilfe des Farbstoffs DPH und des Fluorolog-spektrometers durchgeführt. Gemessen wurde der *E. coli* Gesamtextrakt (A) und jeweils der Gesamtextrakt mit 3% DAG (B), 5% DAG (C) und 10% DAG (D).

## Ergebnisse

Die Integrität der Membranvesikel ist eine Voraussetzung für *in vitro*-Translokationsexperimente. Welche Konzentration an Diacylglycerin (DAG) erwies sich für die Insertion von M13 procoat H5 als ideal und ausreichend? Um den spontanen Einbau von M13 procoat untersuchen zu können, wurde der Lipidlösung steigende Konzentrationen an DAG beigefügt (Stiegler *et al.*, 2011). Vesikel des *E. coli* Gesamtextraktes ohne DAG zeigten diesen Spontaneinbau (siehe Abb68 A, kein DAG). Die Bindungsrate von Procoat an die Liposomen und YidC-Proteoliposomen war nahezu identisch. Wurde dem Ansatz Proteinase K zugefügt, so war mehr Protein in den Liposomen vor dem Verdau geschützt als bei den Proteoliposomen (Spuren 4). Eine Abhängigkeit vom Membranpotential war dabei nicht zu erkennen. Liposomen mit 1% oder 2% DAG hingegen zeigten reduzierte Raten an Spontaninsertion. In Liposomen mit 1% DAG wurden noch 15-20% des gebundenen Proteins ohne YidC eingebaut (1% DAG, Spur 4), während in solche mit 2% DAG nur ca. 10-15% inserierten (2% DAG, Spur 4). Eine Abhängigkeit vom Membranpotential war bei den Liposomen mit 1% und 2% DAG nicht zu erkennen. Die korrespondierenden YidC-Proteoliposomen wiesen mit ca. 85% (1% DAG, Spuren 3) bzw. ca. 60% (2% DAG, Spuren 3) leicht reduzierte Bindungsraten auf. Die Insertionseffizienz wurde vom Membranpotential hierbei nicht verbessert. Wurde den Lipiden hingegen mindestens 3% DAG zugegeben, so war die Effizienz der Bindung des Procoatproteins an die Liposomen mit und ohne Membranpotential bei 0% und folglich wurde das M13 procoat H5 nicht mehr spontan inseriert (3% DAG, Liposomen Spuren 3 und 4). Die YidC-Proteoliposomen mit 3% DAG zeigten dagegen eine Bindungsrate von mindestens 75% (Spuren 3), wobei die Translokationseffizienz mit Membranpotential mit 80% deutlich höher war als ohne Potential mit nur 35% (Spuren 4). Auch das Translokationsverhalten von Liposomen und Proteoliposomen mit 4% DAG wurde verbessert und zeigte keinen spontanen Einbau. Die Vesikel mit 5% DAG waren ebenfalls dicht und zeigten mit YidC eine Bindungsrate von über 90% (Spuren 3). Die Einbaurrate hingegen war mit 15% ohne und mit 35% mit Membranpotential deutlich verringert (Spuren 4) im Vergleich zu denen mit 3% DAG. Dieser Effekt war mit den Proteoliposomen mit 7% und 10% DAG nochmals deutlicher. Hierbei war schon die Bindungsrate des M13 procoat H5 an die 10% DAG-Proteoliposomen mit ca. 50% vermindert und mit 7% DAG sogar nicht mehr nachweisbar (Spuren 3). Vermutlich schirmt die höhere Konzentration an DAG die Vesikel nach außen hin ab und verhindert den Kontakt zu dem Substrat. Die Vesikel mit 10% DAG waren so wenig fluide, dass sie die Polycarbonatmembran des Extruders nicht mehr passieren konnten. Dies könnte darauf hindeuten, dass hohe Konzentrationen an DAG die Membran sehr starr machen. Vor der Protease geschütztes H5-Protein war mit 7% DAG-Proteoliposomen nicht nachweisbar und mit 10% DAG sehr gering. Abschließend kann hierbei geschlussfolgert werden, dass eine Konzentration von 3 mol% an DAG ausreichend war, um die *E. coli* Gesamtextraktlipide vor Spontaneinbau des M13 procoat H5 abzuschirmen.



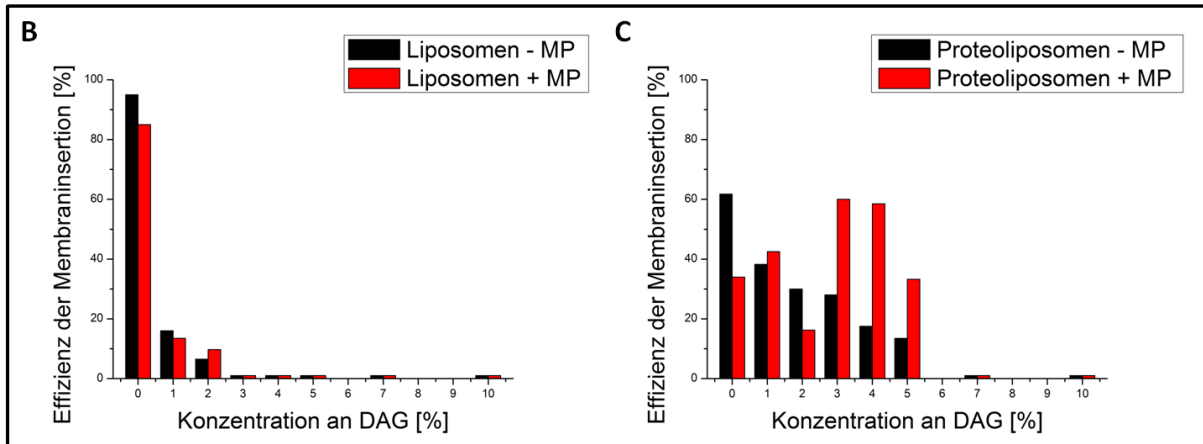


Abb68. **Translokation von M13 procoat H5 in *E. coli* Gesamtextraktlipidvesikel mit steigender Menge an DAG**  
**A:** Die Translokationsrate von M13 procoat H5 in (Proteo-) Liposomen mit steigender Konzentration an DAG (kein DAG, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 7% und 10% DAG) wurde überprüft. Die Herstellung der Lipidvesikel erfolgte mithilfe der Extrudermethode in Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0). Die Translokation des gereinigten Proteins M13 procoat H5 in Liposomen und YidC-Proteoliposomen wurde für 30 min bei 37°C durchgeführt. Es wurden (Proteo-) Liposomen mit (+MP) und ohne (-MP) Membranpotential untersucht. Die Proben wurden sedimentiert und in Überstand (Sn) und Pellet (Pel) aufgeteilt, die Bindungsrate (B) an die Vesikel wurde analysiert. Die Einbauraten (E) in die Lipidvesikel wurde durch die Zugabe von Proteinase K in Ab- und Anwesenheit (PK +) von Detergenz überprüft. Die Proben wurden mit 15% TCA gefällt, über ein Tricin-SDS-PAG aufgetrennt und durch eine anschließende Immunfärbung mithilfe des M13-Antikörpers visualisiert.

**B** und **C:** Dargestellt sind die Ergebnisse der Translokation von M13 procoat H5 in Liposomen mit (rot) und ohne (schwarz) Membranpotential (**B**), sowie in Proteoliposomen mit (rot) und ohne (schwarz) Membranpotential (**C**) hergestellt aus dem *E. coli* Gesamtextrakt ohne, sowie mit 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 7% und 10% DAG. Hierbei wurde der Prozentsatz der Rate an gebundenem Protein und dessen Insertionsrate im Verhältnis zur Gesamtmenge an Protein in den Spuren 2+3 berücksichtigt.

In Abb68 **B** und **C** sind graphisch die Effizienzen der Membraninsertion von M13 procoat H5 in *E. coli* Gesamtextraktlipide dargestellt, die kein oder steigende Mengen an DAG enthielten. Der Spontaneinbau des Proteins nahm mit steigender Konzentration an DAG in Liposomen (**B**) von anfangs ca. 90% ohne DAG bis zu unter 20% mit 1% und 2% DAG ab. Mit mindestens 3% DAG war keine Membraninsertion von M13 procoat H5 in Liposomen mehr erkennbar. Wurden die Proteoliposomen (**C**) analysiert, so war erkennbar, dass ohne DAG der Einbau vom Membranpotential unabhängig war. Dieser Effekt war bis zu einer Konzentration von 2% DAG weiterhin vorhanden, weshalb eine höhere Anzahl an Procoatproteinen in YidC-Proteoliposomen ohne Membranpotential eingebaut wurde als in solche mit Potential. Ab einer Konzentration von 3% DAG war die Insertion des Proteins M13 procoat H5 abhängig vom Membranpotential und mit über 50% sehr effizient. Stieg die DAG-Konzentration auf 5% an, so nahm die Einbauraten deutlich ab. Bei 5% DAG betrug sie unter 40%, bei 7% und 10% DAG wurde Procoat durch YidC gar nicht inseriert.

## Ergebnisse

Die Translokationseffizienz wurde ebenfalls mit dem Protein M13 procoat H5EE getestet. Die Herstellung erfolgte hierbei analog der des H5-Proteins. Wurden Liposomen verwendet, die kein DAG enthielten (siehe Abb69 A), so zeigte sich, dass das Protein unabhängig vom Membranpotential vor dem Proteaseverdau geschützt war und ca. die Hälfte des gebundenen Proteins inseriert wurde (Spuren 4). Die YidC-Proteoliposomen wiesen ebenfalls keine Abhängigkeit vom Membranpotential auf, da die Insertionseffizienz jeweils bei ca. der Hälfte des eingesetzten Proteins lag (Spuren4). Das Vorhandensein von 1% DAG führte zu einer Verminderung der spontanen Insertion von H5EE. Wurden Liposomen mit 1% DAG verwendet, so wurden nur 15% bzw. 20% inseriert (Spuren 4). Die entsprechenden YidC-Proteoliposomen inserierten ca. ein Viertel des gebundenen Proteins (Spuren 4). Das Vorhandensein von 3% DAG führte zu einer weiteren Reduktion der Spontaninsertion. In die korrespondierenden YidC-Proteoliposomen wurden noch 30% ohne bzw. 45% mit Membranpotential in die Membran integriert (Spuren 4). Liposomen mit 4% DAG wiesen eine Bindungseffizienz von 100% auf (Spuren 3), inseriert wurde aber nahezu nicht spontan (Spuren 4). Die Insertion des Proteins H5EE in Proteoliposomen mit 4% DAG zeigte, dass 30% ohne und 40% mit Membranpotential eingebaut wurden. Wurde die DAG-Konzentration auf 5% erhöht, so zeigte H5EE keine Insertion mehr in Liposomen. Die YidC-enthaltenden Proteoliposomen mit 5% DAG zeigten eine Einbaurrate von 35% ohne und 40% mit Membranpotential (Spuren 4).

Die graphische Darstellung in Abb69 B und C zeigt die Effizienz der Membraninsertion von M13 procoat H5EE in *E. coli* Gesamtextraktlipide, die kein, 1%, 3%, 4% und 5% DAG enthielten. Das Protein M13 procoat H5EE wurde spontan in die Liposomen inseriert, die kein oder nur 1% DAG enthielten. M13 procoat H5EE wurde in Liposomen (B) ohne und mit 1% DAG bis zu einem Prozentsatz von bis zu 20% inseriert. Stieg die DAG-Konzentration auf 3% an, so wurde die Abhängigkeit vom Membranpotential deutlicher. Wurden die Proteoliposomen (C) analysiert, so war zu erkennen, dass die Einbaurrate von H5EE vom Membranpotential leicht abhängig war.

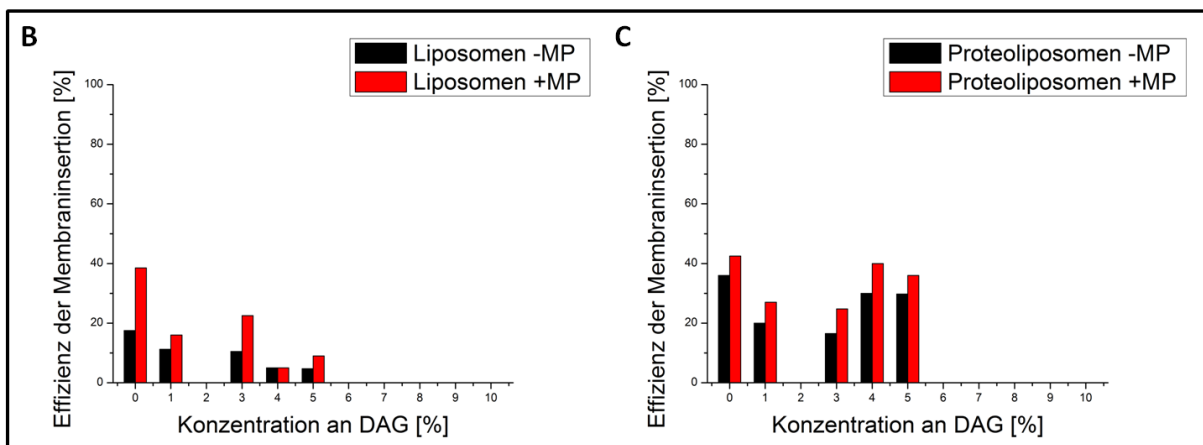
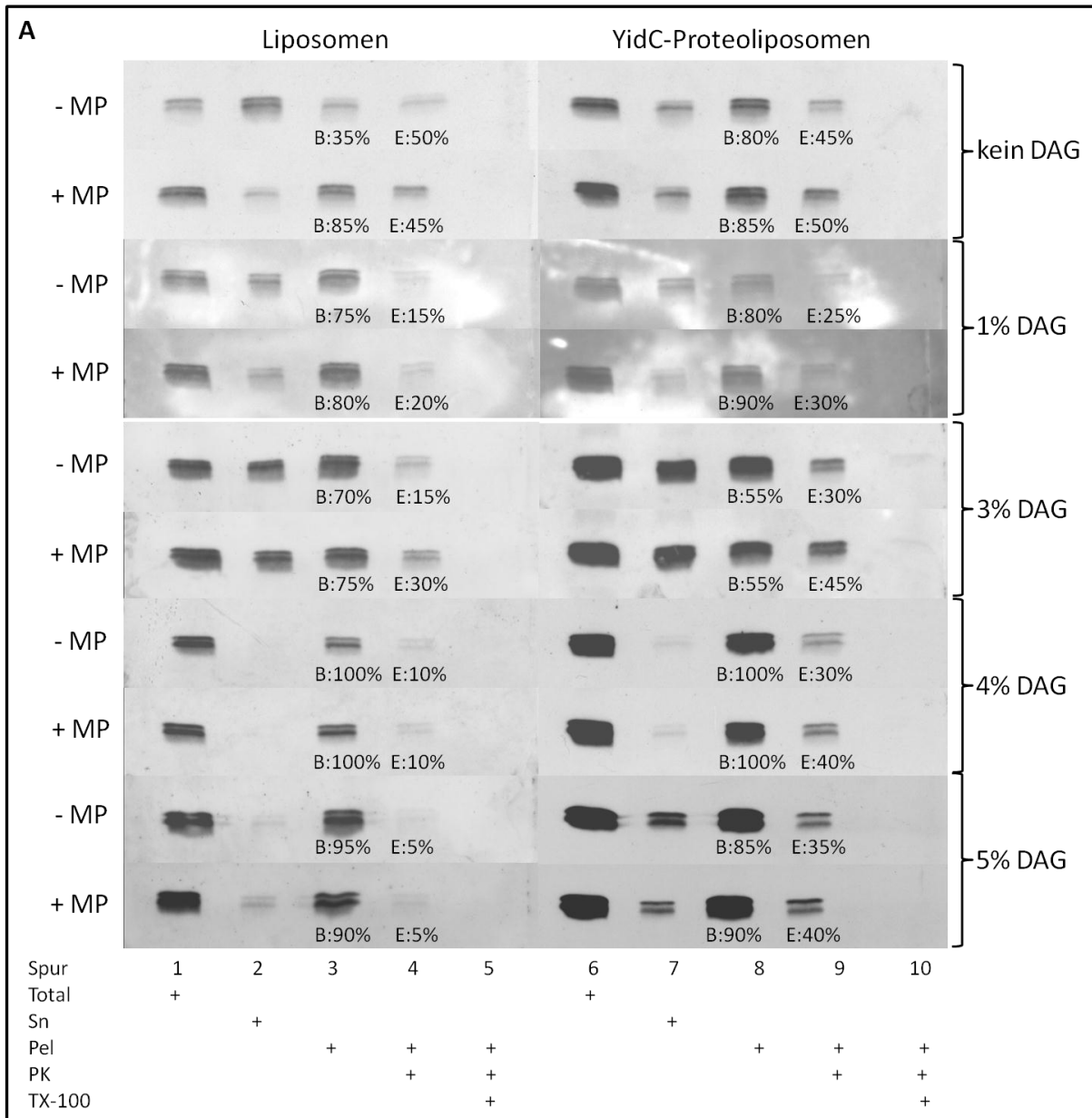


Abb69. Translokation von M13 procoat H5EE in *E. coli* Gesamtextraktlipidvesikel mit steigender Menge an DAG

A: Die Translokationsrate von M13 procoat H5EE in (Proteo-) Liposomen mit steigender Konzentration an DAG (kein DAG, 1%, 3%, 4% und 5% DAG) wurde überprüft. Die Herstellung der Lipidvesikel erfolgte mithilfe der Extruder-

## Ergebnisse

methode in Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0). Die Translokation des gereinigten Proteins M13 procoat H5EE in Liposomen und YidC-Proteoliposomen wurde für 30 min bei 37°C durchgeführt. Es wurden (Proteo-) Liposomen mit (+MP) und ohne (-MP) Membranpotential untersucht. Die Proben wurden sedimentiert und in Überstand (Sn) und Pellet (Pel) aufgeteilt, die Bindungsrate (B) an die Vesikel wurde analysiert. Die Einbaurate (E) in die Lipidvesikel wurde durch die Zugabe von Proteinase K in Ab- und Anwesenheit (PK +) von Detergenz überprüft. Die Proben wurden mit 15% TCA gefällt, über ein Tricin-SDS-PAG aufgetrennt und durch eine anschließende Immunfärbung mithilfe des M13-Antikörpers visualisiert.

**B** und **C**: Dargestellt sind die Ergebnisse der Translokation von M13 procoat H5EE in Liposomen mit (rot) und ohne (schwarz) Membranpotential (**B**), sowie in Proteoliposomen mit (rot) und ohne (schwarz) Membranpotential (**C**) hergestellt aus dem *E. coli* Gesamtextrakt ohne und mit 1%, 3%, 4% und 5% DAG. Hierbei wurde der Prozentsatz der Rate an gebundenem Protein und dessen Insertionsrate im Verhältnis zur Gesamtmenge an Protein in den Spuren 2+3 berücksichtigt.

## 4.12. Membraninsertion durch die Translokase SecYEG

### 4.12.1. Rekonstitution von YidC und SecYEG in Lipidvesikel

Um die Komponenten der Sec-abhängigen und Sec-unabhängigen Translokation vergleichen zu können, wurde zusätzlich zur Translokation in invertierte Membranvesikel auch die Insertion in SecYEG-Proteoliposomen überprüft. Die Rekonstitution von SecYEG in Lipidvesikel getrennt von anderen Proteinen wie z.B. YidC ermöglicht die kontrollierte Untersuchung der Vorgänge während der Translokation. Die Rekonstitution von gereinigtem SecYEG erfolgte mithilfe von Bio Beads, da diese Methode für den großen Proteinkomplex schonender war. Die YidC-Rekonstitution erfolgte zuvor meist mittels der Extrudermethode (siehe 3.28.1.), wurde für diese Experimente aber zwecks der besseren Vergleichbarkeit ebenfalls mithilfe der Bio Beads durchgeführt (siehe 3.28.2.). Hierbei wurde das gereinigte Protein mit Dodecylmaltosid zu unilamellaren Vesikeln gegeben und gemeinsam inkubiert. Zunächst wurden Detergenzmoleküle in die Membran eingebaut. Anschließend wurde das gereinigte Protein zugegeben und das Detergenz nach erfolgter Rekonstitution mittels der Harzkügelchen Bio Beads wieder entfernt.

Die Herstellung der unilamellaren Vesikel (*E. coli* Gesamtextrakt 3% DAG) erfolgte mithilfe des Extruders und führte zu großen unilamellaren Vesikeln (LUV) mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 250 bis 350 nm. Die Rekonstitution von in Dodecylmaltosid gereinigtem YidC bzw. SecYEG erfolgte hinterher nach der Behandlung mit Detergenz. Bei der Inkubation mit einem Überschuss an Dodecylmaltosid (10-fache cmc) schwellen die Vesikel in ihrer Größe an, da die Detergenzmoleküle in die Membran integriert werden. Der Größenunterschied war mit dem Sub Micron Particle Analyzer messbar (Größenzunahme um ca. 50 bis 100 nm). Hierdurch wurde die Membran auch für große Proteinkomplexe wie SecYEG durchlässig und die Proteine konnten im Bilayer verankert werden. Abschließend wurden 100 mg/ml der Polystyrolpolymere Bio Beads zugegeben, um das Detergenz aus den Vesikeln zu entfernen. Die Verwendung der Bio Beads zur Rekonstitution von Membranproteinen ist in Lévy *et al.* (1990)



## Ergebnisse

beschrieben. Die Herstellung der Liposomen für die Kontrollversuche erfolgte zum Vergleich analog ohne die Zugabe von gereinigtem Protein. Die gewonnenen Proteoliposomen wurden auf einem 60%-igen Saccharosekissen zentrifugiert, um die Proteoliposomen von ungebundenem Protein und Aggregaten zu separieren. Die Proteoliposomen floaten hierbei auf der Grenzschicht zur Saccharose (Fl), während die ungebundenen Proteine im Überstand (Sn) und die eventuell auftretenden Aggregate im Pellet (Pel) verbleiben. Die Insertase YidC befand sich zum Großteil in den Proteoliposomen und wurde somit effizient in diese rekonstituiert (siehe Abb70 Anti-C gegen YidC). Geringe Mengen waren im Überstand und Pellet zu finden. Bei der Rekonstitution von SecYEG (siehe Abb70 Anti-SecY gegen SecY) wurden keine Aggregate gebildet, da im Pellet keine Proteine detektierbar waren. Analog wurden die Proteine SecE und SecG mit den Antikörpern Anti-His-tag bzw. Anti-SecG nachgewiesen und ergaben ähnliche Ergebnisse (nicht dargestellt). Der Großteil der Proteine konnte mit den spezifischen Antikörpern in der gefloateten Fraktion nachgewiesen werden. Lediglich ein geringer Anteil wurde in den Überständen detektiert und hatte nicht an die Vesikel gebunden. In einem Kontrollexperiment wurde das jeweilige Protein auf dem Saccharosekissen ohne Vesikel zentrifugiert und war ausschließlich im Pellet zu finden. Für die *in vitro*-Translokationsversuche wurde jeweils nur die gefloatete Fraktion verwendet, welche die reinen Proteoliposomen enthielt.

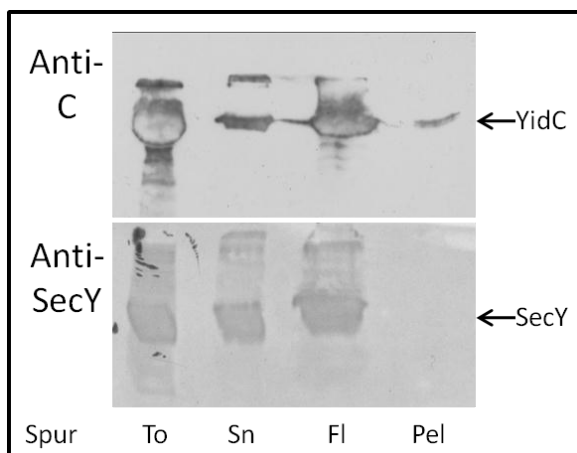
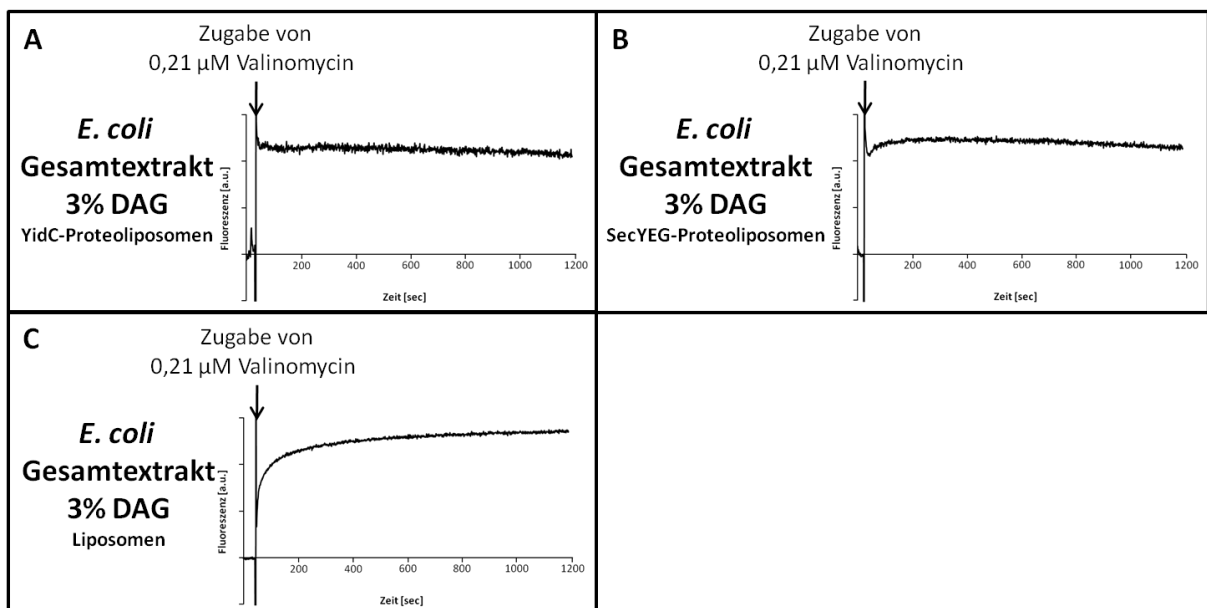


Abb70. **Rekonstitution von YidC bzw. SecYEG in *E. coli* Gesamtextraktlipide mit 3% DAG**

Die Herstellung der Liposomen (*E. coli* Gesamtextrakt 3% DAG) erfolgte mithilfe der Extrudertechnik. Anschließend erfolgte die Rekonstitution der gereinigten Proteine YidC bzw. SecYEG durch die Bio Beads-Methode. Nach dem Entfernen des Dodecylmaltosids durch die Harzkügelchen Bio Beads folgte eine Zentrifugation auf einem 60%-igen Saccharosekissen. Eventuelle Aggregate befanden sich nach der Zentrifugation im Pellet (Pel), ungebundenes Protein war im Überstand (Sn) zu finden und die Proteoliposomen waren auf der Grenzschicht zur Saccharose detektierbar (Fl). Die Proben wurden durch ein 15%-iges SDS-PAG aufgetrennt und die einzelnen Proteine mit den spezifischen Antikörpern (YidC → AK C, SecY → AK SecY) nachgewiesen.

## Ergebnisse

Die Membranintegrität der Proteoliposomen mit rekonstituiertem YidC bzw. SecYEG wurde durch Messung des Membranpotentials überprüft. Zunächst wurden die LUV mittels der Extrudermethode in Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0) hergestellt. Anschließend wurden die gereinigten Proteine YidC bzw. SecYEG mittels der Bio Beads-Methode rekonstituiert. Die Herstellung der Liposomen erfolgte ohne die Zugabe von gereinigtem Protein. Um ein Diffusionspotential zu erhalten, wurden die Liposomen und die YidC- bzw. SecYEG-Proteoliposomen nach der Zentrifugation bei 120 000 *g* in Puffer K (10 mM HEPES, 100 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0) resuspendiert. Das Membranpotential (siehe Abb71) wurde durch die Zugabe von 0,21 µM Valinomycin generiert. Die Fluoreszenz von 0,34 µM Oxonol VI wurde photometrisch bei einer Anregung mit 599 nm und einer Emission von 634 nm für 20 min aufgenommen. Beide Proteoliposomen, sowie die Liposomen, welche mit der Bio Beads-Methode hergestellt wurden, zeigten ein stabiles Membranpotential. Es konnte geschlussfolgert werden, dass durch die Rekonstitution von YidC (A) bzw. SecYEG (B) kein restliches Detergenz mehr vorhanden war, dieses wurde mithilfe der Bio Beads ausreichend entfernt. Die Liposomen zeigten ein stabiles Membranpotential (siehe Abb71 C) und ließen somit keinen Spontaneinbau zu. Das Membranpotential der YidC-Proteoliposomen, welche mit der Bio Beads-Methode hergestellt wurden, war vergleichbar stabil mit denen der Extrudermethode.



**Abb71. Die (Proteo-) Liposomen der Bio Beads-Methode zeigten ein stabiles Membranpotential**

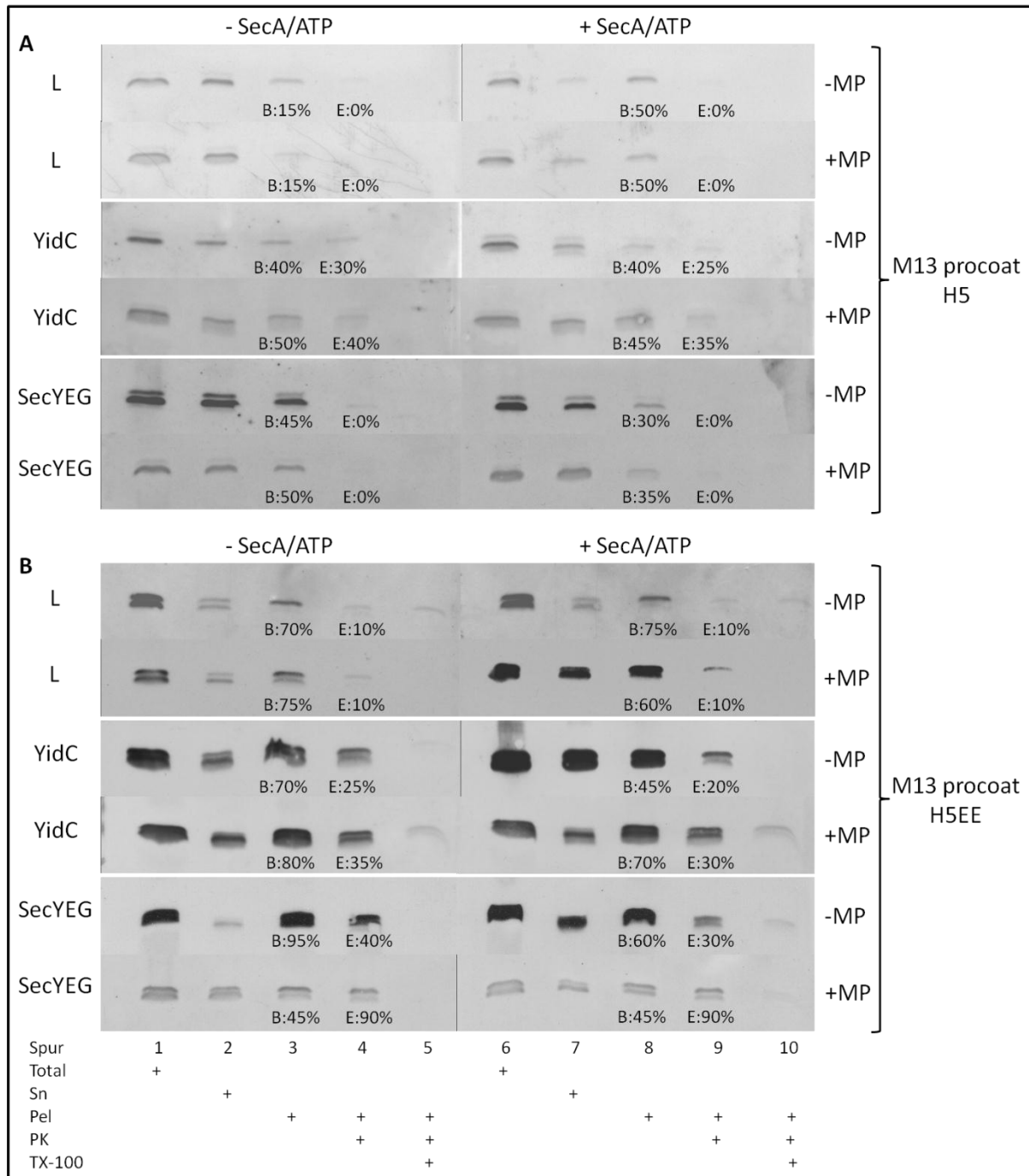
Die Herstellung der LUV erfolgte mithilfe des Extruders in Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0). Anschließend erfolgte die Rekonstitution von YidC (A) bzw. SecYEG (B) mittels der Bio Beads-Methode, die Liposomen (C) wurde mit derselben Methode ohne Zugabe von Protein hergestellt. Die (Proteo-) Liposomen wurden bei 120 000 *g* zentrifugiert und in Puffer K (10 mM HEPES, 100 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0) resuspendiert (Vesikel mit Na<sup>+</sup><sub>in</sub>/K<sup>+</sup><sub>out</sub>). Durch die Zugabe von 0,21 µM Valinomycin wurde ein Membranpotential generiert, welches durch die Zunahme der Fluoreszenz von 0,34 µM Oxonol VI bei 599/634 nm Anregung/Emission für 20 min gemessen wurde.

#### **4.12.2. Translokation von M13 procoat H5 und H5EE, Procoat-Hybridproteinen und proOmpA in Liposomen und Proteoliposomen mit rekonstituiertem YidC bzw. SecYEG**

Die Translokation von Proteinen in und durch die innere Membran von *E. coli* verläuft meist mithilfe eines katalytischen Proteins wie SecYEG und YidC. Um die Abhängigkeit der Procoatproteine und deren Hybridproteine mit proOmpA oder Leaderpeptidase von diesen Transportproteinen zu untersuchen, wurden im Vergleich zu den invertierten Innenmembranvesikeln Experimente mit rekonstituiertem YidC bzw. SecYEG durchgeführt. Das Protein M13 procoat H5EE bindet an die ATPase SecA (Papanikou *et al.*, 2005; Baud *et al.*, 2005). Für die *in vitro*-Translokationsexperimente mit SecYEG wurde die Bindungsrate an die (Proteo-) Liposomen überprüft. Hierfür wurden Liposomen und YidC-Proteoliposomen aus *E. coli* Gesamtextraktlipiden mit 3% DAG mithilfe der Extrudertechnik (siehe 3.27.) hergestellt und durch die Zugabe von 0,25  $\mu\text{M}$  Valinomycin ein elektrochemisches Membranpotential aufgebaut. Die Translokationsansätze wurden nach der Zugabe von 1  $\mu\text{g}$  M13 procoat H5 bzw. H5EE bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Translokation fand nach der Zentrifugation und anschließender Aufnahme in Puffer K (10 mM HEPES, 100 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , pH 8.0) ohne oder mit der Zugabe von ATP und äquimolarem Verhältnis von SecA zum eingesetzten Substrat statt. Die Banden wurden quantifiziert, indem die Intensitäten von Überstand (Spur 2) und Pellet (Spur 3) addiert und davon die prozentuale Bindungsrate (B) in Spur 3 bestimmt wurde. Die Einbaurrate (E) in Spur 4 bezieht sich auf die Menge an gebundenem Protein in Spur 3 (entspricht 100%).

Das Protein M13 procoat H5 wurde in die Liposomen des *E. coli* Gesamtextraktes mit 3% DAG unabhängig von der Zugabe von SecA und ATP nicht eingebaut (siehe Abb72 A, L). Die Bindungsrate (Spuren 3) des Proteins an die Liposomen erfolgte ohne SecA und ATP zu 15% und mit zu 50%. Zu einem Einbau (Spuren 4) in die Liposomenmembran kam es jedoch nicht. Wurden die YidC-Proteoliposomen (siehe YidC) auf Einbau abhängig von SecA und ATP analysiert, zeigte sich keine deutliche Beeinflussung der Translokationsrate. An die YidC-Proteoliposomen wurde ca. die Hälfte der eingesetzten Proteinmenge unabhängig von SecA und ATP gebunden (Spuren 3), beide Male waren ca. 40% ohne bzw. mit SecA 35% des gebundenen Proteins vor dem Proteaseverdau geschützt (Spuren 4). Dies deutete darauf hin, dass das Protein nicht von SecA gebunden wurde. Das Vorhandensein eines Membranpotentials verbesserte die Insertionseffizienz leicht. In SecYEG-Proteoliposomen (siehe SecYEG) wurde H5 (Stiegler *et al.*, 2011), wie zu erwarten, nicht inseriert (Spuren 4). Dies stimmt mit den *in vivo*-Experimenten überein, welche besagen, dass H5 Sec-unabhängig transloziert wird (Roos *et al.*, 2001).

## Ergebnisse



**Abb72. Translokation von M13 procoat H5 und H5EE in Liposomen, YidC- bzw. SecYEG-Proteoliposomen mit und ohne SecA/ATP bzw. Membranpotential**

Die Herstellung der großen unilamellaren Vesikel (*E. coli* Gesamtextrakt 3% DAG) erfolgte mithilfe des Extruders in Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0), die Proteoliposomen wurde mithilfe der Bio Beads-Methode mit gereinigtem YidC- bzw. SecYEG-Protein hergestellt, die Liposomen wurden analog ohne die Zugabe von Protein hergestellt. Die (Proteo-) Liposomen wurden zentrifugiert und entweder in Puffer K (10 mM HEPES, 100 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0) (+MP) oder in Puffer N (-MP) resuspendiert. Die Translokation der gereinigten Substrate erfolgte für 30 min bei 37°C (+MP: unter Zugabe von 0,25 µM Valinomycin), gereinigtem SecA-Protein und ATP. Die Proben wurden anschließend in der Airfuge sedimentiert und in Überstand (Sn) und Pellet (Pel) aufgeteilt, die Bindungsrate (B) an die Vesikel wurde analysiert. Die Einbaurate (E) in die Lipidvesikel wurde durch die Zugabe von Proteinase K in Ab- und Anwesenheit (PK +) von Detergenz überprüft. Die Proben wurden mit 15% TCA gefällt, über ein Tricin-SDS-PAG aufgetrennt und durch eine anschließende Immunfärbung mithilfe des M13-Antikörpers visualisiert.

## Ergebnisse

Das Protein M13 procoat H5EE zeigte eine Bindung an SecA (siehe Abb72 **B**), wodurch die Translokationseffizienz sowohl in Liposomen als auch YidC-Proteoliposomen leicht beeinflusst wurde. Die Translokationseffizienz in Liposomen betrug unter 10% des gebundenen Proteins (Spuren 4) unabhängig vom Vorhandensein von SecA und ATP oder einem Membranpotential. Die Zugabe von SecA hatte auf die Bindung (Spuren 3) an die YidC-Proteoliposomen (siehe YidC) einen leichten Einfluss, inseriert wurde jeweils ca. 30% (Spuren 4). Dies deutet darauf hin, dass das H5EE von SecA gebunden wurde und somit das Protein an der Membranbindung gehindert wurde. Wurden SecYEG-Proteoliposomen (siehe SecYEG) analysiert (Stiegler *et al.*, 2011), so konnte gezeigt werden, dass H5EE mit der Hilfe des Membranpotentials mit 90% effizient in diese eingebaut wurde (Spuren 4). Eine Beeinflussung von SecA an der Bindung (Spuren 3) war hier nicht zu erkennen, da sowohl die Bindungs- als auch die Einbaueffizienz gleich waren mit und ohne SecA. Das Vorhandensein eines Membranpotentials hatte hierbei größeren Einfluss, ohne Membranpotential wurden nur 30%-40% in die SecYEG-Proteoliposomen inseriert. Dies deutet darauf hin, dass die SecYEG-abhängige Translokation des M13 procoat H5EE von SecA unterstützt wurde, während H5 nicht via SecYEG transloziert wurde. Beide Proteine konnten jedoch den „YidC-only“-Weg nutzen.

Die Translokation von proOmpA durch die Cytoplasmamembran von *E. coli* verläuft *in vivo* SecYEG-abhängig und zeigte auch in den *in vitro*-Experimenten diese Abhängigkeit. Das Protein proOmpA konnte somit als Kontrollprotein für die Funktionalität der Translokase SecYEG im rekonstituierten System verwendet werden. Die Bindung (Spuren 3) an Liposomen (siehe Abb73, L) und YidC-Proteoliposomen (siehe YidC) mit Membranpotential lag bei etwa 50%, eine Insertion fand jedoch nicht statt. Die Zugabe von SecA und ATP zu Liposomen und YidC-Proteoliposomen hatte keinen stimulierenden Einfluss auf die Insertionsrate. Wurde die Translokationsrate (Spuren 4) in SecYEG-Proteoliposomen mit SecA und ATP (siehe SecYEG) untersucht (Stiegler *et al.*, 2011), so wurden ca. 20% (+MP) und 25% (-MP) des gebundenen Proteins (B) inseriert. Ohne SecA und ATP kam es zu keinem Einbau, hierbei war kein vor der Proteinase K geschütztes Protein zu detektieren. Dies konnte deutlich machen, dass proOmpA auch in dem *in vitro*-Rekonstitutionssystem ein Substrat von SecA und SecYEG ist und die beiden Proteine nach der Affinitätschromatographie und Rekonstitution funktionell aktiv waren.

## Ergebnisse

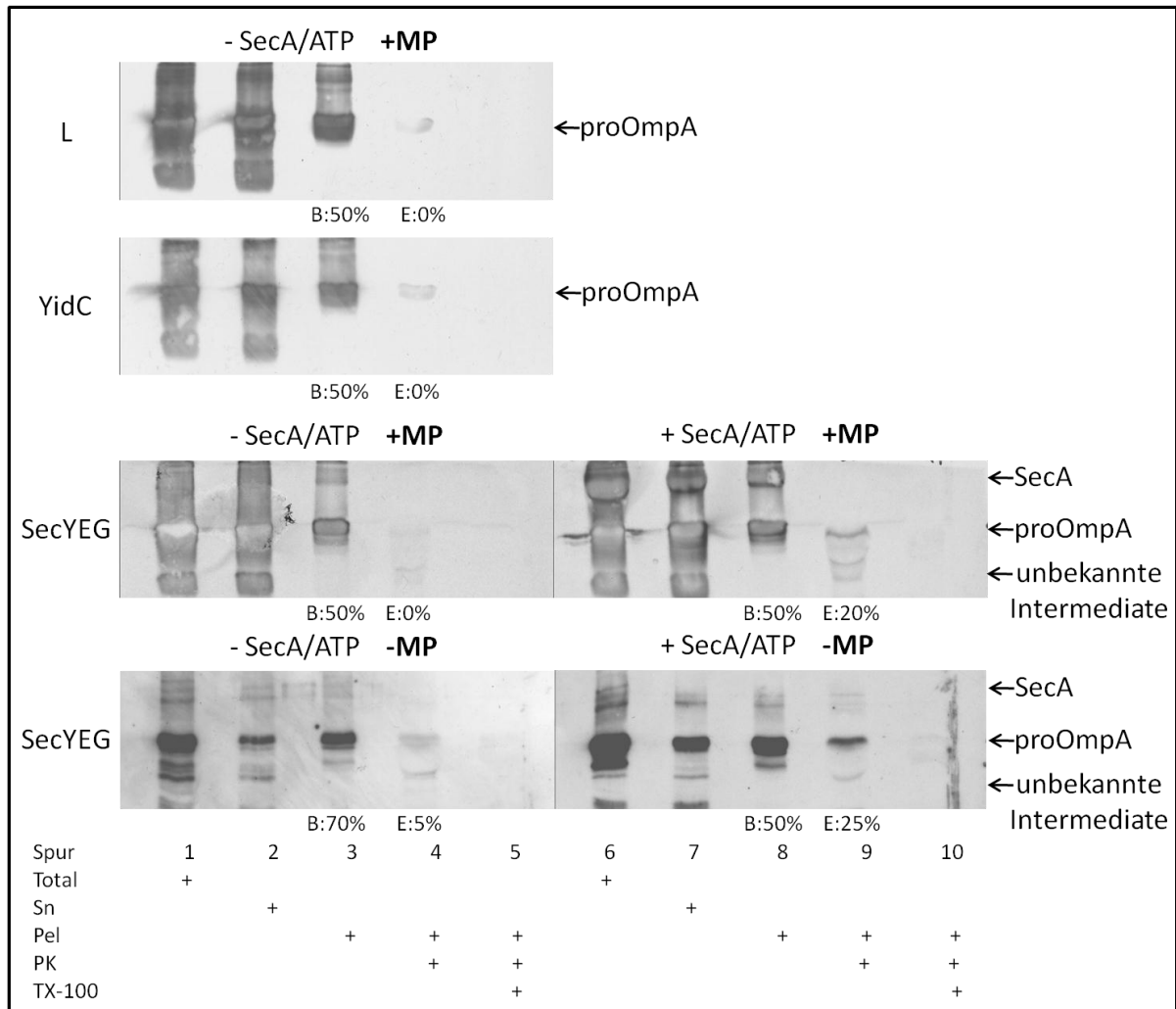


Abb73. **Translokation von proOmpA in Liposomen, YidC- und SecYEG-Proteoliposomen mit und ohne SecA/ATP bzw. Membranpotential**

Die Herstellung der großen unilamellaren Vesikel (*E. coli* Gesamtextrakt 3% DAG) erfolgte mithilfe des Extruders in Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0), die Proteoliposomen wurde mithilfe der Bio Beads-Methode mit gereinigtem YidC- bzw. SecYEG-Protein hergestellt, die Liposomen im analogen Verfahren ohne Zugabe von Protein. Die (Proteo-) Liposomen wurden zentrifugiert und in Puffer N (-MP) bzw. Puffer K (+MP) (10 mM HEPES, 100 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0) resuspendiert. Die Translokation des gereinigten proOmpA erfolgte für 30 min bei 37°C gegebenenfalls unter Zugabe von 0,25 µM Valinomycin (+MP) bzw. gereinigtem SecA-Protein und ATP. Die Proben wurden anschließend in der Airfuge sedimentiert und in Überstand (Sn) und Pellet (Pel) aufgeteilt, die Bindungsrate (B) an die Vesikel wurde analysiert. Die Einbaurate (E) in die Lipidvesikel wurde durch die Zugabe von Proteinase K in Ab- und Anwesenheit (PK +) von Detergenz überprüft. Die Proben wurden mit 15% TCA gefällt, über ein 15%-iges SDS-PAG aufgetrennt und durch eine anschließende Immunfärbung mithilfe des OmpA-Antikörpers visualisiert.

Die Hybridproteine aus M13 procoat H5 und OmpA pro828coat und pro80coat, sowie aus M13 procoat und Lep PClep nahmen im Lipidvesikel eine bestimmte Topologie ein (siehe Abb74). Die OmpA-Hybridproteine wurden nur durch die Sec-Translokase in der Vesikelmembran verankert, wobei der OmpA-Sequenz-tragende periplasmatische Bereich über die Membran ins Innere des Proteoliposoms transloziert wurde. Das Protein PClep konnte durch die Insertase YidC in die Vesikelmembran eingelagert werden und nahm eine Topologie ein, bei der die

## Ergebnisse

Termini im Außenmedium verblieben. In Abb74 sind die Topologien der verwendeten Hybridproteine pro828coat und pro80coat (oben), sowie PClep (unten) dargestellt.

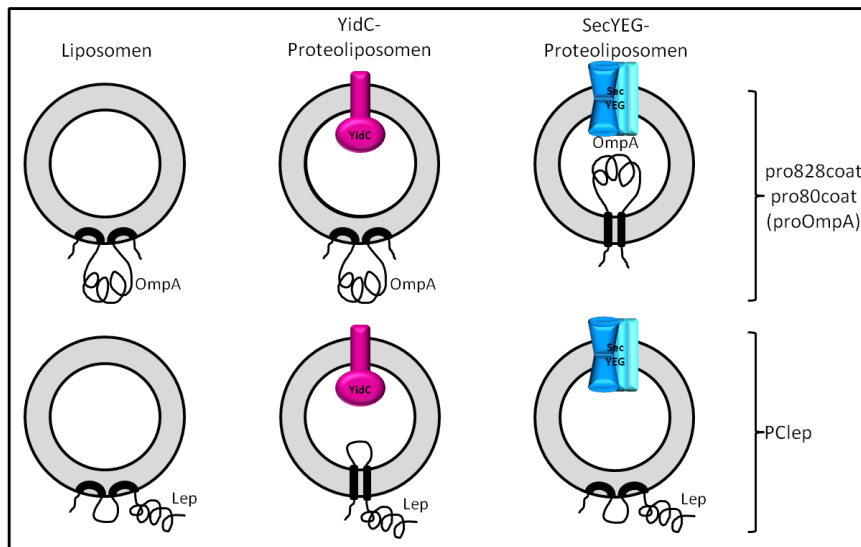


Abb74. **Schematische Darstellung der Topologie der M13-OmpA- und M13-Lep-Hybridproteine in Liposomen und YidC- bzw. SecYEG-Proteoliposomen**

Die Proteine pro828coat und pro80coat inserieren nicht in Liposomen und YidC-Proteoliposomen, in SecYEG-Proteoliposomen hingegen schon (oben). PClep wird nur in YidC-Proteoliposomen eingebaut, nicht aber in Liposomen und SecYEG-Proteoliposomen (unten).

Wurde die Translokationseffizienz der Hybridproteine pro828coat (Stiegler *et al.*, 2011) und pro80coat (siehe Abb75 A bzw. B), sowie PClep (siehe Abb75 C) analysiert, so zeigte sich, dass die Procoat-OmpA-Hybridproteine SecYEG-abhängig transloziert wurden (siehe SecYEG). Auch *in vivo* werden diese Proteine mit der Hilfe der Translokase inseriert (Kuhn, 1988; Roos *et al.*, 2001). Die Proteine pro828coat und pro80coat wurden nur effizient in SecYEG-Proteoliposomen inseriert, wenn SecA vorhanden war. Ein vorhandenes Membranpotential verbesserte die Insertion von pro828coat und pro80coat in die SecYEG-Proteoliposomen nicht. Insertion in Liposomen und YidC-Proteoliposomen fand nicht statt, auch wenn Bindung an die Liposomen (siehe L) und YidC-Proteoliposomen (siehe YidC) stattfand.

Das Hybridprotein PClep, welches C-terminal einen Teil der Aminosäuresequenz der Leaderpeptidase trägt (Kuhn *et al.*, 1986b), wurde weder in Liposomen noch in SecYEG-Proteoliposomen mit Membranpotential eingebaut (siehe Abb75 C, L bzw. SecYEG). *In vivo* wird dieses Protein Sec-unabhängig, jedoch mit der Insertase YidC in der inneren Membran verankert. In YidC-Proteoliposomen (YidC) wurden ca. 10% des sehr ineffizient gebundenen (Spur 3) Proteins PClep inseriert (Spur 4), da nach der Proteinase K-Behandlung ein kleines Fragment von 7 kDa detektierbar war (\*). Dieses Fragment entsprach in etwa der Größe von M13 procoat H5. Hiermit konnte gezeigt werden, dass M13 procoat H5 in der richtigen Orientierung in die YidC-

## Ergebnisse

Proteoliposomen inseriert wurde und der Lep-Teil außen blieb. Da das Protein PClep nur schlecht mit den Antikörpern gegen M13 procoat nachgewiesen und zusätzlich nur in geringer Konzentration (0,5 mg/ml) gereinigt werden konnte, waren keine stärkeren Banden visualisierbar.

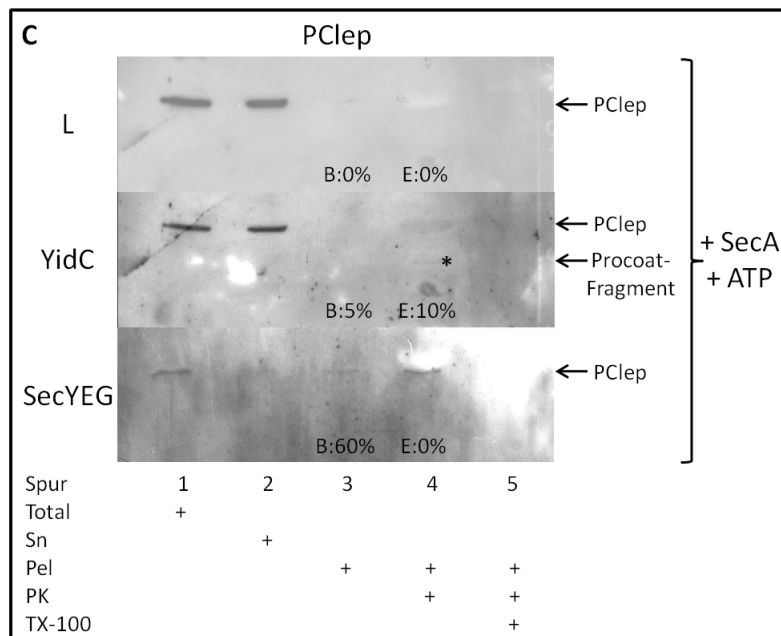
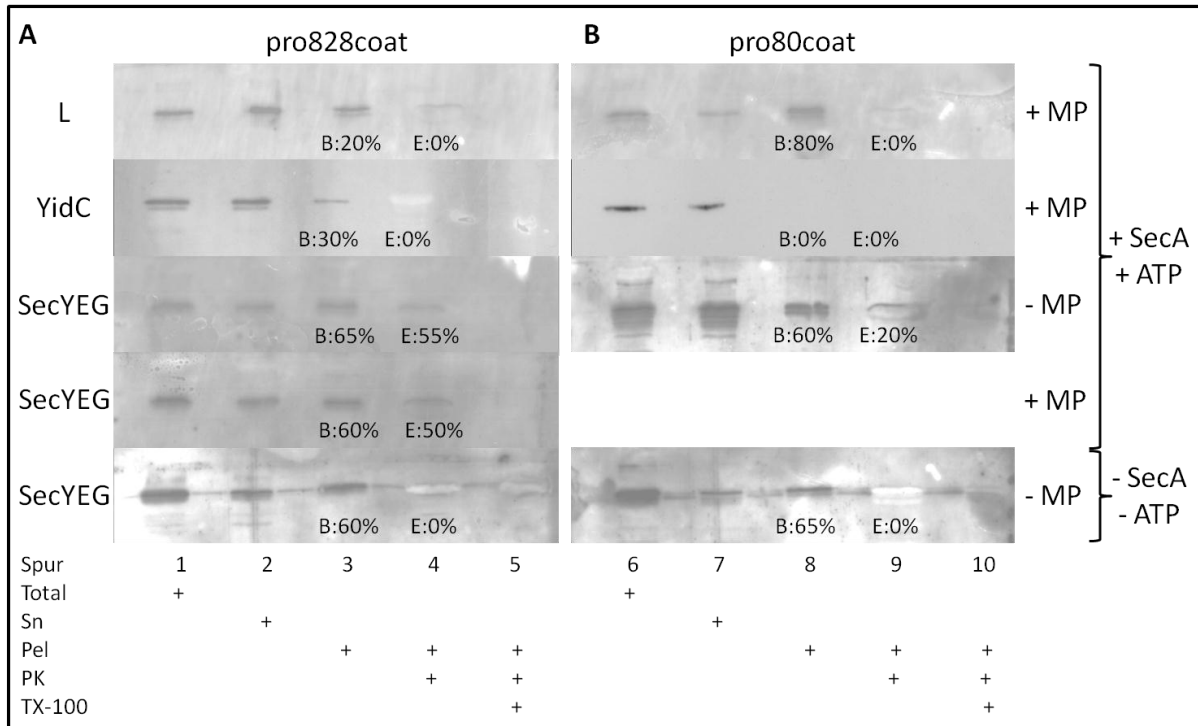


Abb75. **Translokation der M13-OmpA- und M13-Lep-Hybridproteine in Liposomen, YidC- und SecYEG-Proteoliposomen mit und ohne SecA/ATP**

Die Herstellung der großen unilamellaren Vesikel (*E. coli* Gesamtextrakt 3% DAG) erfolgte mithilfe des Extruders in Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0), die Proteoliposomen wurde mithilfe der Bio Beads-Methode mit gereinigtem YidC- bzw. SecYEG-Protein hergestellt, die Liposomen wurden analog hergestellt. Die (Proteo-) Liposomen wurden zentrifugiert und in Puffer K (10 mM HEPES, 100 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0) resuspendiert. Die



## Ergebnisse

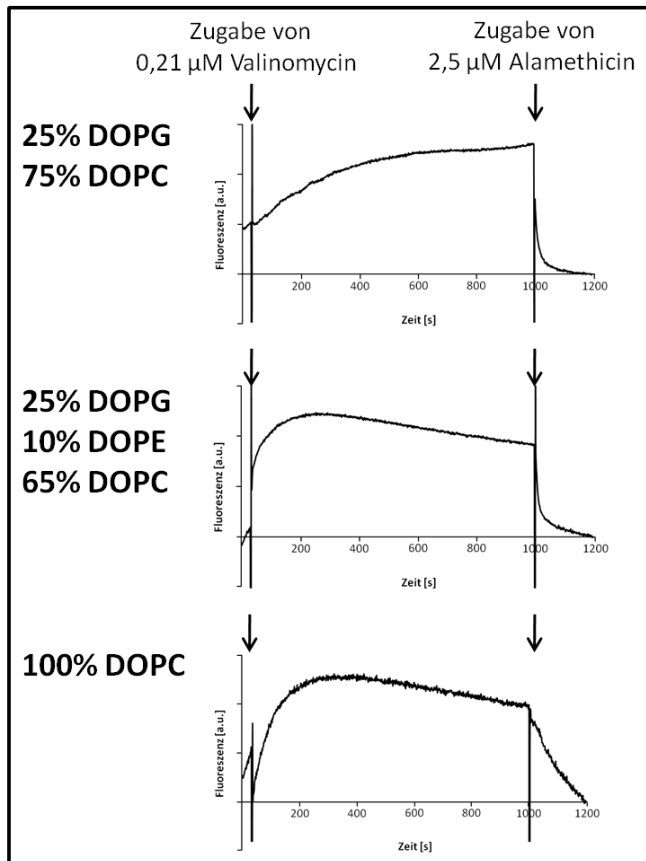
Translokation der gereinigten Substrate erfolgte für 30 min bei 37°C unter Zugabe von 0,25 µM Valinomycin, gereinigtem SecA-Protein und ATP. Die Proben wurden anschließend in der Airfuge sedimentiert und in Überstand (Sn) und Pellet (Pel) aufgeteilt, die Bindungsrate (B) an die Vesikel wurde analysiert. Die Einbaurrate (E) in die Lipidvesikel wurde durch die Zugabe von Proteinase K in Ab- und Anwesenheit (PK +) von Detergenz überprüft. Die Proben von pro828coat (A), pro80coat (B) und PClep (C) wurden mit 15% TCA gefällt, über ein 15% SDS-PAG aufgetrennt und durch eine anschließende Immunfärbung mithilfe des OmpA- (pro828coat und pro80coat) bzw. des M13-Antikörpers AI (PClep) visualisiert. \* markiert das entstandene 7 kDa große Procoat-Fragment von PClep nach dem Verdau der carboxyterminalen Lep-Sequenz.

### **4.13. Translokation von Procoatproteinen in Lipidvesikel aus DOPG, DOPE und DOPC**

Die Phospholipide 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) (DOPG), 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidyl-ethanolamin (DOPE) und 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC) werden auch als semi-synthetische Lipide bezeichnet. Sie bestehen aus einem natürlich gewonnen Glycerinmolekül, welches mit den synthetisch hergestellten Fettsäuren verestert wurde. Da es sich hierbei um Phospholipide handelt, beinhalten diese zusätzlich eine Phosphorylgruppe anstelle eines Acylrestes an der C<sub>3</sub>-Hydroxygruppe des Glycerins.

Die semi-synthetischen Lipidvesikel wurden zunächst auf ihre Stabilität bezüglich des Membranpotentials überprüft (siehe Abb76), um eventuellen Spontaneinbau der Procoatproteine auszuschließen. Zunächst wurden die Liposomen mittels des Extruders in Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0) hergestellt und in der Airfuge sedimentiert. Die Vesikel wurden dann in Puffer K (10 mM HEPES, 100 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0) resuspendiert und mit 0,21 µM Valinomycin versetzt. Das sich generierende Membranpotential kann mithilfe von 0,34 µM Oxonol VI photometrisch bei einer Anregung mit 599 nm und einer Emission von 634 nm gemessen werden (Venema *et al.*, 1993; Apell & Bersch, 1987). Die energetisierten Liposomen wurden in die Küvette pipettiert und das Potential für 20 min aufgenommen. Zur Kontrolle des Transmembranpotentials wurden nach 1 000 s 2,5 µM Alamethicin in die Küvette gegeben, um das generierte Membranpotential zu zerstören. Das Alamethicin bildet eine Pore, durch welche Ionen passieren können. Dies führte zu einem Ladungsausgleich zwischen innen und außen, wodurch die Fluoreszenz von Oxonol VI gequencht wurde.

## Ergebnisse

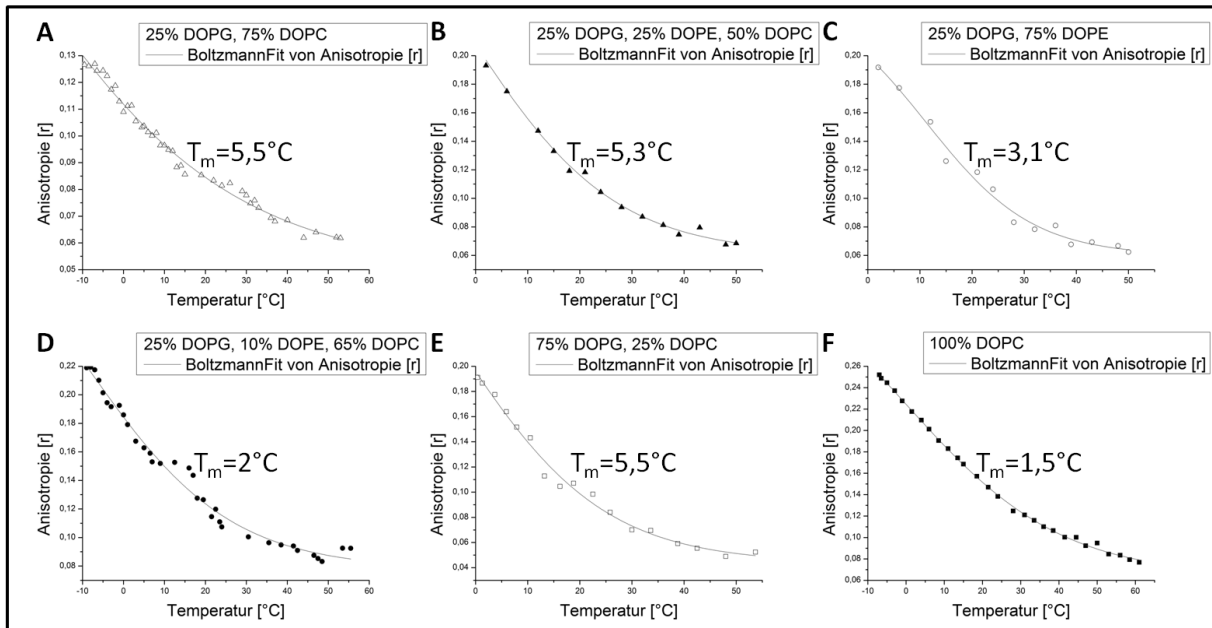


### Abb76. Das Membranpotential der Liposomen aus semi-synthetischen Lipiden

Die Herstellung der Liposomen erfolgte mithilfe des Extruders in Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0). Nach der Zentrifugation bei 120 000 *g* wurden die Vesikel in Puffer K (10 mM HEPES, 100 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0) resuspendiert (Liposomen mit Na<sup>+</sup><sub>in</sub>/K<sup>+</sup><sub>out</sub>). Durch die Zugabe von 0,21 µM Valinomycin konnte ein Membranpotential generiert werden, wodurch es zu einer Zunahme der Fluoreszenz von 0,34 µM Oxonol VI bei 599/634 nm Anregung/Emission kam. Nach 1 000 s wurden jeweils 2,5 µM Alamethicin zugegeben, was zum Zerstören des Potentials führte.

Die Anisotropie der semi-synthetischen Lipide wurde im Temperaturbereich von -10°C bis 55°C gemessen (siehe Abb77). Die Liposomen wurden mit dem Extruder in Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0) hergestellt. Die Messung fand in Puffer N mit 5 M Glycerin statt. Die Anisotropie wurde durch den Farbstoff 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH) messbar. Die Phasenumwandlungstemperatur ( $T_m$ ) der semi-synthetischen Lipide wurde graphisch mittels Boltzmann-Fitting ermittelt. Die Transitionstemperaturen waren mit 1,5°C bis 5,5°C im Vergleich zu den bakteriellen Lipiden deutlich niedriger.

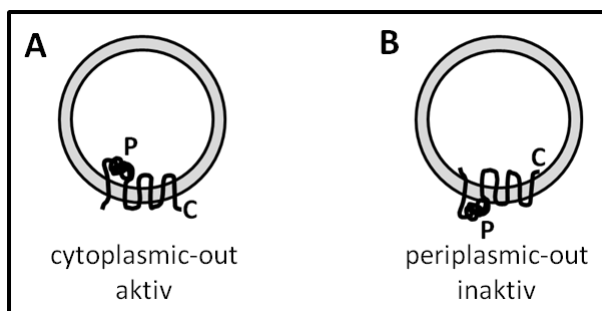
## Ergebnisse



### Abb77. Anisotropie der semi-synthetischen Lipidmembran

Die Herstellung der Liposomen erfolgte mithilfe des Extruders in Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0). Die Messung der Phasenumwandlungstemperatur ( $T_m$ ) wurde mithilfe des Farbstoffs DPH und des Fluorolog-spektrometers durchgeführt.

Die Topologie von YidC wurde von der Lipidzusammensetzung der Membranvesikel beeinflusst. Das in Vesikel rekonstituierte YidC kann in zwei möglichen Orientierungen vorkommen (siehe Abb78), dabei muss beachtet werden, dass die Vesikel im Vergleich zur Zelle eine invertierte Topologie aufweisen. Bei einem Liposom sollte sich die cytoplasmatische Seite außen befinden und die periplasmatische im Lumen liegen. Die cytoplasmic-out-Orientierung von YidC entspricht somit der aktiven Orientierung in *E. coli*, während die periplasmic-out der umgekehrten, weniger aktiven Topologie entspricht. Wurde die Konzentration an DOPG, DOPE und DOPC variiert, so konnte das YidC-Protein beide Orientierungen im Vesikel einnehmen (Stiegler, 2004).



### Abb78. Mögliche Topologien von YidC im Lipidvesikel

In **A** ist die cytoplasmic-out-Orientierung mit den Termini nach außen dargestellt, welche der aktiven Orientierung in *E. coli* entspricht. Die periplasmic-out-Orientierung (**B**) stellt die invertierte und somit inaktivere Topologie dar. Die Vesikel weisen eine umgekehrte Orientierung auf, weshalb sich der simulierte periplasmatische Bereich im Vesikellumen und das Cytoplasma im Außenmedium befinden.

## Ergebnisse

In *E. coli*-Lipide wird das Protein YidC bevorzugt in der cytoplasmic-out-Orientierung rekonstituiert, welche der aktiven Topologie von YidC entspricht (Serek *et al.*, 2004). Liposomen die zu 100% aus DOPC bestehen, bauen das YidC mit einer Wahrscheinlichkeit von ca. 80% in der cytoplasmic-out-Orientierung ein, während es in Vesikeln aus 75% DOPE, 25% DOPG in dieser Orientierung zu mindestens 40% detektierbar ist (Winterfeld *et al.*, 2009).

Lipidzusammensetzung	cytoplasmic-out	periplasmic-out
25% DOPG, 75% DOPC	80%	20%
25% DOPG, 25% DOPE, 50% DOPC	90%	10%
25% DOPG, 75% DOPE	20%	80%
75% DOPG, 25% DOPC	80%	20%
100% DOPC	75%	25%

**Tab.10 Orientierung von rekonstituiertem YidC in Lipidvesikel unterschiedlicher Lipidzusammensetzung (Stiegler,2004)**

Die verwendeten Lipidbestandteile sind DOPG (1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-*rac*-(1-glycerol)]), DOPE (1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidyl-ethanolamin) und DOPC (1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin). Die Ergebnisse beruhen auf der Diplomarbeit Stiegler, 2004.

Bei einer niedrigen Konzentration an DOPE und höheren an DOPC oder DOPG wurde YidC bevorzugt in der cytoplasmic-out-Orientierung rekonstituiert (siehe Tab.10), was der aktiven Orientierung entspricht (Stiegler, 2004). Wurde die DOPE-Konzentration hingegen deutlich erhöht, so veränderte sich das Insertionsverhalten bis hin zum beinahe vollständigen Einbau in der periplasmic-out-Orientierung. Proteoliposomen mit der Lipidzusammensetzung 25% DOPG und 75% DOPC, sowie solche aus 25% DOPG, 25% DOPE und 50% DOPC wiesen zu 80% bzw. 90% eine cytoplasmic-out-Orientierung auf. Bestand sie hingegen aus 25% DOPG und 75% DOPE, so wiesen die Proteoliposomen zu 80% eine invertierte Orientierung (periplasmic-out) auf. Wurde die Konzentration von DOPG variiert, so dass die Lipidvesikel aus 75% DOPG und 25% DOPC bestanden, wurde YidC erneut zu ca. 80% in der aktiven Orientierung (cytoplasmic-out) rekonstituiert. In Membranvesikeln aus 100% DOPC wies YidC zu 75% die aktive Topologie auf und zu 25% die periplasmic-out-Orientierung.

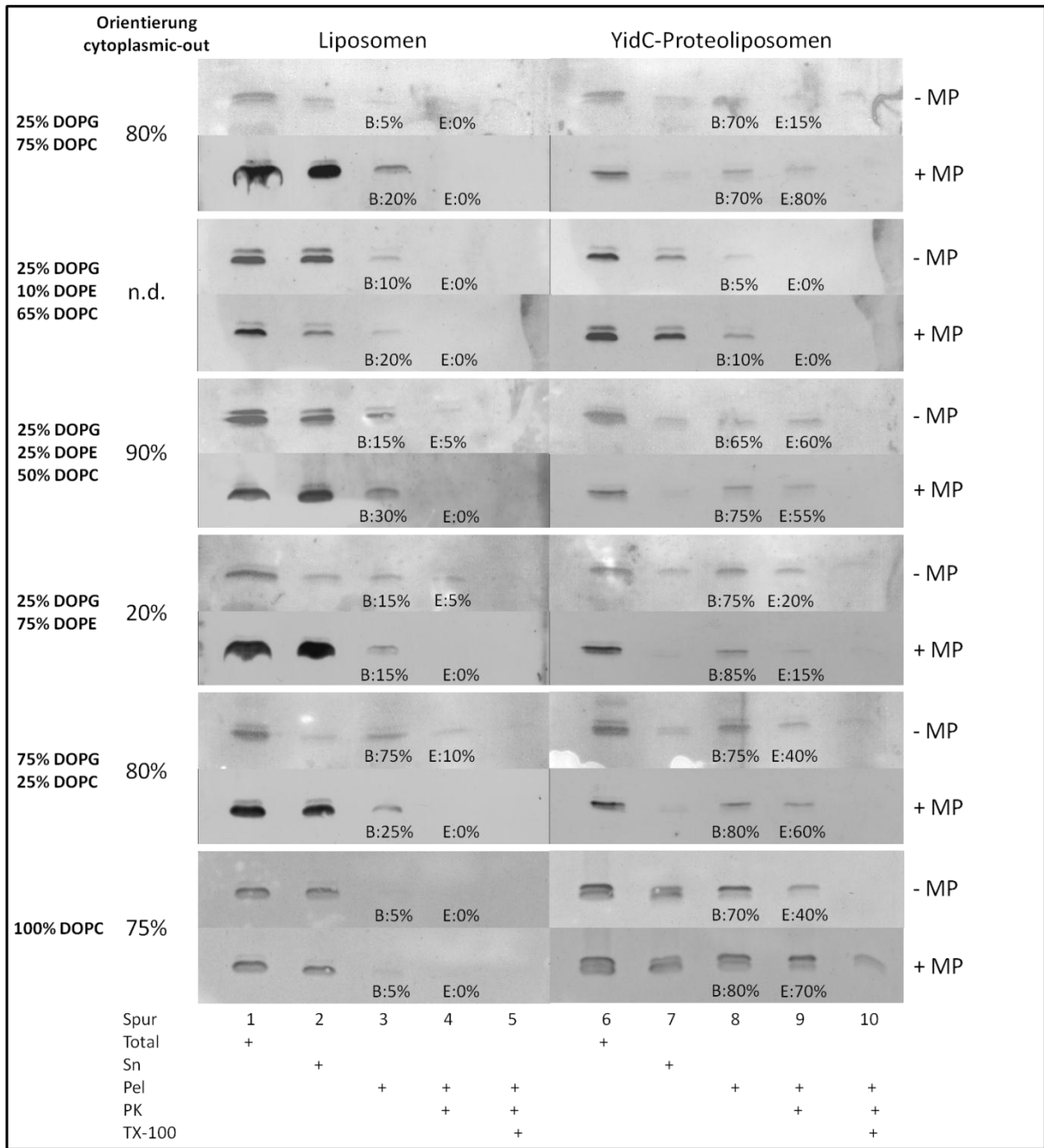
Die (Proteo-) Liposomen wurden mit der Extrudertechnik in Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0) hergestellt (siehe 3.27.). Anschließend wurden die Vesikel für 10 min bei 120 000 *g* pelletiert, in Puffer K (10 mM HEPES, 100 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0) resuspendiert und durch die Zugabe von 0,25 µM Valinomycin ein elektrochemisches Membranpotential aufgebaut. Nach der Zugabe von jeweils 1 µg gereinigtem M13 procoat H5 wurde die Translokation bei 37°C für 30

## Ergebnisse

min durchgeführt. Die Proben (siehe Abb79) in den Spuren 2-5 und 7-10 wurden in der Airfuge bei 120 000 *g* sedimentiert und in Überstand (Sn) und Pellet (Pel) unterteilt. Die Proben 4, 5, 9 und 10 wurden mit 0,3 mg/ml Proteinase K behandelt, um die Effizienz der Insertion zu bestimmen. Zur Kontrolle der Proteaseaktivität wurden die Proben 5 und 10 zusätzlich mit Triton X-100 versetzt, so dass die Membranen solubilisiert und die inserierten Proteine zugänglich für die Proteinase K wurden.

Die Liposomen (siehe Abb79) der verschiedenen Lipidkompositionen aus DOPG, DOPE und DOPC ließen keine Spontaninsertion von M13 procoat H5 zu. Die Bindung an die Liposomen wurde durch ein Membranpotential verbessert, sowie durch das negativ geladene Lipidmolekül DOPG. Somit fand keine effiziente Bindung an Liposomen statt, welche kein DOPG enthielten (100% DOPC), wohl aufgrund der fehlenden Ladung der Membran. In die YidC-Proteoliposomen aus 25% DOPG und 75% DOPC wurde das Protein H5 effizient nur mit Membranpotential eingebaut. Die Proteoliposomen aus 25% DOPG, 10% DOPE und 65% DOPC hingegen ließen keine Insertion von M13 procoat H5 zu. Möglicherweise könnte bei dieser Lipidzusammensetzung YidC in der invertierten (periplasmic-out) Orientierung vorliegen und somit den Translokationsvorgang nicht katalysieren. Die Proteoliposomen aus 25% DOPG, 25% DOPE und 50% DOPC zeigten eine effiziente Bindung (Spuren 3), inseriert wurde ca. die Hälfte des gebundenen Proteins (Spuren 4). Erstaunlicherweise zeigten diese YidC-Proteoliposomen eine reduzierte Translokationskompetenz, obwohl diese Lipidkomposition YidC zu 90% in der aktiven Orientierung rekonstituierte. Untersuchte man die Bindungsrate (Spuren 3) an die Proteoliposomen mit 25% DOPG und 75% DOPE, welche vor allem eine invertierte YidC-Topologie aufwiesen, so lag die Bindungsrate mit YidC zwar bei etwa 80%, die Einbaurrate hingegen nur bei 15%. In diese Proteoliposomen ohne Membranpotential wurden nur 20% des gebundenen Procoatproteins eingebaut, wobei die Bindungsrate bei 75% lag. Die Orientierung der Insertase hatte folglich einen großen Effekt auf die katalytische Aktivität und die Translokationseffizienz. Es scheint zwar eine kleine Anzahl an richtig orientiertem YidC (cytoplasmic-out) zu genügen, um M13 procoat zu translozieren, die katalytische Aktivität ist jedoch nur in der cytoplasmic-out-Orientierung vollständig vorhanden. Die YidC-Proteoliposomen mit 75% DOPG und 25% DOPC konnten H5 zu 80% (+MP) bzw. 75% (-MP) binden, inseriert wurde das Protein aber nur zu 60% in Proteoliposomen mit Membranpotential, während ohne Potential ca. 40% des gebundenen Proteins auch eingebaut wurden. Die YidC-Proteoliposomen aus 100% DOPC zeigten eine Bindungsrate von ca. 70-80%. Eingebaut wurden in die Proteoliposomen ca. 70% (+MP) bzw. 40% (-MP). Die etwas schlechte Bindungsrate an die 100% DOPC-Proteoliposomen könnte auf die fehlende Ladung der Lipide zurückzuführen sein, da die elektrostatische Bindung des M13 procoat H5 an Phosphocholin nicht möglich war und eine Bindung nur von YidC bewerkstelligt werden konnte.

## Ergebnisse



**Abb79. Translokation von M13 procoat H5 in Liposomen und YidC-Proteoliposomen mit unterschiedlichen Lipidzusammensetzungen**

Die Translokationsrate von M13 procoat H5 in Liposomen und YidC-Proteoliposomen mit unterschiedlichen Lipidkompositionen wurde mit (+MP) und ohne Membranpotential (-MP) überprüft. Die Herstellung der Lipidvesikel erfolgte mithilfe der Extrudermethode. Die Translokation des gereinigten Proteins M13 procoat H5 in Liposomen und YidC-Proteoliposomen mit (+MP) und ohne (-MP) Membranpotential wurde für 30 min bei 37°C durchgeführt. Die Proben wurden sedimentiert und in Überstand (Sn) und Pellet (Pel) aufgeteilt, die Bindungsrate (B) an die Vesikel wurde analysiert. Die Einbaurate (E) in die Lipidvesikel wurde durch die Zugabe von Proteinase K in Ab- und Anwesenheit (PK +) von Detergenz überprüft. Die Proben wurden mit 15% TCA gefällt, über ein Tricin-SDS-PAG aufgetrennt und durch eine anschließende Immunfärbung mithilfe des M13-Antikörpers visualisiert.

## 4.14. Spektroskopische Messmethoden mit fluoreszenzmarkierten Procoatproteinen

Die für die Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Atto520-maleimid verwendeten Proteine Procoat H5-M13C und Procoat H5EE-M13C sind in Abb80 dargestellt. Die beiden Proteine tragen einen Austausch an der Position +13 von Serin gegen Cystein, wodurch die Markierung mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Atto520-maleimid möglich wurde. Beide Proteine tragen zusätzlich einen Austausch der Aminosäure Serin gegen Phenylalanin an der Erkennungsregion der Leaderpeptidase (Position -3), um die Effizienz der Prozessierung herabzusetzen, sowie einen sechsfachen His-tag. Das Protein Procoat H5EE-M13C besitzt zudem eine Insertion von zwei Aminosäureresten Glutamat nach der Position +2, wodurch die Nettoladung des periplasmatischen Loops um zwei negative Ladungen auf -5 geändert wurde. Hierdurch wird die Membranintegration *in vivo* vollständig vom Membranpotential abhängig (Cao *et al.*, 1995).

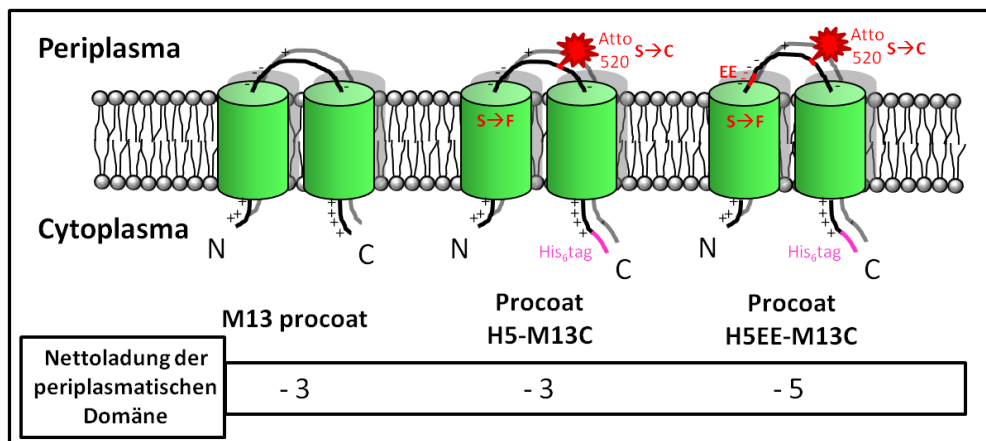


Abb80. **Schematische Darstellung der fluoreszenzmarkierten M13 procoat-Proteine**

Dargestellt sind die molekularen Modifikationen der beiden Procoatproteine H5-M13C und H5EE-M13C im Vergleich zu M13 procoat. Ausgehend vom wildtypischen M13 procoat wurden die Mutanten mit einem sechsfachen His-tag und einer H5-Mutation (Austausch Ser gegen Phe an der Position -3) versehen. Das H5EE-M13C besitzt zudem zwei zusätzliche AS Glutamat nach der Position +2. Zusätzlich wurde bei beiden ein Austausch des Aminosäurerestes Serin gegen Cystein an der Position +13 vorgenommen, um eine Markierung mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Atto520-maleimid zu ermöglichen.

### 4.14.1. Fluoreszenzmarkierung der Procoatproteine

Die gereinigten Proteine Procoat H5-M13C und H5EE-M13C wurden zunächst unter Stickstoffatmosphäre mit TCEP versetzt, um die Disulfide zu reduzieren. Die Markierung mittels des Farbstoffs Atto520-maleimid erfolgte ebenfalls unter Stickstoffatmosphäre für 30 min. Um freie Farbstoffmoleküle zu entfernen, wurde anschließend eine Gelfiltration mit 30 ml Sephadex 200 durchgeführt. Es wurden jeweils 30 Fraktionen zu je 1 ml gesammelt und mittels Tricin-SDS-PAGE analysiert (siehe Abb81 A). Die Aufnahme der fluoreszenzmarkierten Proteine im Tricin-

## Ergebnisse

SDS-Gel erfolgte mit der Hilfe des Typhoon Trio Plus Scanners bei einer Wellenlänge von 532 nm, die Fluoreszenz wurde in einem Bereich von 555 nm 20R6G (Emissionsfilter) detektiert. In den Fraktionen 11 bis 16 wurden bevorzugt größere Proteine von der Säule gewaschen, während das Procoat H5EE-M13C-Protein (mit Atto520-maleimid ca. 9 kDa) in den Fraktionen 17 bis 20 zu finden war. Der Großteil der freien Farbstoffmoleküle, welche jeweils eine Größe von 690 Da besitzen, kam ebenfalls in diesen Fraktionen konzentriert von der Gelfiltrationssäule, weshalb eine weitere Reinigung erforderlich war. Die Fraktion 18 der Gelfiltration wurde einer weiteren Reinigung mittels Ionenmetallaffinitätschromatographie (IMAC) unterzogen, um Proteinaggregate und freien Farbstoff zu entfernen.

Das Binden der Fraktion 18 der Gelfiltration (1 ml) an die mit Puffer A äquilibrierte Säulenmatrix Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose erfolgte im „batch-Verfahren“ für 2 h bei 4°C unter Schütteln. Nach dem Überführen in eine Minisäule wurde der Durchlauf gesammelt (siehe Abb 81 **B**). Das Procoat H5EE-M13C-Protein eluierte im Durchlauf ohne Proteinverunreinigungen von der Säule. Auch im folgenden Elutionsschritt mit Puffer A ohne Imidazol kam reines Procoatprotein von der Säule. In den Elutionen 1 bis 3 mit Puffer A2 (100 mM Imidazol) waren Proteinaggregate zu sehen, welche ebenfalls in der Fraktion 18 der Gelfiltration zu erkennen waren. Um das Protein Procoat H5-M13C zu markieren und anschließend die freien Farbstoffmoleküle zu entfernen, war nach der ersten IMAC eine zweite notwendig, da sich weiterhin Proteinverunreinigungen in den Elutionsfraktionen befanden. Bei allen verwendbaren Elutionfraktionen waren weiterhin freie Farbstoffmoleküle zu sehen, was für die spektroskopischen Messungen aufgrund der starken Fluoreszenz zu einem unerwünschten Hintergrundsignal führte. Die freien Farbstoffmoleküle könnten die Einzelmolekülmessungen stören, weshalb eine weitere Reinigung mittels Gelfiltration mit einer Sephadex G25-Säule erforderlich war.



## Ergebnisse

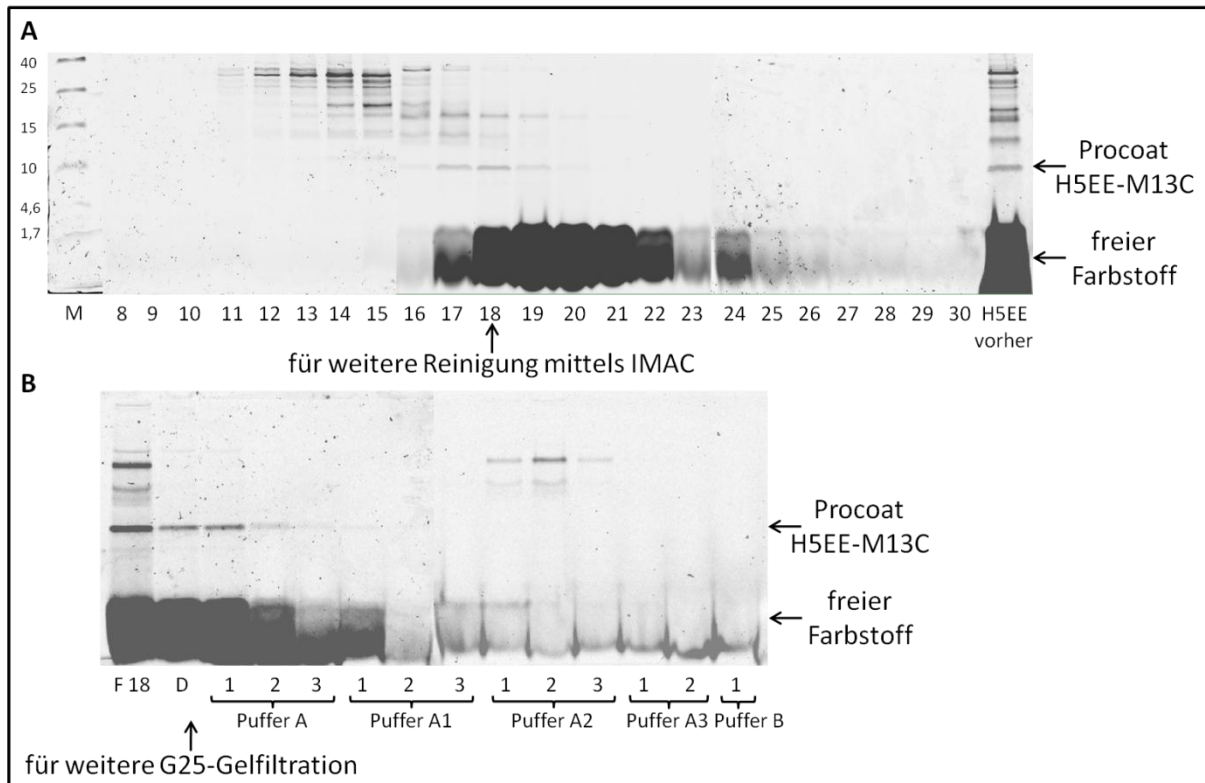


Abb81. **Fractionen der Gelfiltration und anschließenden IMAC von Procoat H5EE-M13C zur Entfernung der freien Farbstoffmoleküle**

Proben der Fractionen der Gelfiltration wurden mittels Tricin-SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend bei 532 nm gescannt, um die mit Atto520-maleimid markierten Procoat H5EE-M13C-Proteine zu visualisieren. Aufgetragen wurde in **A** in Spur 1 5 µl des Markers Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder (gescannt mit Weißlicht), sowie die Fractionen 8-30 der Gelfiltration und das markierte Procoat H5EE-M13C vor der Gelfiltration. In den Fractionen 1-7 waren keine fluoreszierenden Proteinspuren zu sehen, weshalb sie nicht dargestellt sind. Fraction 18 wurde erneut über IMAC gereinigt. In **B** Spur 1 wurde die Fraction 18 der Gelfiltration vor der IMAC, der 1. Durchlauf (D), die Elutionen 1-3 mit Puffer A (0 mM Imidazol), Elutionen 1-3 Puffer A1 (5 mM Imidazol), Elutionen 1-3 Puffer A2 (100 mM Imidazol), Elutionen 1 und 2 Puffer A3 (200 mM Imidazol) und Elution 1 Puffer B (500 mM Imidazol) der anschließenden Reinigung über eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Säule. Die Gelfiltration und anschließende IMAC von Procoat H5-M13C verlief analog, jedoch war eine weitere IMAC aufgrund von restlichen Verunreinigungen notwendig.

Es folgte ein weiterer Reinigungsschritt mittels einer Sephadex G25-Gelfiltrationssäule (siehe 3.37). Hierfür wurden 100 µl der Proteinlösung auf eine 1 ml Sephadex G25-Säule geladen und mit Puffer A\* (0,34 mM Dodecyl-β-D-maltosid, 20 mM Tris/HCl pH 7,9, 500 mM NaCl) eluiert. Der Puffer A\* enthielt das Detergenz Dodecylmaltosid, da das sonst verwendete Lauroylsarcosin für die Messungen im konfokalen Mikroskop aufgrund seiner Eigenfluoreszenz ungeeignet war. Nach der vollständigen Entfernung der freien Farbstoffmoleküle mittels der G25-Gelfiltration, war die Reinheit der Proteinlösungen von Procoat H5EE-M13C, sowie von H5-M13C für die spektroskopischen Messungen ausreichend. Für das Protein Procoat H5-M13C wurde die Protein-enhaltende Fraction der Gelfiltration durch zwei aufeinander folgende Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Säulen weiter gereinigt und die freien Farbstoffmoleküle durch eine abschließende G25-Säule entfernt. Die Konzentrationen lagen für Procoat H5-M13C bei ca. 50 µg/ml und für H5EE-M13C bei ca. 100 µg/ml (je 100 µl).

#### 4.14.2. Translokation der Atto-markierten Procoatproteine in Liposomen und YidC-Proteoliposomen

Liposomen aus 100% DOPC und entsprechende YidC-Proteoliposomen wurden auf ihre Translokationskompetenz überprüft. Hierfür wurden große unilamellare Vesikel mittels der Extrudermethode in Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0) hergestellt (siehe 3.27.). Die Rekonstitution von YidC (siehe 3.28.1.) in die Liposomen erfolgte durch die Zugabe von gereinigtem YidC vor dem Extrudieren (50 µM YidC auf 10,6 mM Lipid). Um (Proteo-) Liposomen mit Membranpotential zu erhalten, wurden diese nach der Zentrifugation in Puffer K (10 mM HEPES, 100 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0) resuspendiert und mit 0,25 µM Valinomycin versetzt. Die Translokation wurde für 30 min bei 37°C durchgeführt. Die Proben wurden bei 120 000 *g* zentrifugiert und die Pellets in Puffer N (-MP) bzw. K (+MP) resuspendiert. Das Membranpotential der 100% DOPC-Liposomen (Na<sup>+</sup><sub>in</sub>/K<sup>+</sup><sub>out</sub>) ist in Abb82 dargestellt. Es wurde durch die Zugabe von 0,21 µM Valinomycin generiert und mithilfe von 0,34 µM Oxonol VI bei 599/634 nm Anregung/Emission für 20 min gemessen.

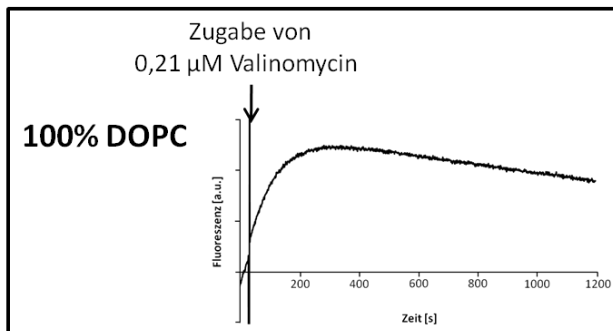


Abb82. **Bestimmung des Membranpotentials durch Oxonol VI-Fluoreszenz der 100% DOPC-Liposomen**

Die Herstellung der Liposomen erfolgte mithilfe des Extruders in Puffer N (10 mM HEPES, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0) und anschließendem Resuspendieren nach der Zentrifugation in Puffer K (10 mM HEPES, 100 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0), somit handelte es sich um Liposomen mit Na<sup>+</sup><sub>in</sub>/K<sup>+</sup><sub>out</sub>. Das Membranpotential wurde durch die Zugabe von 0,21 µM Valinomycin generiert und die Fluoreszenz von 0,34 µM Oxonol VI bei 599/634 nm Anregung/Emission für 20 min aufgenommen.

Das Translokationsverhalten der fluoreszenzmarkierten Proteine Procoat H5-M13C und H5EE-M13C wurde in (Proteo-) Liposomen aus 100% DOPC überprüft. Die Proteinbanden wurden mittels Immunfärbung (siehe Abb83) sichtbar gemacht. Die Banden im Tricin-SDS-Gel wurden quantifiziert, indem die Intensitäten von Überstand (Sn) und Pellet (Pel) addiert und davon die prozentuale Bindungsrate (B) des Pellets bestimmt wurde. Die Einbaurate (E) bezieht sich auf die Gesamtmenge an gebundenem Protein in Spur 3. Die Bindungsrate von Procoat H5-M13C an die Liposomen war unabhängig vom Membranpotential sehr gering (Liposomen, Spuren 3), es war kein Protein geschützt vor der Protease detektierbar (Spuren 4). Wurde die Translokation mit YidC-Proteoliposomen durchgeführt, so lag die Bindungsrate (Spuren 3) ohne Membran-

## Ergebnisse

potential bei 60%, die mit Potential bei 75%. Davon wurde jeweils ca. die Hälfte des gebundenen Proteins in die Membran inseriert (Spuren 4). Um die Translokationskompetenz von Atto-markiertem Procoat H5EE-M13C zu untersuchen, wurde dieses ebenfalls in (Proteo-) Liposomen zu 100% aus DOPC transloziert. Die Bindungsrate (Spuren 3) von H5EE-M13C an 100% DOPC-Liposomen lag bei 25% ohne Potential und bei 30% mit Potential, davon wurden nur ca. 5% (-MP) bzw. 10% (+MP) eingebaut (Spuren 4). An die korrespondierenden YidC-Proteoliposomen lag die Bindungseffizienz (Spuren 3) mit mindestens 60% deutlich höher, wobei ohne Membranpotential 70%, mit Potential 95% inseriert wurden (Spuren 4).

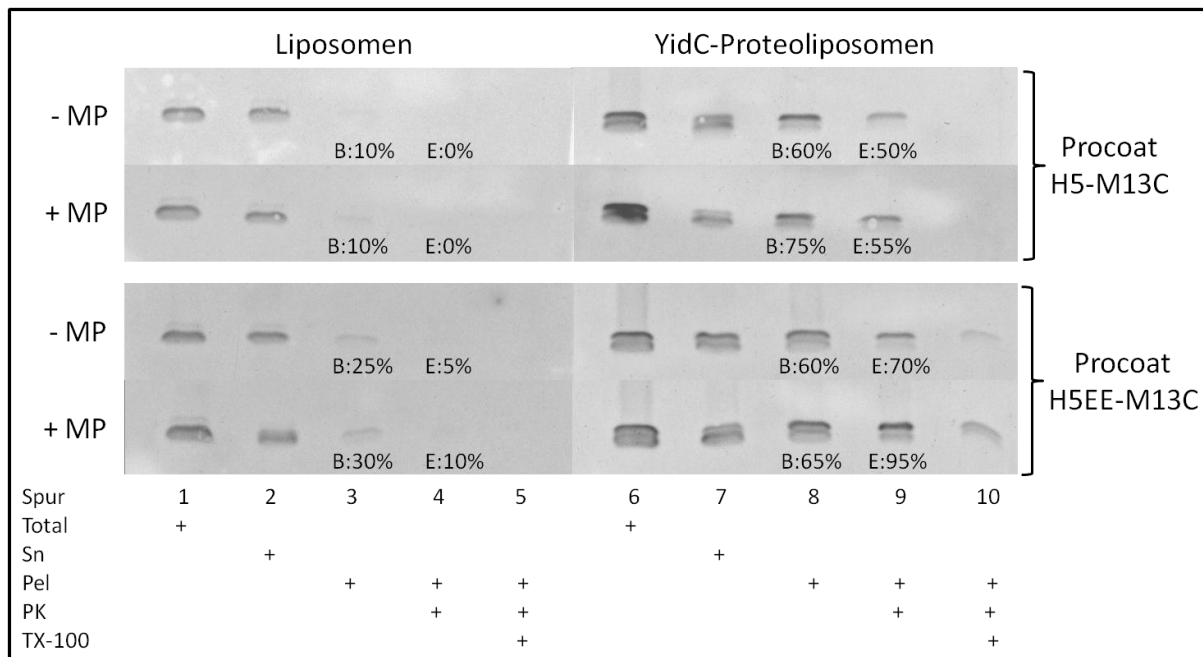


Abb83. **Translokation von Procoat H5-M13C und H5EE-M13C in Liposomen und YidC-Proteoliposomen zu 100% aus DOPC**

Die Translokationsrate von Procoat H5-M13C und H5EE-M13C in Liposomen und YidC-Proteoliposomen mit und ohne Membranpotential wurde untersucht. Die Detektion des Proteins erfolgte durch Immunfärbung mittels des M13 Antikörpers. Die Herstellung der Lipidvesikel erfolgte mithilfe der Extrudermethode. Die Translokation der gereinigten Procoatproteine wurde für 30 min bei 37°C durchgeführt. Die Proben wurden sedimentiert und in Überstand (Sn) und Pellet (Pel) aufgeteilt, die Bindungsrate (B) an die Vesikel wurde analysiert. Die Einbaurrate (E) in die Lipidvesikel wurde durch die Zugabe von Proteinase K in Ab- und Anwesenheit (PK +) von Detergenz überprüft. Die Proben wurden mit 15% TCA gefällt, über ein Tricin-SDS-PAG aufgetrennt und mittels Immunfärbung visualisiert.

### 4.14.3. Stern-Volmer-Plots

Die Konzentration des Quenchers Kaliumiodid (KI) wurde ermittelt, um sicherzustellen, dass die Fluoreszenz der freien mit Atto520-maleimid markierten Procoatproteine ausreichend gelöscht werden konnte. Eine Konzentration von 200 mM KI war ausreichend, um die Fluoreszenzsignale der beiden mit Atto markierten Proteine Procoat H5-M13C (▲ schwarz) und Procoat H5EE-M13C (● rot) zu quenchen (siehe Abb84). Um die einzelnen Raten der beiden Prozesse genauer bestimmen zu können, wurde der Quotient der Intensitäten mit und ohne Quencher in

## Ergebnisse

Abhängigkeit von der Konzentration des Quenchers aufgetragen ( $I_0/I$ ). Das Fluoreszenzsignal von markiertem Procoat H5-M13C wurde mit 200 mM KI zu mindestens 87% gelöscht, das von H5EE-M13C zu mindestens 93%. Hierfür wurde das Untergrundsignal des Puffers ohne Farbstoff von den Fluoreszenzsignalen der markierten Proteine ohne und mit 200 mM KI abgezogen.

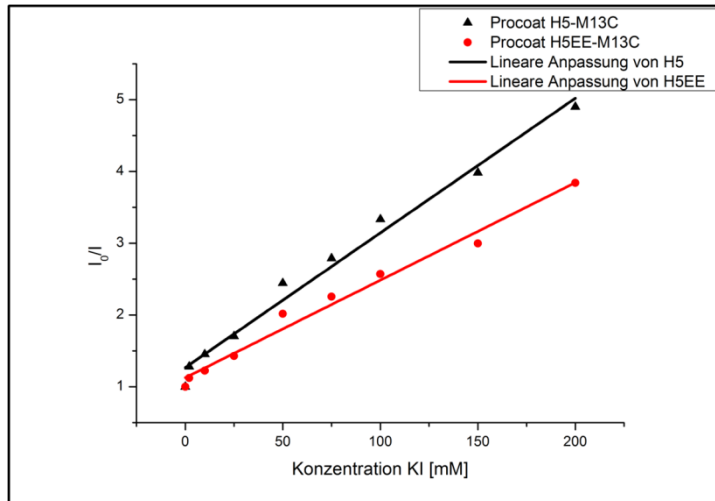


Abb84. **Stern-Volmer-Plot**

Die Ermittlung der Quenchingrate erfolgte mittels Stern-Volmer-Plots. Dabei wurde das Verhältnis von ungequenchtem und gequenchtem Fluoreszenzsignal über verschiedene Konzentrationen an KI aufgetragen. Dabei bezeichnet schwarz ( $\blacktriangle$ ) Atto-markiertes Procoat H5-M13C und rot ( $\bullet$ ) H5EE-M13C. Ein Wert  $I_0/I$  von 2 entsprach hierbei einer Quenchingrate von 50%, ein Wert von 4 bedeutet, dass 75% des Fluoreszenzsignals gequench wurden. Die Konzentration von 200 mM KI war ausreichend, um die Fluoreszenzsignale beider Proteine zu quench.

### 4.14.4. Diffusionszeit von Atto520-markiertem Procoat H5-M13C und H5EE-M13C

Um den Einzelmolekülzustand der Procoatproteine zu überprüfen, wurde die Diffusionskonstante der Proteine Procoat H5-M13C und Procoat H5EE-M13C durch Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) ermittelt. Es wurde die Diffusionszeit  $\tau_D$  des Farbstoffmoleküls Atto520-maleimid alleine, des auf Einzelmolekülniveau verdünnten und markierten M13 procoat-Proteins und abschließend von Liposomen mit gebundenem, markiertem M13 procoat-Protein für 100 s gemessen. Durch die Bindung oder den Einbau von Proteinen nahm der hydrodynamische Radius des fluoreszierenden Partikels zu. Hatte das M13 procoat-Molekül an den Vesikel gebunden oder wurde in diesen eingebaut, so verlängerte sich die Diffusionszeit resultierend aus einem größeren Durchmesser (siehe Abb85). Das Liposom mit markiertem Protein diffundiert länger durch das Fokolvolumen hindurch. Die Diffusionszeit des Farbstoffs Atto520-maleimid alleine betrug 0,343 ms (siehe blaue Kurve). Das mit Atto markierte Protein Procoat H5EE-M13C besaß eine  $\tau_D$  von 1,575 ms (siehe grüne Kurve). Hatte ein Atto-markiertes H5EE-M13C-Protein an ein Proteoliposom gebunden, so benötigte es

## Ergebnisse

hingegen 94,57 ms (siehe rote Kurve), um das Fokalvolumen zu durchqueren. Die Zeit  $\tau_D$  stieg von Atto520 alleine, über mit Atto520 markiertem Protein, zu Vesikeln mit markiertem Protein aufgrund des größeren hydrodynamischen Radius an. Die FCS-Kurven mit Atto520-maleimid alleine und Farbstoff-markiertem Protein wurden mit einer Komponente gefittet. Der letzte Term (Proteoliposomen mit gebundenem Protein) wurde mit einem Zweikomponentenfit ausgewertet, da sowohl ungebundenes als auch gebundenes Protein sichtbar sein könnte. Die ungebundene Komponente von Procoat H5EE-M13C wies wiederum eine Diffusionszeit von ca. 1,6 ms auf, während der gebundene Teil eine  $\tau_D$  von ca. 95 ms hatte. Somit war eine Unterscheidung der verschiedenen Ereignisse eindeutig möglich. Die Berechnung der Autokorrelationsfunktion erfolgte mittels des Burst Analyzer-Programms (siehe 3.43).

Die Daten für das Protein Procoat H5-M13C waren vergleichbar, da die beiden Proteine nahezu gleich groß sind. Aufgrund der vergleichbaren Größe der Proteine, ergaben sich ähnliche Diffusionszeiten, die aus dem hydrodynamischen Radius resultieren. Mithilfe der FCS konnte ermittelt werden, dass ein Protein längere Zeit benötigt, um das Fokalvolumen zu durchqueren, wenn es an ein (Proteo-) Liposom gebunden oder in dieses inseriert hatte, die Diffusionszeit erhöhte sich hierbei. Aus der Diffusionszeit kann wiederum der hydrodynamische Radius berechnet werden. Hierbei wird von einer runden Struktur ausgegangen. Diese Methode vermag jedoch nicht zu unterscheiden, ob das Protein nur gebunden oder in den Bilayer eingebaut wurde.

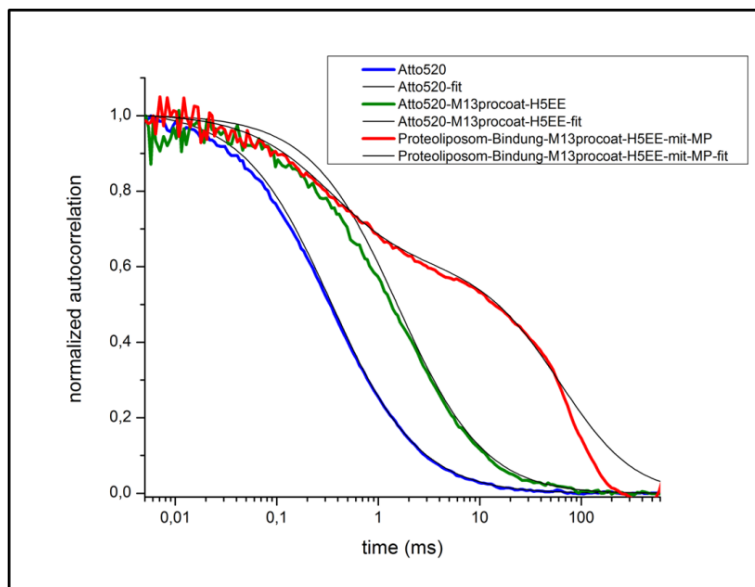


Abb85. **Diffusionszeiten von Atto520-maleimid, des Atto-markierten Procoatproteins H5EE-M13C und des an ein YidC-Proteoliposom gebundenen H5EE-M13C-Proteins**

Die Ermittlung der Diffusionszeiten  $\tau_D$  erfolgte mittels Zweikomponentenfits. Die Diffusionszeit eines Atto520-Moleküls betrug 0,343 ms (blau), die des markierten Proteins H5EE-M13C 1,575 ms (grün) und eines an ein Vesikel gebundenen Proteins 94,57 ms (rot).

#### 4.14.5. Einzelmoleküldetektion zur Untersuchung von Bindung und Einbau von fluoreszenzmarkierten Procoatproteinen in Lipidvesikel

Einzel-molekülmessungen mithilfe des konfokalen Mikroskops ermöglichen die Untersuchung von Bindung und Einbau der mit Atto520-maleimid markierten Proteine Procoat H5-M13C und H5EE-M13C in Liposomen und YidC-Proteoliposomen. Die Procoatproteine können unterschiedliche Positionen in und an dem Vesikel einnehmen, welche mithilfe der Analyse von Photonenbursts unterschieden werden können. In Abb86 sind die möglichen Positionen der fluoreszenzmarkierten Procoatproteine H5-M13C und H5EE-M13C bei Bindung und Einbau dargestellt. Das markierte (🌸) Procoatprotein kann an die Oberfläche des YidC-Proteoliposoms binden. Gebunden an die Oberfläche des Proteoliposoms ist es für den Quencher Kaliumiodid (KI) zugänglich, wodurch das Fluoreszenzsignal gequencht wird. Wird das Procoatprotein in das Proteoliposom eingebaut, so ist der Farbstoff Atto520-maleimid für KI unzugänglich und die Fluoreszenz kann nicht gequencht werden.

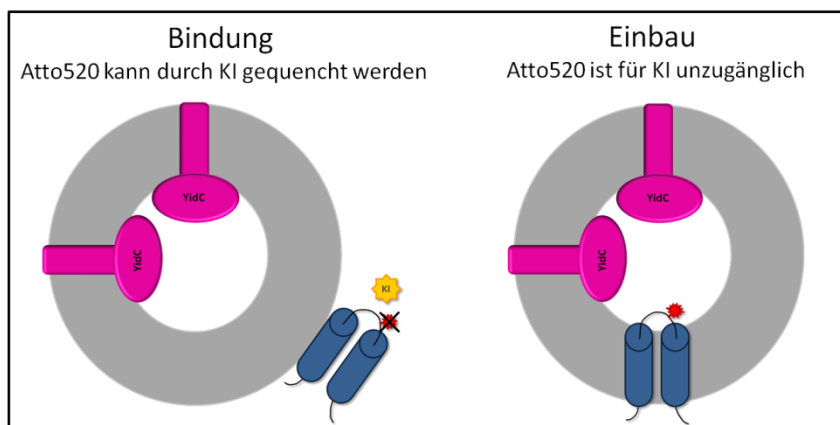


Abb86. Unterscheidung von Bindung und Einbau von mit Atto520-maleimid markiertem M13 procoat durch Fluoreszenzquenching mit Kaliumiodid

Die Detektion der Bindung der mit Atto520-maleimid markierten Procoat H5-M13C oder H5EE-M13C-Proteine erfolgte durch die Zugabe von 200 mM KI. Nur im Vesikel inseriertes Protein ist für den Quencher KI unzugänglich und als Photonenburst sichtbar.

Die frei diffundierenden, mit Atto520-markierten Proteine erschienen im Programm „Burst Analyzer“ als zeitlich sehr kurze Photonenbursts (siehe Abb87 A und B), wenn sie das Fokallvolumen des Mikroskops aufgrund ihrer kürzeren Diffusionszeit (ca. 1,6 ms) durchquerten (siehe Abb85). Das Fluoreszenzsignal des Proteins alleine wurde durch die Zugabe von Kaliumiodid gequencht, wodurch keine Bursts bis 50 kcounts mehr detektierbar waren. Wurde das Protein jedoch vom Vesikel gebunden oder in diesen inseriert, so erschien ein zeitlich längerer Photonenburst (siehe Abb87 C und D). Durch das Binden oder Inserieren des Proteins

## Ergebnisse

nahm der hydrodynamische Radius zu ( $\tau_D$  ca. 95 ms) und das gesamte (Proteo-) Liposom wurde detektierbar (C). Zur Detektion von tatsächlich eingebautem Protein wurde der Quencher Kaliumiodid (KI) zugegeben, welcher die Fluoreszenz aller zugänglichen Atto520-maleimid-Moleküle löscht. Nur Proteine, welche in die Membran inseriert wurden und sich der Farbstoff somit geschützt im Inneren des Vesikels befand, sollten weiterhin Fluoreszenz aufweisen und Photonenbursts bilden (D).

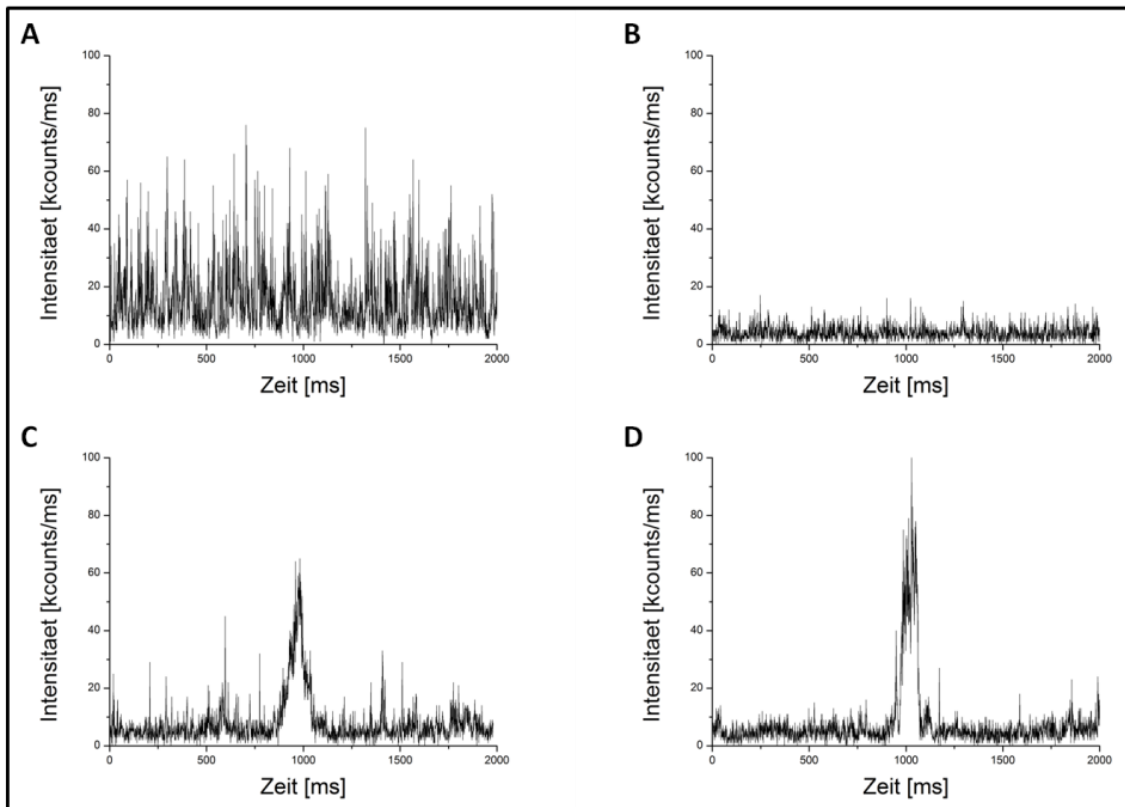


Abb87. **Konfokale Fluoreszenzdetektion von frei diffundierendem und in die Membran inseriertem M13 procoat-Protein**

Detektion der frei durch das Fokolvolumen des Mikroskops diffundierenden mit Atto520-maleimid-markierten Procoat H5-M13C-Moleküle (A). Das Fluoreszenzsignal der markierten Proteine wurde durch die Zugabe von 200 mM Kaliumiodid (KI) gequencht (B). Durch Bindung des Atto-markierten H5-Proteins an Proteoliposomen wurde die Diffusionszeit auf mehr als 50 ms verlängert (C). In Anwesenheit von 200 mM KI wurden die Fluoreszenzsignale der für den Quencher zugänglichen Proteine oder Farbstoffmoleküle gequencht (D).

Für die Durchführung der Einzelmolekülmessungen wurden Vesikel verwendet, welche zu 100% aus dem Lipidmolekül 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC) bestanden, da diese nahezu keine Eigenfluoreszenz aufwiesen. Die multilamellaren 100% DOPC-Vesikel wurden sorgfältig in Puffer N\* (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) extrudiert (siehe 3.27.), so dass sie eine durchschnittliche Partikelgröße von 250-350 nm aufwiesen. Für die Herstellung von YidC-Proteoliposomen wurde vor dem Extrudieren gereinigtes YidC-Protein im molaren Verhältnis von 1:25 000 (50  $\mu$ M YidC auf 10,6 mM Lipid) zu den Vesikeln gegeben (siehe 3.28.1.).

## Ergebnisse

Die Extrusion war zusätzlich erforderlich, um große Lipidpartikel aus der Suspension zu entfernen, da diese eine starke Eigenfluoreszenz aufwiesen. Die Vesikel wurden für 10 min bei 120 000 *g* und 4°C zentrifugiert und anschließend in Puffer N\* (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) bzw. zur Erstellung eines Membranpotentials in Puffer K\* (10 mM Tris/HCl pH 8.0, 100 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) resuspendiert. Vor jeder Messung wurde mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) das konfokale Volumen bestimmt und daraus die durchschnittliche Diffusionszeit des frei diffundierenden Farbstoffmoleküls Atto520-maleimid bestimmt (siehe Abb85 und Abb87 **A** und **B**). Anschließend konnte dieses Ergebnis mit den Einzelmolekülmessungen verglichen werden. Die Messungen wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt, hierfür wurde die entsprechende Menge an Puffer N\* oder K\* mit 400 µg (Proteo-) Liposomen und ca. 0,1 µg des mit Atto520-maleimid markierten und auf Einzelmolekülniveau verdünnten Proteins Procoat H5-M13C oder H5EE-M13C versetzt. Für die Untersuchung der Insertion wurde dem Puffer zusätzlich 200 mM KI zugegeben, für solche mit Membranpotential in Puffer K\* des Weiteren 0,25 µM Valinomycin. Anschließend wurden die Ergebnisse mit der Hilfe des Programms „Burst Analyzer“ (Zarrabi, 2003) nach festgelegten Kriterien automatisch analysiert und je zehn Messungen als Graphik gegen die Zeit aufgetragen. Die Messdauer betrug 8 min, welche in je 30 Sekunden-Abschnitte unterteilt wurde, so dass die Bindungs- und Einbau-kinetik analysiert werden konnte.

Wurde die Bindungseffizienz von Atto-markiertem Procoat H5-M13C an Liposomen mit und ohne Membranpotential (MP) untersucht (siehe Abb88), so war zu erkennen, dass die Menge an gebundenem Protein unabhängig vom Potential schien, nicht jedoch die Kinetik. Die Bindung an Liposomen mit Membranpotential (**C**) war nahezu nach 2 min abgeschlossen, wohingegen die an Liposomen ohne Potential (**A**) beinahe 4 min dauerte. Betrachtet man die Ergebnisse der Einbaustudien, so schien sich die Kinetik mit (**D**) und ohne Membranpotential (**B**) nicht deutlich zu unterscheiden, jedoch die Gesamtmenge an inseriertem Protein. Somit wurden in 10 Messungen durchschnittlich sechs Proteinmoleküle in Liposomen mit Potential eingebaut, während es in solche ohne Potential nur durchschnittlich vier waren. Die Daten des Einbaus von Procoat H5-M13C in Liposomen scheint hingegen keine Insertion darzustellen, sondern ein nicht vollständiges Quenchen der Fluoreszenz von gebundenem Protein an das Liposom (Quenching-rate 42% ohne MP bzw. 17% mit MP). Vermutlich kann das Fluoreszenzsignal des gebundenen H5-M13C-Proteins an Liposomen durch die Zugabe von KI nicht vollständig gelöscht werden, auch wenn die Quenchbarkeit des Proteins ohne Vesikel bei mindestens 87% lag.



## Ergebnisse

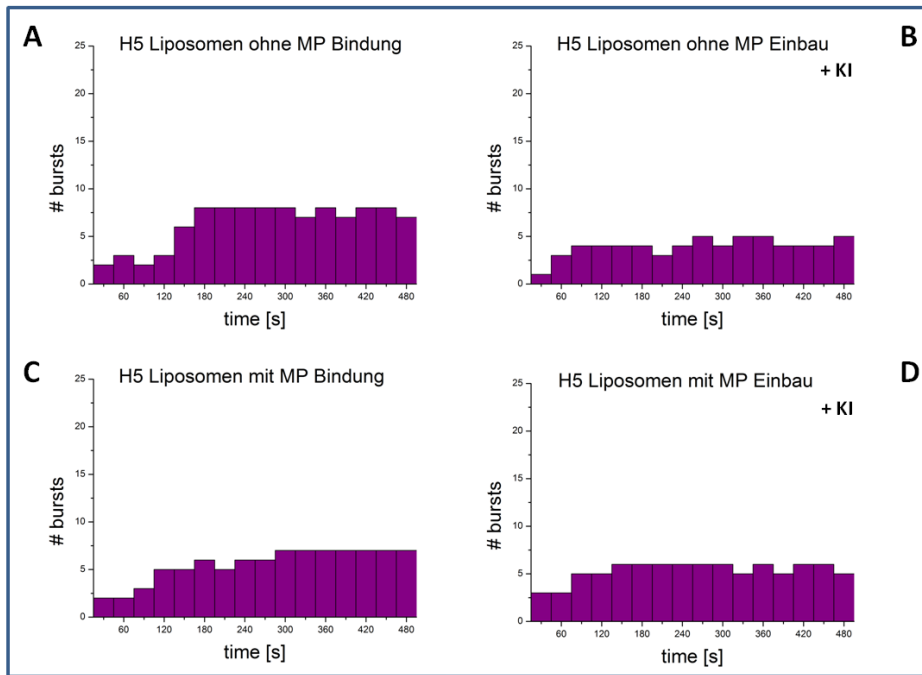


Abb88. **Bindungs- und Einbauraten des fluoreszenzmarkierten Procoat H5-M13C in Liposomen mittels Zählung der Photonenbursts**

Dargestellt sind die Ergebnisse der Burstzählung von Bindung und Einbau des Proteins Procoat H5-M13C in 100% DOPC-Liposomen. Die Bindung von Atto-markiertem H5-M13C an Liposomen ohne Membranpotential (A) bzw. solche mit (C) und der Einbau in Liposomen ohne (B) bzw. mit Membranpotential (D) ist unterteilt in 30 Sekunden-Abschnitte, um die Kinetik bestimmen zu können. Analysiert wurden hierfür die auftretenden Photonenbursts der 10 Messungen im Programm „Burst Analyzer“. Die Einzelmolekülmessungen wurden mit 400  $\mu\text{g}$  Liposomen, 0,1  $\mu\text{g}$  markiertem Procoat H5-M13C, ggf. mit 0,25  $\mu\text{M}$  Valinomycin (mit MP) und für die Einbaustudien mit 200 mM KI durchgeführt. Das Endvolumen von 50  $\mu\text{l}$  wurde durch die Zugabe der entsprechenden Menge an Puffer N\* bzw. K\* erreicht.

Die Einzelmolekülmessungen mit YidC-Proteoliposomen schienen wie in den Translokations-experimenten durch Tricin-SDS-PAGE und anschließender Immunfärbung (siehe Abb83) Bindung und Einbau zu zeigen. Die Bindung an Proteoliposomen mit Potential war nach 2 min abgeschlossen (siehe Abb89 A und C), wobei durchschnittlich mehr als 20 Kontakte zwischen Proteoliposom und Protein zustande kamen. Analysiert man die Daten der Bindung an Proteoliposomen ohne Membranpotential (A), so war die Bindung nach 3 min gesättigt und es wurden zwischen 15 und 18 Vesikel mit gebundenen Proteinmolekülen im Fokalvolumen detektiert. Die Ergebnisse der Insertion nach der Zugabe von Kaliumiodid zeigten, dass hierbei eine Abhängigkeit vom Membranpotential vorhanden war. Der Einbau in Proteoliposomen mit Potential (D) ging schneller vonstatten und ermöglichte die Insertion von mehr Proteinen in die Vesikel als in solche ohne Potential (B). Die Insertion von Procoat H5-M13C in YidC-Proteoliposomen wird somit vom Membranpotential stark beeinflusst. Im Vergleich zu den Liposomen wurde die bis zu dreifache Anzahl an Ereignissen mit Vesikeln detektiert, die ein Procoatprotein transloziert hatten. Die Ergebnisse waren jedoch aufgrund der mangelnden Quenchbarkeit des Proteins mit Vesikeln nicht eindeutig zu interpretieren.

## Ergebnisse

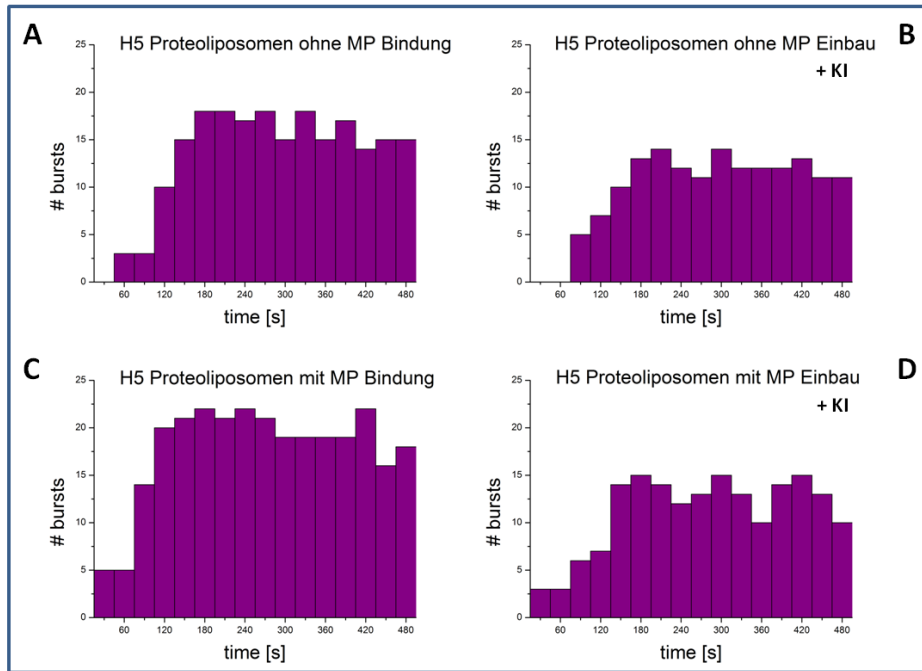


Abb89. **Bindungs- und Einbauraten des fluoreszenzmarkierten Procoat H5-M13C in YidC-Proteoliposomen mittels Zählung der Photonenbursts**

Dargestellt sind die Ergebnisse der Burstzählung von Bindung und Einbau des Proteins Procoat H5-M13C in YidC-Proteoliposomen aus 100% DOPC. Die Bindung von Atto-markiertem H5-M13C an YidC-Proteoliposomen ohne Membranpotential (A) bzw. solche mit (C) und der Einbau in Proteoliposomen ohne (B) bzw. mit Membranpotential (D) ist unterteilt in 30 Sekunden-Abschnitte, um die Kinetik bestimmen zu können. Analysiert wurden hierfür die auftretenden Photonenbursts der 10 Messungen im Programm „Burst Analyzer“. Die Einzelmolekülmessungen wurden mit 400  $\mu\text{g}$  YidC-Proteoliposomen, 0,1  $\mu\text{g}$  markiertem Procoat H5-M13C, ggf. mit 0,25  $\mu\text{M}$  Valinomycin (mit MP) und für die Einbaustudien mit 200 mM KI durchgeführt. Das Endvolumen von 50  $\mu\text{l}$  wurde durch die Zugabe der entsprechenden Menge an Puffer N\* bzw. K\* erreicht.

Des Weiteren wurde der Translokationsprozess von Procoat H5EE-M13C in Liposomen mittels Einzelmolekülmessung untersucht (siehe Abb90). Hierbei war zu erkennen, dass die Bindung des Proteins an die Liposomen zeitlich vom Membranpotential beeinflussbar schien. Die Bindung an Liposomen mit Potential (C) begann unmittelbar nach der Zugabe des Proteins, während sie an Liposomen ohne (A) erst nach 2 min abgeschlossen war. Die Gesamtmenge an Proteinmolekülen, welche an diese Liposomen gebunden hatten, lag bei beiden durchschnittlich bei sieben bis acht. Betrachtet man die Insertion von H5EE-M13C in Liposomen (B und D), so schien auch hierbei die Quenchbarkeit des an ein Liposom gebundenen Proteins unzureichend zu sein (Quenchingrate durchschnittlich bei ca. 8% ohne MP und 6% mit MP). Wahrscheinlich war das Cystein an Position +13 nicht exponiert und zu nahe im hydrophoben Bereich des Liposoms eingebettet, weshalb das sich dort befindliche Atto520-maleimid für das Kaliumiodid unzugänglich war.

## Ergebnisse

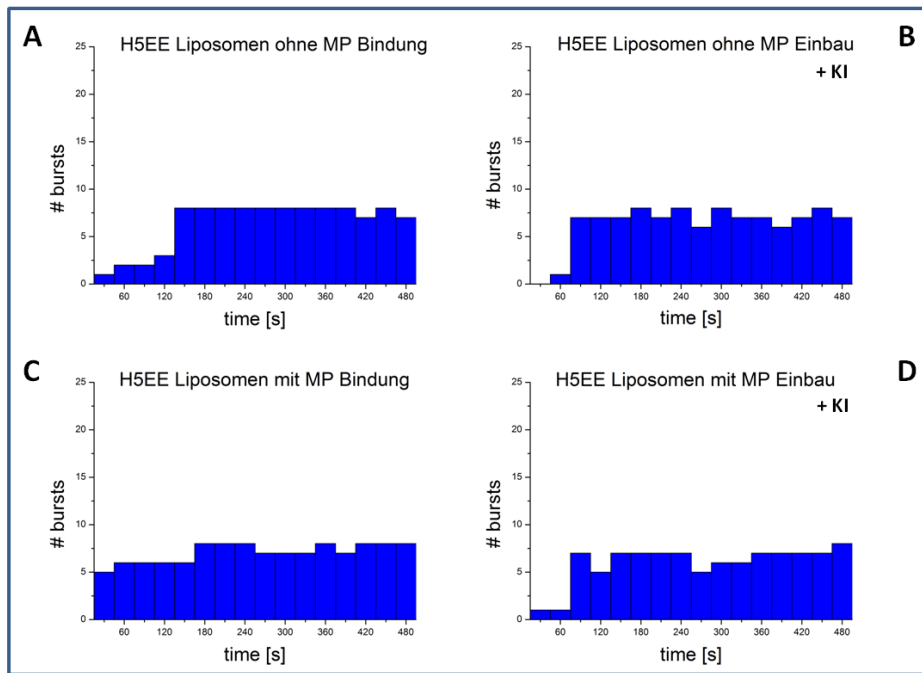


Abb90. **Bindungs- und Einbauraten des fluoreszenzmarkierten Procoat H5EE-M13C in Liposomen mittels Zählung der Photonenbursts**

Dargestellt sind die Ergebnisse der Burstzählung von Bindung und Einbau des Proteins Procoat H5EE-M13C in Liposomen aus 100% DOPC. Die Bindung von Atto-markiertem H5EE-M13C an Liposomen ohne Membranpotential (A) bzw. solche mit (C) und der Einbau in Liposomen ohne (B) bzw. mit Membranpotential (D) ist unterteilt in 30 Sekunden-Abschnitte, um die Kinetik bestimmen zu können. Analysiert wurden hierfür die auftretenden Photonenbursts der 10 Messungen im Programm „Burst Analyzer“. Die Einzelmolekülmessungen wurden mit 400 µg YidC-Proteoliposomen, 0,1 µg markiertem Procoat H5EE-M13C, ggf. mit 0,25 µM Valinomycin (mit MP) und für die Einbaustudien mit 200 mM KI durchgeführt. Das Endvolumen von 50 µl wurde durch die Zugabe der entsprechenden Menge an Puffer N\* bzw. K\* erreicht.

Analysiert man die Bindung und den Einbau von Procoat H5EE-M13C in YidC-Proteoliposomen (siehe Abb91), so scheint ein Einfluss des Membranpotentials erkennbar zu sein. Die Bindung von H5EE-M13C an Proteoliposomen mit Potential (C) verlief mit 2 min deutlich schneller als an solche ohne (A). Hierbei war die Bindung erst nach ca. 4 min abgeschlossen. Nach dieser Zeit war aber nahezu dieselbe Anzahl an Proteinmolekülen gebunden. Betrachtet man die Einbaukinetik von H5EE-M13C in Proteoliposomen, so schien diese ebenfalls durch das Membranpotential beschleunigt zu werden. Nach 1 min war nahezu die gesamte Menge an Protein (ca. 17 Moleküle) in die Vesikel mit Potential inseriert (D). Bei Proteoliposomen ohne Potential (B) war hingegen eine Beeinflussung der Gesamtmenge an inseriertem Protein erkennbar, hierbei wurden maximal 15 Proteinmoleküle eingebaut. Es scheint, dass die Insertion von Procoat H5EE-M13C in YidC-Proteoliposomen durch das Membranpotential deutlich beschleunigt und von der Insertase YidC katalysiert wird. Die Ergebnisse waren auch hierbei nicht aussagekräftig, weshalb die Interpretation nicht eindeutig war.

## Ergebnisse

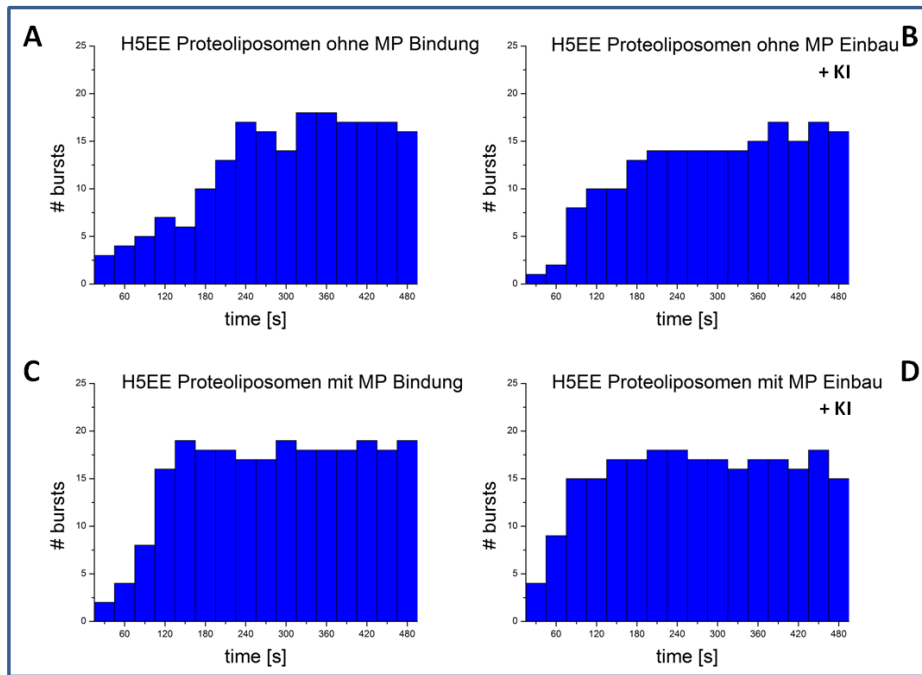


Abb91. **Bindungs- und Einbauraten des fluoreszenzmarkierten Procoat H5EE-M13C in YidC-Proteoliposomen mittels Zählung der Photonenbursts**

Dargestellt sind die Ergebnisse der Burstzählung von Bindung und Einbau des Proteins Procoat H5EE-M13C in YidC-Proteoliposomen aus 100% DOPC. Die Bindung von Atto-markiertem H5EE-M13C an YidC-Proteoliposomen ohne Membranpotential (A) bzw. solche mit (C) und der Einbau in Proteoliposomen ohne (B) bzw. mit Membranpotential (D) ist unterteilt in 30 Sekunden-Abschnitte, um die Kinetik bestimmen zu können. Analysiert wurden hierfür die auftretenden Photonenbursts der 10 Messungen im Programm „Burst Analyzer“. Die Einzelmolekülmessungen wurden mit 400 µg YidC-Proteoliposomen, 0,1 µg markiertem Procoat H5EE-M13C, ggf. mit 0,25 µM Valinomycin (mit MP) und für die Einbaustudien mit 200 mM KI durchgeführt. Das Endvolumen von 50 µl wurde durch die Zugabe der entsprechenden Menge an Puffer N\* bzw. K\* erreicht.

Abschließend kann festgestellt werden, dass die Einzelmolekülmessung eine sehr empfindliche Methode sein könnte, um das Translokationsverhalten von Proteinen zu untersuchen. Jedes Ereignis von Bindung kann identifiziert werden, da der Partikel durch die Bindung eines fluoreszenzmarkierten Proteins im fokalen Volumen des Mikroskops sichtbar wird. Die tatsächliche Insertion kann jedoch nur festgestellt werden, wenn die Fluoreszenz des Proteins nicht nur ohne Vesikel, sondern auch am Vesikel gebunden, vollständig quenchbar ist.

## 5. Diskussion

Nach der Synthese im Cytoplasma müssen die Proteine an ihren individuellen Bestimmungsort gelangen. Hierfür können die Polypeptide eine große Anzahl an Interaktionen mit anderen Proteinen eingehen. Cytoplasmatische Proteine werden oft mit der Hilfe von molekularen Faltungshelfern, sogenannten Chaperonen, in ihre native Konformation gefaltet. Membranproteine hingegen, die etwa 20-30% der zellulären Proteine darstellen, müssen in einem translokationskompetenten Zustand gehalten werden, während sie das wässrige Milieu des Cytoplasmas durchqueren, um funktionstüchtig in der Membran verankert werden zu können. Das Heranführen der integralen Membranproteine oder der zu sekretierenden Proteine an die Cytoplasmamembran (Targeting) wird hierbei von SecB oder SRP bewerkstelligt. Sekretorische Proteine werden durch SecB gebunden und zur ATPase SecA an der inneren Membran von *E. coli* geleitet. Durch die Hydrolyse von ATP wird eine mechanische Bewegung initiiert, wobei das zu sekretierende Protein durch die Translokase SecYEG ins Periplasma geleitet wird (Economou & Wickner, 1994). Die Vorläufer der Innenmembranproteine hingegen werden von SRP und seinem Rezeptor FtsY an den Translokationskomplex SecYEG übergeben und unter anderem mithilfe von SecA in die Membran transportiert. Die Insertase YidC übernimmt die hydrophoben Bereiche der Membranproteine und verankert diese schließlich im Bilayer. Das Protein YidC vermag zusätzlich unabhängig vom Sec-Komplex die Insertion von kleinen Membranproteinen zu katalysieren. Die beiden Phagenproteine M13 procoat und Pf3 coat, sowie MscL und die c-Untereinheit der F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATP-Synthase, werden mit der Hilfe von YidC ohne Beteiligung von Sec-Proteinen in der Innenmembran von *E. coli* verankert (Samuelson *et al.*, 2000). YidC ist somit sowohl für die Sec-abhängige als auch die Sec-unabhängige Translokation von Bedeutung (Samuelson *et al.*, 2000).

Die Vorgänge an der cytoplasmatischen Membran während der Translokation von Proteinen wurden im Rahmen dieser Arbeit anhand eines Rekonstitutionssystems analysiert. Die zu untersuchenden Membranproteine wurden zunächst einzeln gereinigt und anschließend Lipidvesikeln zugegeben. Dieses *in vitro*-System ermöglicht nicht nur die Untersuchung von Transportvorgängen mit und ohne Beteiligung von Transportproteinen oder des Membranpotentials, sondern auch die Analyse der Topologie der beteiligten Proteine in der Membran. Durch die Modifikation von Proteinbereichen oder der Lipidbestandteile im Liposom können des Weiteren die Anforderungen für die einzelnen Transportsysteme bestimmt werden. Bisherige Methoden mit einem temperatursensitiven Stamm von SecE bzw. einem Depletionsstamm von YidC ermöglichten nur die kurzweilige Repression der einzelnen Proteinkompo-

zenten, da diese essentiell für *E. coli* sind (Pogliano & Beckwith, 1994; Raxler & Murphy, 1996; Samuelson *et al.*, 2000; Yuan *et al.*, 2010).

### **5.1. Der Einbau von M13 procoat wird durch die Insertase YidC und das Membranpotential katalysiert**

Das Haupthüllprotein des filamentösen Phagens M13 wird als 73 Aminosäuren (AS) langes Präprotein synthetisiert, welches zwei hydrophobe Bereiche besitzt. Ein Transmembransegment befindet sich innerhalb der 23 AS langen N-terminalen Signalsequenz und das andere stellt den Membrananker des maturen Proteins M13 coat dar. Das Protein M13 procoat ist unabhängig von bekannten Chaperonen und Targetingsystemen und bindet nach dem Verlassen des Ribosoms an die Membranoberfläche (de Gier *et al.*, 1998). Das post-translationale Targeting zur Membran und YidC erfolgt ohne die Beteiligung des SRP (Kuhn *et al.*, 1987; de Gier *et al.*, 1998), sondern durch elektrostatische Interaktion mit Phosphatidylglycerin (Gallusser & Kuhn, 1990). Der eigentliche Prozess der Membraninsertion verläuft unabhängig von SecY und SecA (Wolfe *et al.*, 1985; Kuhn, 1988) und wird hauptsächlich von den hydrophoben Interaktionen zwischen Transmembranbereichen des Proteins und der Membran gesteuert (Kuhn *et al.*, 1986 und 1990; Soekarjo *et al.*, 1996). Das Protein M13 procoat wird als Loop oder „helical hairpin“ in die Membran inseriert (Engelman & Steitz, 1981; Kuhn, 1987), wobei beide hydrophoben Domänen, das Leaderpeptid (Kuhn *et al.*, 1986a) und der Membrananker (Kuhn *et al.*, 1986b) beteiligt sind. Der Translokationsprozess über die Membran wird durch beide Transmembranbereiche vorangetrieben, wobei die hydrophoben Bereiche  $\alpha$ -helikale Strukturen ausbilden (Thiaudière *et al.*, 1993; Kuhn, 1995). Der negativ geladene, hydrophile Loop hingegen wird mit der Hilfe des elektrochemischen Membranpotentials (Date *et al.*, 1980; Zimmermann *et al.*, 1982; Kuhn *et al.*, 1990; Cao *et al.*, 1995) und der Insertase YidC (Samuelson *et al.*, 2000) über die Membran transportiert. YidC nimmt hierbei die Rolle einer Membraninsertase ein (Dalbey & Kuhn, 2004). Die Insertase fungiert vermutlich als Membranchaperon und bewirkt als solches die Integration der hydrophoben Segmente von sowohl Sec-abhängigen als auch Sec-unabhängigen Proteinen (Chen *et al.*, 2002). Die Depletion von YidC hat auf das Targeting von M13 procoat keinen Einfluss (Samuelson *et al.*, 2001). Die anschließende Prozessierung des M13 procoat zu M13 coat erfolgt durch die Leaderpeptidase (Kuhn & Wickner, 1985; Kuhn *et al.*, 1990).

Diese Arbeit zeigt, dass das Protein M13 procoat effizient in YidC-Proteoliposomen inseriert wurde, wenn ein stabiles elektrochemisches Membranpotential (siehe Abb53) vorhanden war. YidC katalysiert hierbei den Insertionsprozess, da M13 procoat H5 in Proteoliposomen mit YidC eingebaut wurde, in Liposomen hingegen nicht (siehe Abb62). Der periplasmatische Loop von

## Diskussion

M13 procoat scheint nur bedingt in das wässrige Medium des Periplasmas zu ragen, ebenfalls zeigen die Termini nur einen reduzierten Kontakt zum Cytoplasma und befinden sich im Zwischenraum von Membran und Medium (Eisenhauer *et al.*, 2001). Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass die Termini beim Proteaseverdau nicht von der Protease verdaut wurden und auf SDS-Gelen kein Shift zu sehen war. YidC fungiert als Membraninsertase für ein Protein, welches einen zentralen Loop umgeben von zwei Transmembranbereichen besitzt. Diese Funktion konnte schon in anderen Studien gezeigt werden, hierbei handelte es sich ebenfalls um kleine Proteine. Rekonstituiertes YidC konnte die Translokation von Proteinen wie dem einspannigen Pf3 coat (Serek *et al.*, 2004) und der c-Untereinheit der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP-Synthase (van der Laan *et al.*, 2004) stimulieren. Diese Proteine sind von YidC abhängig, einen stimulierenden Effekt des Membranpotentials konnte hier jedoch nicht gezeigt werden. Erst die Untersuchung der Translokation von M13 procoat konnte die Effekte von YidC und dem Membranpotential auf den Einbau in die Membran unterscheiden.

In früheren Studien mit Liposomen und Proteoliposomen konnte gezeigt werden, dass M13 procoat ohne die Beteiligung von anderen Proteinen spontan in Liposomen inserieren kann (Watts *et al.*, 1981). Frisch synthetisiertes M13 procoat-Protein kann aus einer wässrigen Phase heraus in Liposomen inserieren, was als Evidenz interpretiert wurde, dass der Insertionsprozess spontan und hauptsächlich durch die hydrophobe Interaktion gesteuert wird (Geller & Wickner, 1985). Erst später wurde gezeigt, dass YidC für die Membraninsertion benötigt wird und der spontane Einbau ein Artefakt darstellt (Samuelson *et al.*, 2000). Die in dieser Arbeit verwendeten Procoat-Mutanten wurden in ein Plasmid kloniert, wobei die Expression mit Arabinose induzierbar war (Kuhn & Wickner, 1985). M13 procoat wurde auch schon früher zu einer Reinheit von ca. 75% in SDS gereinigt (Zwizinski & Wickner, 1982). Hierbei wurde ein Amber-Phage verwendet, welcher eine verspätete Prozessierung von M13 procoat aufweist. Wird M13 procoat in 2-Propanol gereinigt, so liegt es als Dimer vor, während M13 coat monomer ist und einen Reinheitsgrad von 90% aufweist (Thiaudière *et al.*, 1993). Für die *in vitro*-Studien dieser Arbeit wurde das Procoatprotein nativ im Detergenz Lauroylsarcosin gereinigt und vor Beginn des Experimentes mit Guanidiniumhydrochlorid entfaltet. Die Konzentration an Guanidiniumhydrochlorid und Detergenz wurde durch Verdünnung soweit reduziert, dass kein Einfluss auf die Membranintegrität der Liposomen erkennbar war. Diese Maßnahme war notwendig, da das Vorhandensein von Detergenz oder anderen Verunreinigungen während der Herstellung der Lipide zu Spontaneinbau von M13 procoat in Liposomen führt (Soekarjo *et al.*, 1996; Kawashima *et al.*, 2008). Dies könnte auch erklären, warum M13 procoat in anderen Studien in Liposomen inserieren konnte ohne die katalytische Hilfe von YidC und des Membranpotentials.

## Diskussion

Allgemein kann festgestellt werden, dass die Translokation von Proteinen nur durch das elektrochemische Membranpotential stimuliert wird, wenn negative Ladungen im zu translozierenden Bereich vorhanden sind. Es konnte gezeigt werden, dass die Translokation des periplasmatischen Teils von M13 procoat *in vivo* durch das Membranpotential stimuliert wird (Zimmermann *et al.*, 1982). Werden diese negativen Ladungen des Procoatproteins durch ungeladene oder positiv geladene ersetzt, so wird das Protein unabhängig vom Membranpotential transloziert (Kuhn *et al.*, 1990; Cao *et al.*, 1995; Schuenemann *et al.*, 1999). Gemäß der „positive inside rule“ (von Heijne, 1986) werden Membranproteindomänen mit positiv geladenen Aminosäureresten auf der cytoplasmatischen Seite der Membran platziert. Da die Membran aufgrund von Phosphatidylglycerin und Cardiolipin eine negative Ladung trägt, werden die sauren Aminosäurereste abgestoßen und durch das Membranpotential begünstigt über die Membran ins Periplasma transportiert. Das Membranpotential ist auf dieser Seite positiv und zieht somit die negativ geladenen Proteinbereiche an. Allerdings können diese elektrophoretischen Effekte auch eine untergeordnete Rolle spielen, da auch ungeladene und sogar positiv geladene Regionen transloziert gefunden wurden (Bakker & Randall, 1984; Kuhn *et al.*, 1990; Kato *et al.*, 1992).

Die Bindung der positiv geladenen Aminosäurereste der Termini von M13 procoat initiiert den Insertionsprozess (Kuhn *et al.*, 1990). Werden diese basischen Aminosäuren durch ungeladene oder negativ geladene ersetzt, so akkumuliert das Protein im Cytoplasma (Gallusser & Kuhn, 1990). Vermutlich bindet Procoat mit den positiv geladenen Resten an die negativ geladenen Kopfgruppen der Phospholipide der Membran durch elektrostatische Interaktion. Das Phospholipid 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC) trägt keine negativ geladene Kopfgruppe und deshalb konnten 100% DOPC-Liposomen M13 procoat H5 nicht ohne YidC binden (siehe Abb83). Ist das Signalpeptid von Procoat nicht vorhanden, kann M13 coat nicht in die Membran inserieren, dies vermag ausschließlich M13 procoat (Rohrer & Kuhn, 1990). Zusätzliche negative Ladungen im periplasmatischen Loop führen dazu, dass das Protein stärker vom Membranpotential abhängig wird (Cao *et al.*, 1995). Das Protein M13 procoat H5EE zeigte *in vitro* eine stärkere Abhängigkeit vom Membranpotential als das Procoat H5-Protein (siehe Abb63). Positive Ladungen im periplasmatischen Bügel von M13 procoat hingegen, wodurch dieser Bereich ungeladen ist, führen dazu, dass die Insertion auch in Abwesenheit des Membranpotentials stattfinden kann (Schuenemann *et al.*, 1999), wie es bei Procoat H5-0PC auch *in vitro* gezeigt werden konnte (siehe Abb63).

Das Protein M13 procoat H5 besitzt einen Austausch in der Signalsequenz von Serin nach Phenylalanin an der Position -3, wodurch es weniger effizient von der Leaderpeptidase prozessiert wird (Kuhn & Wickner, 1985; Soekarjo *et al.*, 1996). Für die Experimente war



## Diskussion

unprozessiertes Procoat notwendig, da der Insertionsvorgang *in vitro* untersucht werden sollte. Das Procoatprotein kann aus den Zellen nur isoliert werden, wenn die Prozessierung durch die Leaderpeptidase verhindert wird. Die Leaderpeptidase erkennt kleine, neutrale Aminosäurereste an den Positionen -1 und -3 (von Heijne, 1983; Perlman & Halvorson, 1983). Der Großteil der Präproteine besitzt an der Position -1 meist ein Alanin, Glycin oder Serin. An Position -3 befindet sich normalerweise eine größere, aliphatische Aminosäure wie Leucin, Valin, Isoleucin oder eine der Aminosäuren, welche auch an Position -1 zu finden sind. Das Protein H5 besitzt an der Position -3 die aromatische, sperrige Aminosäure Phenylalanin, welche in der Erkennungsregion für die Leaderpeptidase nicht bekannt ist und dieser somit kein Substrat darstellt. Wurde das H5-Protein invertierten Innenmembranvesikel zugegeben, so wurde es effizient in diese eingebaut (siehe Abb48). M13 procoat inserierte auch in anderen Studien in bakterielle invertierte Innenmembranvesikel (Chang *et al.*, 1979; Nishiyama *et al.*, 2006). Die Insertionsrate lag aber auch hier bei nur ca. 50%. Ebenfalls konnte nicht unterschieden werden, ob die Insertion durch den Sec-Proteinkomplex oder die Membraninsertase YidC katalysiert war. Eine *in vivo*-Untersuchung der einzelnen Komponenten in temperatursensitiven bzw. Depletionsstämmen konnte dies klären (Wolfe *et al.*, 1985; Samuelson *et al.*, 2000). Der Insertionsprozess von H5 verläuft unabhängig von SecYEG, das isolierte Protein kann auch SecA nicht binden und somit nicht aktivieren (Roos *et al.*, 2001). Dies konnte mit einem *in vitro*-Rekonstitutionssystem bestätigt werden, da die Insertion von H5 in SecYEG-Proteoliposomen durch SecA nicht unterstützt wurde (siehe Abb72). Das Protein konnte auch nicht in Liposomen eingebaut werden (siehe Abb68 3% DAG). War jedoch rekonstituiertes YidC in den Vesikeln vorhanden, so konnte vor dem Proteaseverdau geschütztes Protein detektiert werden. Die Translokationseffizienz in YidC-Proteoliposomen wurde durch das Anlegen eines Membranpotentials deutlich verbessert (siehe Abb63 B, Translokationsbilder). Die Zugabe von SecA und ATP verminderte die Translokationseffizienz um ca. 5% (siehe Abb72). Dies stimmt mit den Erkenntnissen von Samuelson und seinen Mitarbeitern (2001) überein, die beobachtet haben, dass H5, wie wildtypisches Procoat, mit der Hilfe von YidC und dem elektrochemischen Membranpotential transloziert wird.

## **5.2. Veränderungen der Ladung im periplasmatischen Bereich führt zu einem anderen Translokationsverhalten bezüglich des elektrochemischen Membranpotentials**

Eine Mutante von M13 procoat, das Protein H5-0PC, besitzt einen ungeladenen periplasmatischen Bügel und ist *in vivo* nur gering abhängig vom Membranpotential (Cao *et al.*, 1995). Es wird ebenfalls in YidC-Proteoliposomen ohne Membranpotential transloziert (siehe Abb63 A, Translokationsbilder). Die bisherigen Befunde zeigen, dass Proteinregionen mit nur ungeladenen Aminosäureresten unabhängig vom Membranpotential transloziert werden. Dies gilt sogar, wenn die Hydrophobizität der beiden Transmembranbereiche durch Deletion von mehreren hydrophoben Aminosäureresten verkürzt wird (Schuenemann *et al.*, 1999). Das Protein H5-0PC wird Sec-unabhängig (Chen *et al.*, 2005), aber mithilfe von YidC in die Membran inseriert (Samuelson *et al.*, 2001). Die im periplasmatischen Bügel negativ geladenen Procoatproteine sind aber stärker von YidC abhängig. H5-0PC zeigte in dem Depletionsstamm jedoch eine geringe Insertionsrate. Da in Depletionsstämmen ein Restgehalt an YidC nicht auszuschließen ist, konnte eine strikte YidC-Abhängigkeit nicht getestet werden. Die Abhängigkeit von YidC konnte aber in einem *in vitro*-Translokationssystem gezeigt werden (siehe Abb63, rechts). Das Protein M13 procoat H5-0PC wurde sehr effizient (100%) in YidC-Proteoliposomen inseriert, in Liposomen hingegen wurde nur ca. die Hälfte des Proteins eingebaut (Stiegler *et al.*, 2011).

Ein weiteres Derivat von M13 procoat ist das Protein H5EE, es besitzt zwei zusätzliche Aminosäurereste Glutamat nach der Position +2. Diese Mutation bewirkt eine stärker negative Ladung im periplasmatische Bügel. Das hat zur Folge, dass das Protein M13 procoat H5EE *in vivo* sowohl Sec-abhängig, sowie YidC-abhängig in die Membran inseriert werden kann und die protonenmotorische Kraft benötigt (Samuelson *et al.*, 2000; Baud *et al.*, 2005). H5EE kann im Unterschied zu M13 procoat H5 mit der ATPase SecA interagieren und den Sec-Translokationsweg einschlagen. H5EE bindet zwar an SecA, kann es aber nicht aktivieren (Roos *et al.*, 2001). Die Bindung von H5EE an SecA inhibiert die Bindung von proOmpA, was darauf hindeuten könnte, dass beide um die gleiche Bindungsstelle im Protein SecA konkurrieren. Dennoch wurde H5EE effizient in INV inseriert, welche kein zusätzliches, freies SecA enthielten (siehe Abb48), was auch mit den Resultaten von Roos (2000) übereinstimmt. Die Bindung an SecA ist demnach keine Voraussetzung für seinen Membraneinbau. Wurde die Translokation in Liposomen mit oder auch ohne Membranpotential untersucht (siehe Abb63 C), konnte keine effiziente Translokation festgestellt werden. Jedoch konnte das Protein in YidC-Proteoliposomen

## Diskussion

eingebaut werden (Stiegler *et al.*, 2011), die Translokation verlief aber deutlich effizienter, wenn ein stabiles Membranpotential vorhanden war (siehe Abb63 C). Vermutlich ist H5EE stärker vom Membranpotential abhängig als das H5, denn schon eine Mutante mit nur einer zusätzlichen negativen Ladung im Loop, das Protein H5E, wird ohne Membranpotential nicht transloziert (Cao *et al.*, 1995). Zusätzlich benötigt dieses Protein die Insertase YidC für den Einbau in die Membran (Samuelson *et al.*, 2001). Somit scheint die Insertase YidC ausreichend für eine Membraninsertion von H5EE zu sein, auch wenn *in vivo* das Protein einen Sec-abhängigen Phänotyp aufweist (Cao *et al.*, 1995). Wurde die Translokation des Proteins in SecYEG-Proteoliposomen untersucht (siehe Abb72), so war erkennbar (Stiegler *et al.*, 2011), dass die Translokationsrate mit SecYEG und Membranpotential (90%) höher lag als die mit YidC und Membranpotential (35%). War hierbei jeweils gereinigtes SecA und ATP vorhanden, so wurde die Insertion jeweils geringfügig vermindert. Das Membranpotential (siehe Abb71) verbesserte jedoch die Einbaurrate um ca. 5% im Vergleich zu ohne. Es kann geschlussfolgert werden, dass H5EE den Sec-Translokationsweg effizienter verwenden kann als den „YidC-only“-Weg. In Abwesenheit von SecA scheint das H5EE ebenfalls in die SecYEG-Proteoliposomen inseriert zu werden und auch in YidC-Proteoliposomen. Dieses Ergebnis erscheint erstaunlich, da das 75 Aminosäuren lange Protein H5EE das einzige Substrat des Sec-Weges zu sein scheint, welches einen nur sehr kleinen periplasmatischen Loop besitzt. Möglicherweise sind auch andere Sec-abhängige Proteine nicht zwingend von der Translokase abhängig, sondern werden durch ihre Interaktion mit SecA in den Sec-Translokationsweg geleitet. Allerdings liegt der Bereich für die SecA-Bindung in der Signalsequenz und in der maturen Region der Präproteine (Lill *et al.*, 1990). In der Leadersequenz scheinen hierbei die hydrophoben Domänen entscheidend zu sein (de Gier *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000). Dann ist jedoch verwunderlich, dass H5EE SecA binden kann, denn die Aminosäuresequenz in diesen Bereichen stimmt mit der von H5 überein, dieses Protein kann hingegen SecA nicht binden. Die 610 Aminosäurereste der proteinbindenden Domäne von SecA können nicht nur Signalpeptide binden (Baud *et al.*, 2002), sondern auch die mature Region von H5EE (Papanikou *et al.*, 2005). Die Bindung von H5EE an SecA wird sowohl von der Signalsequenz als auch von dem maturen Teil bewerkstelligt. Somit wurde gezeigt, dass schon kleinste Veränderungen in der Aminosäuresequenz in der Nähe der Erkennungsregion für die Leaderpeptidase zu einem anderen Verhalten in der Interaktion mit SecA führen können. Die Proteine H5 und H5E konnten SecA nicht binden, während eine zusätzliche Aminosäure Glutamat in H5EE zur Bindung führte (Roos *et al.*, 2001). Nur wenn Proteinen die SecA-Bindungsstelle fehlt, können sie mithilfe von YidC alleine transportiert werden.

### **5.3. Die Insertion von M13 procoat verbraucht das Membranpotential nicht**

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist das Membranpotential. Für die Translokation vieler Membran- und auch sekretierter Proteinen wird das elektrochemische Membranpotential benötigt (Date *et al.*, 1980; Daniels *et al.*, 1981; Enequist *et al.*, 1981). Da die Insertase YidC das elektrochemische Membranpotential nicht zwingend für die Insertasefunktion benötigt, stellt sich die Frage, ob dieses durch den Translokationsvorgang verbraucht wird. Das an die Vesikel angelegte, durch Valinomycin generierte, „inside-positive“-Membranpotential blieb bei der Insertion von H5 nahezu unverändert stabil (Stiegler *et al.*, 2011), da die Höhe der Oxonol VI-Fluoreszenz während des Einbaus konstant blieb (siehe Abb63 B). Wurde die Fluoreszenzveränderung von H5EE (Nettoladung von -5) beobachtet, so wurde erkennbar, dass das Membranpotential durch den Proteineinbau nur leicht beeinflusst wurde (C). Durch das inserierende M13 procoat H5EE-Protein werden negative Ladungen in das Lumen der Vesikel eingebracht und dadurch positive Ladung „verbraucht“. Die leichte Fluoreszenzänderung könnte daher durch den Transfer von Ladung über die Membran herrühren, da H5 drei und H5EE fünf negative Ladungen im translozierten Bereich besitzen. Diese Schlussfolgerung steht im Einklang mit der Beobachtung, dass das inserierende Protein H5-0PC keine Auswirkung auf die Höhe des Membranpotentials zeigte (A). Dieses Protein besitzt im Loop keine Nettoladung und bringt somit keine Ladung auf die periplasmatische Seite der Membran.

### **5.4. Das M13 procoat nimmt im rekonstituierten System eine bestimmte Konformation ein**

Ein weiteres M13 procoat-Protein, das Protein PClep, wurde ebenfalls mit dem Rekonstitutions-system getestet. Das Protein besitzt eine C-terminale Verlängerung, wobei 103 AS der Leaderpeptidase an das Alanin +49 von Procoat fusioniert wurden. Das Leaderpeptidase-Fragment mit 103 Aminosäureresten Länge stört die Translokation des Proteins nicht (Kuhn *et al.*, 1986b). Das Protein wird Sec-unabhängig (Kuhn *et al.*, 1987; Chen *et al.*, 2005) mit dem prozessierten Aminoterminus im Periplasma und dem Leaderpeptidaseteil am Carboxyterminus im Cytoplasma in die Membran inseriert (Kuhn *et al.*, 1986a). PClep wird wie M13 procoat effizient transloziert, wenn ein Membranpotential vorhanden ist (Cao *et al.*, 1995). Diese Mutante von Procoat kann verwendet werden, um die Topologie des Proteins in der Membran zu ermitteln. Der nicht translozierte C-terminale Teil wird *in vitro* bei YidC-Proteoliposomen durch Proteaseverdau entfernt, wobei ein ca. 7 kDa großes Fragment entsteht. Dieses Fragment

beinhaltet die translozierte mittlere Region, welche die Bindungsstelle für das M13-Antiserum trägt (Stiegler *et al.*, 2011). Wurde das Translokationsverhalten von PClep in invertierte Innenmembranvesikel untersucht (siehe Abb49), so konnte das 7 kDa-Fragment detektiert werden, ebenso bei der Translokation in YidC-Proteoliposomen (siehe Abb75). Somit konnte die Orientierung von PClep mit dem C-Terminus außerhalb des Vesikels und dem Loop im Inneren des Liposoms gezeigt werden. Diese Ergebnisse korrespondieren mit den Erkenntnissen der *in vivo*-Experimente von Kuhn und Mitarbeitern (1986b). Nicht inseriert werden konnte PClep in Liposomen und Proteoliposomen mit rekonstituiertem SecYEG (siehe Abb75). Somit ist die Abhängigkeit von YidC auch in diesem *in vitro*-System bestätigt, sowie die Unabhängigkeit von der Translokase SecYEG.

### **5.5. Die Sec-abhängigen Procoatproteine werden mithilfe von SecAYEG in Lipidvesikel inseriert, nicht aber mit YidC**

Die Sec-abhängigen Proteine pro828coat und pro80coat wurden auf ihr Translokationsverhalten im Rekonstitutionssystem getestet (siehe Abb75). Es zeigte sich, dass beide Proteine in SecYEG-Proteoliposomen mit SecA inseriert werden konnten, in YidC-haltige Proteoliposomen hingegen nicht (siehe Abb75). Beide Proteine werden unabhängig vom Membranpotential in SecYEG-Proteoliposomen transloziert, SecA war für die Translokation notwendig. Die Translokation von pro828coat (Stiegler *et al.*, 2011) und pro80coat wurde vom Membranpotential nicht beeinflusst. Das rekonstituierte YidC war nicht befähigt, die großen periplasmatischen Bereiche über die Membran zu transportieren (siehe Abb75), was mit den Ergebnissen *in vivo* übereinstimmt (Kuhn, 1988; Samuelson *et al.*, 2001). Somit konnte gezeigt werden, dass die Insertase YidC ausschließlich kleine hydrophile Bereiche translozieren kann, deren Transport keinen großen Energieaufwand benötigt. Je länger der periplasmatische Bereich des Präproteins ist, desto abhängiger wird es von SecYEG (Roos *et al.*, 2001). YidC katalysiert das Verlassen der Transmembranhelices von komplexeren Proteinen aus der Sec-Translokase (Beck *et al.*, 2001; Houben *et al.*, 2002) und katalysiert die richtige Faltung der polytopen Membranproteine (Scotti *et al.*, 2000; Nagamori *et al.*, 2004). Das Protein pro828coat ist stärker von der Sec-Translokase abhängig als pro80coat, dasselbe gilt für die SecA-Aktivität. Das Protein pro828coat wurde in *E. coli* Innenmembranvesikel (INV) mit ATP effizient inseriert (Stiegler *et al.*, 2011), sowie auch pro80coat (siehe Abb49). Das inserierte Fragment von pro828coat besteht aus den Aminosäureresten 67-240 von OmpA und besitzt somit eine Länge von 174 zusätzlichen Aminosäuren (Kuhn, 1988). Es wird in Anwesenheit von SecA und SecY

## Diskussion

transloziert (Kuhn, 1988; Kuhn *et al.*, 1990). Für das Targeting an die Membran ist kein SecB erforderlich, für die Insertion wird aber die ATPase-Aktivität von SecA benötigt, denn pro828coat kann SecA binden und die ATPase-Funktion aktivieren (Roos *et al.*, 2001), wenn gleich nicht so effizient wie proOmpA. Zusätzlich benötigt das Protein YidC, um den OmpA-Teil über die Membran zu transportieren (Samuelson *et al.*, 2001). Das Protein pro80coat besitzt zusätzlich 80 Aminosäuren (AS +67 bis +76 und +171 bis + 240 der OmpA-Sequenz) im periplasmatischen Bereich. Es inseriert in die Membran *in vivo* Sec-abhängig (Kuhn *et al.*, 1990), wird aber verlangsamt transloziert, da es eventuell in der Sec-Translokase zurückgehalten wird und somit für die Leaderpeptidase kurzzeitig nicht zugänglich ist (Roos *et al.*, 2001). Der Grund für die verspätete Translokation liegt vermutlich daran, dass pro80coat SecA zwar binden, die ATPase-Funktion aber nicht effizient aktivieren kann (Roos *et al.*, 2001). Zwei weitere Mutanten von Procoat mit 20 (pro20coat) bzw. 40 (pro40coat) zusätzlichen Aminosäureresten der OmpA-Sequenz waren SecA- und SecYEG-unabhängig (Roos *et al.*, 2001). Vermutlich ist der periplasmatische Teil von proOmpA zu kurz. Das deutlich kürzere Protein M13 procoat H5EE, mit einem relativ kleinen translozierten Loop, kann SecA zwar effizient binden, die SecA-ATPase vermag es aber nicht zu aktivieren. Eventuell können die Proteine H5EE und pro80coat die IRA1-Domäne von SecA nicht aktivieren, aufgrund ihrer zu geringen Größe (Roos *et al.*, 2001). Diese IRA1-Domäne bildet eine Zweifingerhelix aus, welche die translokationsabhängige ATP-Hydrolyse reguliert und den Kontakt zwischen dem Substrat und den C- und N-terminalen Bereichen von SecA herstellt (Zimmer *et al.*, 2008). Interessanterweise führen Mutationen in der IRA1-Domäne dazu, dass die Translokation unabhängig von der ATP-Hydrolyse wird (Karamanou *et al.*, 1999).

Das Substrat des Sec-abhängigen Translokationsweges proOmpA zeigte bei Translokation in INVs eine Abhängigkeit von SecA (siehe Abb49). Das lösliche Protein SecA war im Versuchsablauf nur mit der Membran assoziiert vorhanden und wurde nicht zusätzlich extern zugegeben. Die initiiierende Bewegung der Signalsequenz von proOmpA in die Membran hinein erfordert die Bindung von ATP an SecA (Schiebel *et al.*, 1991). SecA erkennt Teile der Leader- und maturen Sequenz von proOmpA (Lill *et al.*, 1989). Zusätzlich scheint der hydrophobe Charakter der Signalsequenz für die SecA-Bindung von Bedeutung zu sein (de Gier *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000). Die ATPase wird durch die Bindung des Präproteins, die Bindung an SecYEG und negativ geladene Lipide aktiviert (Lill *et al.*, 1990). Eventuell negativ auf die Translokationseffizienz könnte sich auch das Fehlen von SecB ausgewirkt haben, weshalb die Translokationsrate nicht sehr hoch war (siehe Abb49). Translokationsstudien mit INV haben gezeigt, dass die SecB-vermittelte Sekretion von proOmpA alle Komponenten von SecYEG für den Transport über die Membran erfordert, wohingegen die SRP-vermittelte Integration von MtlA in die Membran auch in Abwesenheit von SecG stattfinden kann (Koch & Müller, 2000). Die

## Diskussion

membrangebundene und funktionstüchtige Translokase besteht wahrscheinlich aus einem SecYEG-Dimer (Tam *et al.*, 2005; Breyton *et al.*, 2002; Duong, 2003; Tziatzios *et al.*, 2004), mit einem proteintranslozierenden Kanal in jedem Monomer (van den Berg *et al.*, 2004). Das proOmpA konnte somit als Sec-abhängiges Protein herangezogen werden, um die Funktionalität der gereinigten und rekonstituierten SecYEG-Komponenten zu überprüfen. Die Sec-Translokase benötigt für ihre Translokationskompetenz den Kontakt zur ATPase SecA. Diese Interaktion wird in Anwesenheit von Cardiolipin stimuliert (Gold *et al.*, 2010). Das könnte der Grund dafür sein, dass proOmpA nur in *E. coli* Polarextraktlipide in Anwesenheit von SecYEG und ATP transloziert wird, nicht aber mithilfe von SecYEG-Proteoliposomen, welche zu 72% aus DOPE und 28% DOPG bestehen. Das Zufügen von 10% CL zu 67% DOPE und 23% DOPG führte erneut zur Translokation von proOmpA via SecYEG (Gold *et al.*, 2010). Somit konnte gezeigt werden, dass die Zusammensetzung der Membran auch für die Translokationsmaschinerie SecYEG von Bedeutung ist, nicht nur für YidC.

Wurde die Translokation von proOmpA in SecYEG-haltige Proteoliposomen untersucht (Stiegler *et al.*, 2011), so war erkennbar, dass das Protein in Anwesenheit von SecA und ATP über die Vesikelmembran transportiert wurde (siehe Abb73, SecYEG-Proteoliposomen). In Abwesenheit von SecA und ATP wurde das Protein jedoch nicht vor der Protease geschützt und war nicht in die SecYEG-Proteoliposomen eingebaut. Ebenfalls wurde keine Translokation in Liposomen und YidC-haltigen Proteoliposomen sichtbar (siehe Abb73, Liposomen und YidC-Proteoliposomen). Für das Protein proOmpA konnte gezeigt werden, dass *in vivo* elektrophoretische Effekte die Translokation beeinflussen können (Geller *et al.*, 1993). Das generierte Membranpotential verbesserte die Translokation in diesen *in vitro*-Translokationsstudien nicht, dies war im Gegensatz zu den *in vivo*-Experimenten. Die Translokation von negativ geladenen Aminosäureresten über die Membran wird durch das Membranpotential stimuliert. Wird das Membranpotential jedoch durch die Zugabe von CCCP (Carbonyl Cyanid *m*-Chlorophenylhydrazon) zerstört, so akkumuliert proOmpA im Zellinneren und wird nicht mehr transloziert (Cao *et al.*, 1995).

## 5.6. Diacylglycerin stabilisiert die Membranintegrität der Vesikel und verhindert die Spontaninsertion von M13 procoat

Diacylglycerin (DAG) ist ein einfach strukturiertes Lipid, welches aus einem Glycerinmolekül besteht, an das an den Positionen 1 und 2 zwei Fettsäuren über Esterbindungen gebunden sind (Raetz, 1978). Die Entstehung kann über verschiedene Synthesewege erfolgen (zusammengefasst in Carrasco & Mérida, 2006). DAG erfüllt wichtige Funktionen in der Membran, stellt ein Zwischenprodukt im Lipidmetabolismus dar und hat lipidvermittelte Signalfunktion. DAG stellt zum Beispiel den Kontakt zwischen DAG-abhängigen Proteinen und der Membran her. Als Zwischenprodukt der Lipidsynthese ist DAG ein Vorläufer von Phosphatidylserin, was dann wiederum zur Entstehung von Phosphatidylethanolamin dienen kann. Auch Phosphatidylinositol und Cardiolipin können aus DAG gebildet werden. Des Weiteren kann es durch die Veresterung mit einer Fettsäure zu Triacylglycerin metabolisiert werden. Durch die Hydrolyse einer der Fettsäuren an Position 1 oder 2 können wiederum Monoacylglycerin und freie Fettsäuren gewonnen werden. DAG stellt kein Bilayerlipid dar und kann somit keine Lipiddoppelschichten ausbilden. *In vivo* in *E. coli* wird DAG bis zu einer Konzentration von bis ~1,3% gebildet (Raetz & Newman, 1978; Rotering & Raetz, 1983).

Zunächst wurde postuliert, dass M13 procoat *in vitro* Spontaneinbau in Liposomen zeigt (Geller & Wickner, 1985). Später wurde aber gezeigt, dass M13 procoat das integrale Membranprotein YidC *in vivo* für seinen Einbau in die Lipiddoppelschicht der Cytoplasmamembran benötigt (Samuelson *et al.*, 2000). Ist kein YidC für die *in vivo*-Insertionsstudien vorhanden, akkumuliert das M13 procoat-Protein an die Membran gebunden (Samuelson *et al.*, 2001). Da aber die Depletion von YidC das elektrochemische Membranpotential beeinflusst (van der Laan *et al.*, 2003), könnte die Akkumulation von M13 procoat auch indirekt durch die Zerstörung des Membranpotentials hervorgerufen werden. Erst als Samuelson und Mitarbeiter (2001) zeigen konnten, dass vom Membranpotential unabhängige M13 procoat-Proteine ebenfalls YidC für ihre Membraninsertion benötigen, war eine direkte Beteiligung von YidC bewiesen. Die Abhängigkeit vom Membranpotential *in vivo* wird stark von dem Vorhandensein von geladenen Aminosäureresten im periplasmatischen Bügel des M13 procoat-Proteins beeinflusst (Kuhn *et al.*, 1990; Cao *et al.*, 1995). Es konnte später bestätigt werden, dass M13 procoat H5 tatsächlich *in vitro* einen Spontaneinbau in Liposomen zeigt, die nur aus Phospholipiden ohne Diacylglycerin bestehen (Nishiyama *et al.*, 2006; Kawashima *et al.*, 2008). Eine Konzentration von mehr als 3 mol% DAG in Liposomen kann den Spontaneinbau von M13 procoat H5 verhindern. Wurden Liposomen des *E. coli* Gesamtextraktes auf Spontaneinbau von M13 procoat



## Diskussion

H5 untersucht, so konnte dies hier bestätigt werden (siehe Abb68). H5 wurde besser in Liposomen ohne DAG inseriert als in die korrespondierenden YidC-Proteoliposomen (Stiegler *et al.*, 2011). Die Messung des Membranpotentials der Vesikel ohne DAG zeigte, dass keine stabilen Werte erzielt werden konnten und das Potential nach ca. 1 Minute abgebaut war (siehe Abb66). Wurden den *E. coli*-Liposomen 1% bzw. 2% DAG zugesetzt, so wurde der spontane Einbau auf ca. 30% vermindert, die Integrationseffizienz in Proteoliposomen war jedoch weitgehend unabhängig vom Membranpotential. Die effizienteste DAG-Konzentration erwies sich als 3% bis 4%. Hierbei fand keinerlei Spontaninsertion mehr statt, die Liposomen waren dicht für das Durchtreten von kleinen Proteinen (siehe Abb68) und auch für Kaliumionen, wodurch ein stabiles Membranpotential messbar war (siehe Abb66). Dagegen ergaben die Messungen des Membranpotentials der Liposomen des *E. coli* Gesamtextraktes mit 1% und 2% keine stabilen Werte (siehe Abb66). Das anfängliche Potential wurde vermutlich durch die Diffusion der Kalium- bzw. Natriumionen sofort abgebaut. Eine Stabilisierung des Potentials war zwar schon mit 1% bzw. 2% DAG erkennbar, stabile Messungen über 20 min waren aber nur mit mindestens 3% DAG erreichbar (Stiegler *et al.*, 2011). Durch die Zugabe von mehr als 5% DAG konnte zwar weiterhin ein stabiles Membranpotential gemessen werden (siehe Abb66), die Insertionsrate von M13 procoat H5 wurde aber durch die zunehmende Versiegelung der Membran reduziert (siehe Abb68). Die Zugabe von DAG veränderte die Membranfluidität, wodurch der Spontaneinbau in Liposomen verhindert werden konnten. Das Zufügen von 10% DAG zu den Lipiden des *E. coli* Gesamtextraktes veränderte die Membranintegrität insoweit, dass die Extrusion durch eine Polycarbonatmembran (Porengröße 0,4 µm) fast nicht mehr möglich war. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass für jeden Lipidextrakt die benötigte Menge an DAG bestimmt werden muss, so dass die Membranintegrität intakt ist und kein Spontaneinbau stattfinden kann. Die Potentialmessungen können als Qualitätsnachweis für die Integrität der Vesikelmembran herangezogen werden. Das Membranpotential wurde auch schon von Wang und Mitarbeitern (2002) zur Kontrolle der *in vitro* hergestellten Liposomen gemessen, auch dort wurde ein Kalium-Diffusionspotential durch Valinomycin ausgelöst, welches durch die Zugabe von Nigericin zerstört werden konnte. Auch das polytope Membranprotein Mannitol Permease (MtlA) aus *E. coli* wird spontan in Liposomen ohne DAG inseriert (Nishiyama *et al.*, 2006). Dieses Membranprotein, welches 6-8 Transmembranregionen besitzt, wird SRP-abhängig via SecYE (Beck *et al.*, 2000 und 2001) co-translational mit der Hilfe von YidC in die Membran integriert. Auch bei diesem Protein verhindert die Zugabe von mindestens 3 mol% DAG den Spontaneinbau in Liposomen der *E. coli* Phospholipide.

Wurde die Translokation des im periplasmatischen Bereich negativer geladene M13 procoat H5EE in diese „undichten“ Liposomen untersucht, so zeigte sich, dass H5EE zwar ebenfalls spontan in Liposomen ohne DAG inserierte, jedoch mit geringerer Effizienz als H5 (siehe

## Diskussion

Abb69). Der spontane Einbau in Liposomen konnte schon durch die Zugabe von 1% an DAG effizient verhindert werden, mit 3%, 4% und 5% war keine spontane Insertion in Liposomen mehr detektierbar. Mit Zunahme der DAG-Konzentration wurde aber auch die Insertions-effizienz in YidC-Proteoliposomen vermindert. Wurden in *E. coli*-Proteoliposomen ohne DAG noch ca. 50% inseriert (bei einer Bindungsrate von je ca. 80%), so reduzierte sich die Translokationseffizienz von H5EE mit 3%, 4% und 5% DAG auf durchschnittlich 30% ohne und 40% mit Potential. Vermutlich ist die geringere Spontaninsertion von H5EE im Vergleich zu H5 auf die stärkere Ladung im periplasmatischen Bügel zurückzuführen. Je stärker der zu translozierende Bereich geladen ist, desto weniger kann er spontan transportiert werden. Das YidC- und vom Membranpotential abhängige Protein Pf3 coat wird spontan in Liposomen inseriert, wenn kein DAG vorhanden ist (Schönbauer, 2011). Durch die Zugabe von mindestens 4% DAG konnte auch dieser Spontaneinbau verhindert werden.

Verwendet man hingegen Liposomen, die anstelle von DAG **Triacylglycerin** (TAG) enthalten, konnte gezeigt werden, dass diese Liposomen durch die Veränderung der Integrität der Bilayerstruktur den Spontaneinbau stärker unterbinden können (Kawashima *et al.*, 2008). Auch sind die Länge und die Struktur der Acylkette des DAG von Bedeutung. Eine Kettenlänge der Fettsäuren von mehr als acht C-Atomen erweisen sich hierbei als notwendig. DAG beeinflusst zusätzlich den lateralen Druck der Membran (de Boeck & Zidovetzki, 1992), der aber nicht von der Kugelform des Liposoms herrührt, wenn gleich eine vermehrte Biegung der Liposomen den Druck auf die Oberfläche erhöht. Spontaneinbau in Liposomen könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Phospholipide in der Membran einen thermodynamisch instabilen Zustand einnehmen können, der einen von außen zugänglichen lipophilen Charakter hervorruft, wodurch der Einbau von hydrophoben Membranproteinen begünstigt wird. Die hydrophilen Kopfgruppen der Phospholipide auf der Oberfläche des Liposoms sind vermutlich genügend weit voneinander entfernt, um einen kegelförmigen Raum zwischen den beiden Monolayern der Membran zu erzeugen. Diesen Freiraum vermag das DAG-Molekül zu füllen, so dass die Membran nach außen versiegelt und spontane Insertion verhindert wird. Dies scheint auch der Grund dafür zu sein, dass kleinere hydrophobe Moleküle, wie Fettsäuren, **Monoacylglycerin** (MAG), aber auch DAG mit kürzeren Acylketten (< 8 C-Atome) es nicht vermögen, den Zwischenraum zu füllen, da sie eine nicht ausreichend große Struktur besitzen (Kawashima *et al.*, 2008).

## **5.7. Die Topologie von rekonstituiertem YidC in Phospholipidvesikel unterschiedlicher Zusammensetzung beeinflusst dessen katalytische Funktion**

In mehreren Arbeiten wurde gezeigt, welche Faktoren die Membrantopologie von Proteinen bestimmen können (Boyd & Beckwith, 1989; Laws & Dalbey, 1989; von Heijne, 1989; Nilsson & von Heijne, 1990; McGovern *et al.*, 1991; zusammengefasst in Boyd & Beckwith, 1990; Dalbey, 1990; von Heijne, 1994). Die „positive inside rule“ (von Heijne, 1986) besagt, dass basische Aminosäurereste an den Randbereichen der Transmembransegmente die Orientierung des Membranproteins bei der Insertion bestimmen. Somit werden die Membranproteine *in vivo* mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% (von Heijne, 1992) gemäß dieser Regel mit den positiv geladenen Aminosäureresten ins Cytoplasma ragend inseriert. Bei der Rekonstitution *in vitro* kann die Topologie von Membranproteinen wie YidC auch durch die Zusammensetzung der Membran beeinflusst werden. In Liposomen der *E. coli* Extrakte baut das YidC bevorzugt in der cytoplasmic-out-Orientierung ein, welcher der aktiven Topologie von YidC *in vivo* entspricht (Serek *et al.*, 2004). In Liposomen, welche aus Lipiden aus einem *E. coli* Extrakt isoliert wurden, wurde das Protein wie zu erwarten war, funktionell aktiv inseriert (siehe Abb58). Die Detektion eines 42 kDa-Fragmentes ermöglichte die Bestimmung der aktiven Orientierung des rekonstituierten YidC in Lipidvesikel. Dieses Protease-resistente Fragment konnte auch nach Trypsin-Behandlung von invertierten Membranvesikeln detektiert werden (Koch *et al.*, 2002). Wurden hingegen Lipidvesikel aus verschiedenen Prozentsätzen von 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) (DOPG), 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidyl-ethanolamin (DOPE) und 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC) eingesetzt, so wurde deutlich, dass die Orientierung von rekonstituiertem YidC verändert werden konnte (Stiegler, 2004). Die Lipidzusammensetzung der Membran ist für die Topologie des rekonstituierten YidC-Proteins entscheidend und scheint die Insertasefunktion zu beeinflussen. Erstaunlicherweise wird die Topologie von YidC umgekehrt, wenn die Vesikel aus 25% Phosphatidylglycerin (PG) und 75% Phosphatidylethanolamin (PE) bestehen (Stiegler, 2004). YidC war in Vesikeln aus 25% DOPG, 75% DOPE in der aktiven cytoplasmic-out-Orientierung zu mindestens 40% detektierbar (Winterfeld *et al.*, 2009). Diese Lipidzusammensetzung ähnelt jedoch der in *E. coli*, bei der die innere Membran zu 20% aus PG, zu 75% aus PE und zu 5% aus Cardiolipin (CL) besteht (Ridder *et al.*, 2001). Das PE zählt zu den zwitterionischen Lipiden und bildet durch seine kleine Kopfgruppe keine Lipiddoppelschicht aus. Es scheint großen Einfluss auf die Orientierung von YidC *in vitro* zu nehmen. Möglicherweise ist die Lipidzusammensetzung und die Lipidanordnung

## Diskussion

im Liposom anders als die in der Zellmembran, wodurch die Membraninsertion beeinflusst werden kann (Ridder *et al.*, 2000, 2001). Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Lipid DOPE ist für die Sec-abhängige Translokation essentiell (Rietveld *et al.*, 1995), allerdings ist der direkte Effekt auf den Translokationsprozess unbekannt. Die invertierte Topologie von YidC durch einen hohen Prozentsatz an PE führte zu einer Reduktion der Aktivität der Insertase, wodurch M13 procoat H5 nicht mehr so effizient in die Proteoliposomen eingebaut werden konnte. Die Effizienz der Insertion in Proteoliposomen aus 25% DOPG und 75% DOPE war durch die invertierte Topologie von YidC vermindert, aber nicht blockiert (siehe Abb79). Es scheinen nur wenige YidC-Moleküle in der aktiven Orientierung ausreichend zu sein, um die Insertion von Membranproteinen zu ermöglichen. Das Vorhandensein eines stabilen Membranpotentials (siehe Abb76) verbesserte hierbei die Translokationsrate nicht. Auch 3L-4N Pf3 wird nur effizient in Liposomen mit 25% DOPE inseriert, bei höheren Konzentrationen an PE sinkt die Translokationsrate jedoch deutlich (Ridder *et al.*, 2001). Eine für die YidC-Rekonstitution günstige Lipidzusammensetzung war 25% PG und 75% PC (80% cytoplasmic-out-Orientierung). Die Translokationsrate war vergleichbar mit den Proteoliposomen, die YidC jeweils zu mehr als 75% in der cytoplasmic-out-Orientierung rekonstituierten (siehe Abb79). Ein stabiles Membranpotential (siehe Abb76) hatte jeweils stimulierende Wirkung auf die Insertionseffizienz.

Erstaunlicherweise wurde das Protein M13 procoat H5 in Proteoliposomen aus 25% DOPG, 10% DOPE und 65% DOPC nur sehr ineffizient eingebaut. Auch ein stabiles Membranpotential (siehe Abb76) vermochte die Insertion von H5 nicht zu ermöglichen. Möglicherweise ist bei dieser Lipidzusammensetzung die YidC-Topologie umgekehrt, wodurch die Insertaseaktivität vermindert wird. Normalerweise sollte das zwitterionische DOPC als Bilayerlipid, wie auch das Lipid DOPG, welches negativ geladen ist, die Bildung von Lipiddoppelschichten fördern und somit die richtige Orientierung begünstigen. Allgemein fördern anionische Lipide sowohl die Sec-abhängige (de Vrije *et al.*, 1988; Kusters *et al.*, 1991, 1994; van der Does *et al.*, 2000) als auch Sec-unabhängige Translokation von zum Beispiel M13 procoat (Gallusser & Kuhn, 1990; Kusters *et al.*, 1994; Soekarjo *et al.*, 1996). M13 procoat wird effizient zum maturen Coatprotein prozessiert, wenn hohe Konzentrationen an sauren Phospholipiden wie Phosphatidylglycerin in der Membran vorhanden sind (Kusters *et al.*, 1994). Dies erklärt ebenfalls, dass basische Aminosäurereste in der Signalsequenz von Procoat essentiell sind für eine effiziente Insertion des Proteins (Gallusser & Kuhn, 1990). Vermutlich binden die positiv geladenen Aminosäurereste der Signalsequenz an die negativ geladenen Kopfgruppen der Phospholipide in der Membran. Lipidvesikel, welche zu 100% aus DOPC bestehen, bauen das YidC mit einer Wahrscheinlichkeit von ca. 80% in der cytoplasmic-out-Orientierung ein (Winterfeld *et al.*, 2009). Erstaunlicherweise wird aber das vom Membranpotential und YidC unabhängige 3L-4N Pf3 coat-Protein in Liposomen aus reinem DOPC nur zu 20% inseriert, während es bei einer

## Diskussion

Zusammensetzung von 25% DOPC und 75% DOPG zu 50% in die Membran eingebaut wird (Ridder *et al.*, 2001). Das Protein 3L-4N-Pf3 coat, welches durch drei zusätzliche Leucinreste im Transmembranbereich hydrophober ist, wird in 100% DOPC-Liposomen ähnlich effizient inseriert wie in Liposomen aus 25% DOPG und 75% DOPE (Ridder *et al.*, 2000). Betrachtet man die Ergebnisse des YidC-unabhängigen Pf3-Proteins, so deutet dies darauf hin, dass die Translokationseffizienz von Pf3 coat nicht unbedingt nur von der Lipidzusammensetzung beeinflusst wird. Die für die Membraninsertion von 3L-4N kompetenteste Lipidkomposition war 75% PC und 25% CL (Ridder *et al.*, 2001), was eigentlich eine effiziente Translokation von M13 procoat in Liposomen mit hohem PC-Gehalt erwarten ließe. Die Translokationsrate von H5 in reine DOPC-Vesikel war jedoch nicht deutlich effizienter als in die anderen Lipidkompositionen, jedoch war das Vorhandensein von YidC für den Einbau notwendig (siehe Abb79).

Allgemein scheinen anionische Phospholipide die Translokation zu stimulieren, jedoch ist die Konzentration des entsprechenden Lipids von dessen Höhe der negativen Nettoladung abhängig. Je stärker die Ladung des Lipids, desto weniger davon wird benötigt (Ridder *et al.*, 2001). Somit ist weniger Cardiolipin nötig als PG alleine, da CL zwei negativ geladene PG-Moleküle enthält. Die beiden Phospholipide PG und CL ermöglichen, aufgrund ihrer verglichen mit der von PE größeren Kopfgruppen und stärkeren negativen Ladung, eine eher lose gepackte Membranoberfläche (de Kruijff *et al.*, 1997). Der stimulierende Effekt der negativ geladenen Phospholipide kann auf der Beeinflussung der Translokase beruhen oder aber auf der verbesserten Bindung der Proteine an die Membran aufgrund der verstärkten elektrostatischen Interaktion der anionischen Lipide und der positiv geladenen Reste des Proteins wie im Beispiel M13 procoat (DeVrije *et al.*, 1988; Gallusser & Kuhn, 1990; Kusters *et al.*, 1991; Soekarjo *et al.*, 1996).

Eine frühere Studie hat sich mit der Interaktion von positiv geladenen cytoplasmatischen Bereichen der Membranproteine mit den Kopfgruppen von anionischen Phospholipiden beschäftigt (van Klompenburg *et al.*, 1997). Die Erhöhung der anionischen Lipide in Liposomen begünstigt die Translokation von leicht positiv geladenen Bereichen (Ridder *et al.*, 2001). PE wird für die korrekte Konformation und die aktive Transportfunktion der Lactose Permease LacY (Bogdanov *et al.*, 2002) und Phenylalanin Permease PheP (Zhang *et al.*, 2003) benötigt. In Zellen, denen PE fehlt, wird der negativ geladene Transmembranbereich VII (Kaback *et al.*, 2001) des mehrspännigen LacY nicht transmembran in die Membran eingebaut. *In vitro* kann diese inkorrekte Topologie durch PE wieder rückgängig gemacht werden, nicht jedoch durch die Phospholipide PG, CL oder dem in *E. coli* unbekanntem PC (Wang *et al.*, 2002). In Liposomen bestehend aus PE oder PC wird LacY richtig orientiert inseriert, nicht jedoch in solche aus PG und CL. Die beiden Phospholipide PE und PC unterscheiden sich hingegen darin, dass PE Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, Protonenaustausch durchführen, aber keinen Bilayer

formen kann. Das könnte der Grund dafür sein, dass LacY in PC-Liposomen zwar richtig eingebaut wird, die Transportfunktion jedoch nicht unterstützt wird. PE scheint eine aktive Rolle in der Bestimmung der Topologie von Membranproteinen zu spielen, entweder während des beginnenden Einbaus in die Membran oder eher dynamisch nach der Membraninsertion. Das Fehlen von PE könnte die negative Ladung an der Membranoberfläche verstärken und somit die Translokation über die Membran begünstigen (Krishtalik & Cramer, 1995). Die Länge der Lipidseitenketten spielen ebenfalls eine Rolle bei der effizienten Insertion von Membranproteinen, da hier durch die Membrandicke vorgegeben wird (Ridder *et al.*, 2002). Aber auch die Hydrophobizität und die Länge der hydrophoben Bereiche der Transmembrandomänen von Membranproteinen bestimmen, in welche Bilayer ein Protein effizient inseriert werden kann.

## 5.8. Der Translokationsvorgang von M13 procoat kann

### mithilfe von Einzelmoleküldetektion untersucht werden

Die Insertion von Proteinen in die Membran kann über verschiedene Translokationswege ablaufen. Die meisten Membranproteine werden mithilfe der Translokase SecYEG und der Insertase YidC in die Lipiddoppelschicht der cytoplasmatischen Membran integriert (Dalbey & Kuhn, 2004; Rapoport, 2007). Das Haupthüllprotein M13 procoat des Bakteriophagens M13 wird Sec-unabhängig (Wolfe *et al.*, 1985; Kuhn, 1988), mithilfe von YidC (Samuelson *et al.*, 2000) und dem Membranpotential (Date *et al.*, 1980; Zimmermann *et al.*, 1982; Kuhn *et al.*, 1990; Cao *et al.*, 1995) in die Membran inseriert. Dieser Prozess kann *in vitro* untersucht werden, indem gereinigtes YidC-Protein in *E. coli* Lipide rekonstituiert und die Vesikel mit einem Membranpotential versehen werden. Die Proteine M13 procoat H5 bzw. H5EE zeigten effiziente Insertion in YidC-Proteoliposomen des *E. coli* Polarextraktes mit Membranpotential, wurden hingegen nicht in Liposomen ohne YidC eingebaut (siehe Abb63, B bzw. C). Um den Membraneinbau von M13 procoat zu untersuchen, kann der Insertionsvorgang mit fluoreszenzmarkiertem Protein verfolgt werden.

Die zu untersuchenden Proteine wurden zunächst mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen. Ein einzelnes Cystein wurde an der Position +13 durch Substitution im periplasmatischen Bügel der M13 procoat-Sequenz eingebracht (siehe Abb80). Das Cystein war für die Fluoreszenzmarkierung mit dem Farbstoff Atto520-maleimid notwendig. Die Proteine Procoat H5-M13C und H5EE-M13C wurden mittels IMAC gereinigt und mit dem Fluoreszenzfarbstoff Atto520-maleimid markiert. Die Translokationseffizienz der Proteine Procoat H5-M13C und H5EE-M13C wurde in Liposomen bzw. YidC-Proteoliposomen aus 100% DOPC überprüft (siehe Abb83). Beide Proteine zeigten nach Inkubation mit Proteinase K (Spur 4) Insertion in YidC-

## Diskussion

Proteoliposomen, während bei den Liposomen kein vor dem Verdau geschütztes Protein detektierbar war (Spur 4). Die verwendeten Vesikel bestanden zu 100% aus dem semi-synthetischen Lipid 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC), die Membranintegrität der Vesikel wurde mittels Messung des Membranpotentials überprüft (siehe Abb82). Die Translokation des periplasmatischen Loops der Proteine Procoat H5-M13C und H5EE-M13C über die Membran fand somit in Anwesenheit von YidC effizient statt.

Die Membraninsertion in Liposomen und YidC-Proteoliposomen wurde durch Einzelmolekülmessungen mittels eines konfokalen Mikroskops untersucht. Zunächst wurde die Diffusionszeit des mit dem Farbstoff Atto520-maleimid markierten Proteins bestimmt (siehe Abb85), indem die Zeit gemessen wurde, die das Protein benötigt, um das Fokalvolumen zu durchqueren. Hierfür wurde auf Einzelmolekülniveau verdünntes Protein mit Puffer A\* versetzt und auf den Objektträger des Mikroskops gegeben. Ein einzelner, gepulster 488 nm Laserstrahl wurde auf das konfokale Volumen (10 fl) fokussiert und die Photonenbursts aufgenommen (Düser *et al.*, 2008 und 2009). Die für das M13 procoat gemessene Diffusionszeit  $\tau_D$  betrug 1,575 ms, während ein YidC-Proteoliposom mit gebundenem Protein 94,57 ms benötigte, um das fokale Volumen des Mikroskops zu passieren. Somit war ein erster Hinweis gegeben, dass das Protein an das Proteoliposom binden kann. Das (Proteo-) Liposom wird nur als Photonenburst sichtbar, wenn ein farbstoffmarkiertes Protein an dieses gebunden hatte. Die 100% DOPC-Vesikel selbst besitzen keine detektierbare Eigenfluoreszenz. Die Diffusionszeit nahm aufgrund des größeren hydrodynamischen Radius des Vesikels mit Protein zu (siehe Abb85 und Abb87 C und D) im Vergleich zum Protein alleine (siehe Abb85 und Abb87 A und B). Diese Erkenntnis war eine Voraussetzung für die kommenden Messungen, denn es wurden nur Photonenbursts durch das automatische Programm „Burst Analyzer“ (Zarrabi *et al.*, 2009) als Vesikel gewertet, welche eine Mindestdauer von 50 ms überschritten (maximal. 200 ms). Als weiteres Auswahlkriterium für die Wertung eines Photonenbursts wurde die Fluoreszenzintensität bewertet, welche bei mindestens 40 kcounts pro Sekunde lag und eine maximale Intensität von 200 kcounts aufwies (siehe Abb87, C und D). Somit konnte gezeigt werden, dass nur ein einzelnes mit Atto markiertes Procoatprotein an ein (Proteo-) Liposom gebunden hatte. Die Detektion von Photonenbursts konnte zeigen, dass beide Procoatproteine H5-M13C und H5EE-M13C sowohl an Liposomen als auch an die Proteoliposomen binden konnten. Die Bindungseffizienz wurde durch das Vorhandensein von YidC verbessert (vergleiche Abb88 mit Abb89 und Abb90 mit Abb91).

Kurz nach der Zugabe von gereinigtem und markiertem Procoat H5-M13C-Protein zu den YidC-Proteoliposomen nahm die Anzahl an langen Bursts zu (siehe Abb89 A und C). Dieser Effekt konnte durch das Vorhandensein eines Membranpotentials (MP) noch verstärkt werden (C), da

## Diskussion

die Bindung von H5-M13C an die Proteoliposomen ohne Membranpotential (A) nach ca. 3 min abgeschlossen war, mit Potential hingegen schon nach ca. 2 min. Wurde die Quenchbarkeit von freiem, mit Atto markiertem Procoat H5-M13C durch die Zugabe von 200 mM Kaliumiodid überprüft, so wurden mindestens 87% des Fluoreszenzsignals des Proteins gequencht (siehe Abb84). Diese Quenchingrate konnte allerdings gebunden an (Proteo-) Liposomen nicht erreicht werden. Das Fluoreszenzsignal des an ein Liposom gebundenen H5-M13C-Proteins wurde nur zu ca. 42% (-MP) bzw. zu 17% (+MP) gelöscht, so dass zwischen Bindung und Einbau auch mit 200 mM Kaliumiodid nicht eindeutig unterschieden werden konnte (siehe Abb86). Die Insertion von H5-M13C in YidC-Proteoliposomen sollte durch die Zugabe von KI überprüft werden. Auch hier war zu beobachten, dass die Fluoreszenz nur teilweise gequencht wurde. Vermutlich wurde das Protein in die Vesikelmembran inseriert, möglich ist aber auch, dass das Protein nicht transloziert war und wie bei den Liposomen die Fluoreszenz aus sterischen Gründen nicht gequencht wurde. Der Fluorophor Atto520-maleimid, welcher sich am periplasmatischen Bügel der Procoatproteine befand, könnte möglicherweise dicht an die Oberfläche der Liposomenmembran gebunden vorliegen oder ins Innere des Vesikels transloziert worden sein, wodurch er für den Quencher Kaliumiodid nicht zugänglich war. Die Bindung von H5 an Liposomen (siehe Abb88 A und C) verlief deutlich ineffizienter mit ca. 5 Ereignissen in zehn 30 Sekunden-Messungen im Vergleich zu ca. 20 mit Proteoliposomen. Wurden die Bursts in Anwesenheit von Kaliumiodid analysiert, so wurde eine geringe Anzahl (ca. 5 Ereignisse in zehn Messungen) an Photonenbursts detektiert (siehe Abb88 B und D). Dies könnte darauf hindeuten, dass das Fluoreszenzsignal von Atto-markiertem H5-M13C mit Liposomen nicht ausreichend quenchbar war. Ein stabiles Membranpotential konnte gemessen werden (siehe Abb82), weshalb Spontaninsertion in die 100% DOPC-Liposomen verhindert werden sollte. Eine spontane Insertion in 100% DOPC-Liposomen war auch im Tricin-SDS-PAGE nicht feststellbar (siehe Abb83). Eine eindeutige Aussage über die Insertion von Procoat H5-M13C in 100% DOPC-Vesikel mittels der Einzelmolekülmessung war hierdurch nicht möglich, da die Unterscheidung zwischen Bindung und Einbau nicht eindeutig war.

Das im periplasmatischen Bügel stärker negativ geladene Protein Procoat H5EE-M13C (Nettoladung -5) zeigte ebenfalls bei den Einzelmolekülmessungen geringe Quenchbarkeit des Farbstoffs Atto520-maleimid. Wie bei H5-M13C waren nach der Zugabe von Kaliumiodid weiterhin Photonenbursts messbar (siehe Abb90, B und D). Diese wiesen nicht auf einen Einbau in die Liposomen hin, da in den Translokationsexperimenten mittels Tricin-SDS-PAGE kein proteasegeschütztes H5EE-M13C-Protein detektierbar war (siehe Abb83). In den Einzelmolekülmessungen verlief die Bindung des Proteins bedingt durch das Membranpotential (C) schneller und effizienter an Liposomen als ohne Potential (A). Ohne Potential war die Bindung nach 2 min abgeschlossen, während sie mit Potential unmittelbar von statten ging. Der



## Diskussion

Fluoreszenzfarbstoff befand sich am Cystein +13 im periplasmatischen Loop, welcher durch die Insertion ins Innere des Vesikels transloziert wurde bzw. an dessen Oberfläche gebunden vorlag und eventuell für den Quencher nicht erreichbar war. Die Quenchbarkeit von freiem, mit Atto520 markiertem H5EE-M13C-Protein (ohne Liposomen) lag zwar bei über 93%, wohingegen die Fluoreszenz in Anwesenheit von Liposomen wie bei H5-M13C ineffizienter (nur zu ca. 8% -MP und zu 6% +MP) gelöscht wurde. Wurde dem Experiment 200 mM Kaliumiodid zugegeben, um die Fluoreszenzsignale der eventuell nur gebundenen Proteine zu quenchen, so wurde ersichtlich, dass das Quenching unzureichend war und nahezu alle gebundenen H5EE-M13C-Proteine auch in Abwesenheit von YidC als Burst sichtbar blieben (siehe Abb90 B und D). Dies erscheint verwunderlich, da das Protein H5EE, wie das wildtypische H5, von YidC abhängig ist (Samuelson *et al.*, 2001). Die Ergebnisse der Einzelmolekülmessungen waren auch mit dem Protein Procoat H5EE-M13C nicht zu deuten, denn auch dieses Protein zeigte kaum Quenching in Liposomen ohne die Insertase YidC. Es waren nach Zugabe von 200 mM Kaliumiodid noch immer Photonenbursts detektierbar. Es könnten eventuell weitere Messungen durchgeführt werden, nachdem die Quenchbarkeit des Proteins auch gebunden an Vesikel optimiert wurde. Man könnte an einer anderen Stelle des periplasmatischen Loops (zum Beispiel Position +12) eine Cysteinmutation einbringen und das Experiment wiederholen. Eine fehlerhafte Membranintegrität der 100% DOPC-Vesikel während der Einzelmolekülmessungen kann ausgeschlossen werden. Vergleichbare Messungen mit Pf3 coat (Schönbauer, 2011) konnten zeigen, dass keine Spontaninsertion mit Pf3 coat in 100% DOPC-Liposomen stattfinden kann. Das kleine ca. 5 kDa große, einspännige Phagenprotein Pf3 coat wird Sec-unabhängig (Rohrer & Kuhn, 1990; Kiefer & Kuhn, 1999) mit der Hilfe von YidC (Chen *et al.*, 2002) in die Membran inseriert. Einzelmolekülmessungen von wildtypischem Pf3 coat-Protein mit demselben Setup des konfokalen Mikroskops konnten zeigen, dass das Protein nur in Anwesenheit von YidC in die Proteoliposomen inserieren konnte, nicht aber in Liposomen. Die direkte Bindung von gereinigtem Pf3 coat-Protein an in Dodecylphosphocholin solubilisiertem YidC wurde schon von Gerken und Mitarbeitern (2008) gezeigt. Das 53 Aminosäuren lange Protein 3L-Pf3, welches *in vivo* wie auch *in vitro* YidC-unabhängig in die Membran eingebaut wird (Kiefer & Kuhn, 1999; Ridder *et al.*, 2001), konnte unabhängig von YidC in der Membran detektiert werden.

## 6. Zusammenfassung

Die Translokation von Proteinen über und in die Cytoplasmamembran von *Escherichia coli* kann über verschiedene Mechanismen bewerkstelligt werden. Die zelluläre Sekretionsmaschinerie, die Translokase SecYEG, transportiert mithilfe der ATPase SecA große ungefaltete Proteine ins Periplasma oder leitet Membranproteine an die Insertase YidC weiter. Die Membraninsertion wird von YidC katalysiert, wodurch die native Konformation der Proteine in der Lipiddoppelschicht erreicht wird. Die Translokation einiger weniger Membranproteine verläuft Sec-unabhängig nur mithilfe der Insertase YidC. Eines dieser Sec-unabhängigen Proteine stellt das Haupthüllprotein des Bakteriophagens M13 dar. Dieses Protein wird als Präprotein, genannt M13 procoat, mit der Orientierung  $N_{in}\text{-}C_{in}$  in die innere Membran inseriert und besitzt eine zentrale Loop-Domäne im Periplasma. Dieser Vorgang wird vom elektrochemischen Membranpotential und YidC katalysiert. Anschließend wird das M13 procoat durch die Leaderpeptidase zu seiner maturen Form, M13 coat (Orientierung  $N_{out}\text{-}C_{in}$ ), prozessiert.

Die vorliegende Arbeit befasst sich anhand des Modellproteins M13 procoat und M13 procoat-Mutanten mit der Analyse der verschiedenen Transportsysteme der inneren Membran. Eine Mutante ist das Procoat H5EE, welches zwei zusätzliche saure Aminosäurereste zwischen Position +2 und +3 besitzt. Die Insertion dieser Mutante benötigt die Sec-Translokase und ist strikt vom Membranpotential abhängig. Die Membraninsertion von M13 procoat und abgeleiteten Proteinen in die cytoplasmatische Membran wurde in einem *in vitro*-Rekonstitutions- und Translokationssystem untersucht. Hierfür wurden die einzelnen Komponenten der Sec-Translokase (SecYEG und SecA), die Insertase YidC, sowie die verschiedenen Procoatproteine gereinigt und in dem *in vitro*-Translokationssystem eingesetzt. Die Rekonstitution von YidC in Phospholipidvesikel erfolgte abhängig von der Lipidzusammensetzung der Membran. Die cytoplasmic-out-Orientierung entspricht der aktiven Topologie in *E. coli* mit den Termini im Cytoplasma. Einige Lipidkompositionen verursachten die Inversion der Orientierung, wodurch die katalytische Aktivität der Insertase beeinträchtigt wurde.

Die Procoatmutanten H5 und H5EE wurden nur in Anwesenheit von rekonstituiertem YidC in die Membran inseriert. Beide Proteine inserierten effizient in die Vesikel mit den Termini nach außen und dem periplasmatischen Loop im Inneren der Vesikel, wie die Mutante PClep von Procoat H5 mit dem C-terminalen Teil der Leaderpeptidase. Spontaninsertion in Liposomen fand nur in undichte Vesikel aus *E. coli* Lipiden statt. Die Membranintegrität konnte durch die Zugabe einer ausreichenden Menge an Diacylglycerin (DAG) zu den Phospholipiden verhindert werden. Undichte Phospholipide konnten durch das Zufügen von 3-4% DAG repariert werden. Die

## Zusammenfassung

Proteine H5 und H5EE zeigten auch *in vitro* eine Abhängigkeit vom Membranpotential. Sie wurden effizienter in YidC-Proteoliposomen inseriert, wenn ein stabiles Membranpotential vorhanden war. Proteoliposomen mit rekonstituierter SecYEG-Translokase wurden ebenfalls auf Proteininsertion getestet. Erstaunlicherweise inserierte das Protein M13 procoat H5EE effizient in SecYEG-Proteoliposomen, nicht aber das wildtypische H5-Protein.

## 7. Summary

Translocation of proteins across or into the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* is accomplished by several mechanisms. The cellular secretion machinery, the translocase SecYEG, mediates the transport of unfolded proteins into the periplasm with the help of the ATPase SecA or passes the membrane proteins for bilayer integration to the insertase YidC. Membrane insertion is catalysed by YidC, whereby the native conformation of the proteins in the lipid bilayer is achieved. The translocation of a few membrane proteins occurs Sec-independently solely with the help of the insertase YidC. One of these Sec-independent proteins is the major capsid protein of the bacteriophage M13. This protein is inserted as preprotein, termed M13 procoat, with the orientation  $N_{in}-C_{in}$  into the inner membrane and a central loop domain located in the periplasm. This process is catalysed by the electrochemical membrane potential and YidC. M13 procoat is then processed by the leader peptidase to its mature form, M13 coat (orientation  $N_{out}-C_{in}$ ).

In the present thesis an analysis of the different transport systems of the inner membrane is performed using the example of the M13 procoat protein and its mutants. One mutant is the procoat H5EE which has 2 additional acidic residues introduced between residues +2 and +3. The insertion of this mutant requires the Sec translocase and strictly depends on the electrochemical potential. Membrane insertion of M13 procoat and derived proteins into the cytoplasmic membrane was followed in an *in vitro* reconstitution and translocation system. Therefore, all components of the Sec translocase (SecYEG and SecA), the insertase YidC and the different procoat proteins were purified and tested with the *in vitro* translocation system. Reconstitution of YidC into phospholipid vesicles depended on the lipid composition for its orientation. The cytoplasmic-out orientation corresponds to the active topology in *E. coli* where both termini are located in the cytoplasm. Certain lipid compositions caused the inversed orientation, which affected the catalytic activity of the reconstituted insertase.

The procoat mutants H5 and H5EE were membrane inserted only in the presence of reconstituted YidC. Both proteins inserted efficiently into the vesicles with the periplasmic loop in the interior of the vesicles like the mutant PClep of procoat H5 with the C-terminal extension of the leader peptidase. Spontaneous insertion of H5 and H5EE into liposomes occurred only into leaky vesicles of the *E. coli* lipids. The membrane integrity was improved by the addition of an adequate amount of diacylglycerol (DAG) to the phospholipids. The leaky phospholipids were sealed by the addition of 3-4% DAG. The proteins H5 and H5EE showed a dependency of the membrane potential. Insertion occurred more efficiently into YidC proteoliposomes when a stable membrane potential was generated. Proteoliposomes with reconstituted SecYEG

## Summary

translocase were also tested for protein insertion. Remarkably, the protein M13 procoat H5EE efficiently inserted into SecYEG proteoliposomes, where the wildtype-like protein H5 did not.

## 8. Literaturverzeichnis

Ahrem B, Hoffschulte HK, and Müller M (1989) In vitro membrane assembly of a polytopic, transmembrane protein results in an enzymatically active conformation. *J. Cell Biol.* **108(5)**, 1637-1646

Akita M, Sasaki S, Matsuyama S, and Mizushima S (1990) SecA interacts with secretory proteins by recognizing the positive charge at the amino terminus of the signal peptide in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265(14)**, 8164-8169

Akiyama Y, and Ito K (1987) Topology analysis of the SecY protein, an integral membrane protein involved in protein export in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **6(11)**, 3465-3470

Alami M, Luke I, Deitermann S, Eisner G, Koch HG, Brunner J, and Müller M (2003) Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in *Escherichia coli*. *Mol. Cell* **12(4)**, 937-946

Ames BN (1966) Assay of inorganic phosphates, total phosphate and phosphatase. *Methods Enzymol.* **8**, 115-118

Andersson H, and von Heijne G (1993) Sec dependent and Sec independent assembly of *E. coli* inner membrane proteins: the topological rules depend on chain length. *EMBO J.* **12(2)**, 683-691

Angelini S, Deitermann S, and Koch HG (2005) FtsY, the bacterial signal-recognition particle receptor, interacts functionally and physically with the SecYEG translocon. *EMBO Rep.* **6(5)**, 476-481

Apell HJ, and Bersch B (1987) Oxonol VI as an optical indicator for membrane potentials in lipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.* **903(3)**, 480-494

Baars L, Wagner S, Wickström D, Klepsch M, Ytterberg AJ, van Wijk KJ, and de Gier JW (2008) Effects of SecE depletion on the inner and outer membrane proteomes of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **190(10)**, 3505-3525

Bakker EP, and Randall LL (1984) The requirement for energy during export of beta-lactamase in *Escherichia coli* is fulfilled by the total protonmotive force. *EMBO J.* **3(4)**, 895-900

Bassford PJ Jr (1990) Export of the periplasmic maltose-binding protein of *Escherichia coli*. *J. Bioenerg. Biomembr.* **22(3)**, 401-439

## Literaturverzeichnis

Baud C, Karamanou S, Sianidis G, Vrontou E, Politou AS, and Economou A (2002) Allosteric communication between signal peptides and the SecA protein DEAD motor ATPase domain. *J. Biol. Chem.* **277(16)**, 13724-13731

Baud C, Papanikou E, Karamanou S, Sianidis G, Kuhn A, and Economou A (2005) Purification of a functional mature region from a Sec-dependent preprotein. *Protein Expr. Purif.* **40(2)**, 336-339

Bauer M, Behrens M, Esser K, Michaelis G, and Pratje E (1994) PET1402, a nuclear gene required for proteolytic processing of cytochrome oxidase subunit 2 in yeast. *Mol. Gen. Genet.* **245(3)**, 272-278

Bauer BW, and Rapoport TA (2009) Mapping polypeptide interactions of the SecA ATPase during translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106(49)**, 20800-20805

Beck K, Eisner G, Trescher D, Dalbey RE, Brunner J, and Müller M (2001) YidC, an assembly site for polytopic Escherichia coli membrane proteins located in immediate proximity to the SecYE translocon and lipids. *EMBO Rep.* **2(8)**, 709-714

Beck K, Wu LF, Brunner J, and Müller M (2000) Discrimination between SRP- and SecA/SecB-dependent substrates involves selective recognition of nascent chains by SRP and trigger factor. *EMBO J.* **19(1)**, 134-143

Beckmann R, Spahn CM, Eswar N, Helmers J, Penczek PA, Sali A, Frank J, and Blobel G (2001) Architecture of the protein-conducting channel associated with the translating 80S ribosome. *Cell* **107(3)**, 361-372

Berks BC (1996) A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol. Microbiol.* **22(3)**, 393-404

Berks BC, Sargent F, and Palmer T (2000) The Tat protein export pathway. *Mol. Microbiol.* **35(2)**, 260-274

Berrier C, Guilvout I, Bayan N, Park K-H, Meseneau A, Chami M, Pugsley AP, and Ghazi A (2011) Coupled cell-free synthesis and lipid vesicle insertion of a functional oligomeric channel MscL. MscL does not need the insertase YidC for insertion in vitro. *Biochem. Biophys. Acta* **1808(1)**, 41-46

Bessoneau P, Besson V, Collinson I, and Duong F (2004) The SecYEG preprotein translocation channel is a conformationally dynamic and dimeric structure. *EMBO J.* **21(5)**, 995-1003

Bogdanov M, Heacock PN, and Dowhan W (2002) A polytopic membrane protein displays a reversible topology dependent on membrane lipid composition. *EMBO J.* **21(9)**, 2107-2116

## Literaturverzeichnis

Bogsch E, Brink S, and Robinson C (1997) Pathway specificity for a delta pH-dependent precursor thylakoid lumen protein is governed by a 'Sec-avoidance' motif in the transfer peptide and a 'Sec-incompatible' mature protein. *EMBO J.* **16(13)**, 3851-3859

Bogsch E, Sargent F, Stanley NR, Berks BC, Robinson C, and Palmer T (1998) An essential component of a novel bacterial protein export system with homologues in plastids and mitochondria. *J. Biol. Chem.* **273(29)**, 18003-18006

Bolhuis A, Bogsch EG, and Robinson C (2000) Subunit interactions in the twin-arginine translocase complex of Escherichia coli. *FEBS Lett.* **472(1)**, 88-92

Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW, Crosa JH, and Falkow S (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2(2)**, 95-113

Bonardi F, London G, Nouwen N, Feringa BL, and Driessen AJM (2010) Light-induced control of protein translocation by the SecYEG complex. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **49(40)**, 7234-7238

Bonnefoy N, Chalvet F, Hamel P, Slominski PP, and Dujardin G (1994) OXA1, a Saccharose cerevisiae nuclear gene whose sequence is conserved from prokaryotes to eukaryotes controls cytochrome oxidase biogenesis. *J. Mol. Biol.* **239(2)**, 201-212

Börsch M, Turina P, Eggeling C, Fries JR, Seidel CA, Labahn A, and Gräber P (1998) Conformational changes of the H<sup>+</sup>-ATPase from Escherichia coli upon nucleotide binding detected by single molecule fluorescence. *FEBS Lett.* **437(3)**, 251-254

Bos MP and Tommassen J (2002) Biogenesis of the Gram-negative bacterial outer membrane. *Curr. Opin. Microbiol.* **7(6)**, 610-616

Boy D and Koch HG (2009) Visualization of distinct entities of the SecYEG translocon during translocation and integration of bacterial proteins. *Mol. Biol. Cell* **20(6)**, 1804-1815

Boyd D and Beckwith J (1989) Positively charged amino acid residues can act as topogenic determinants in membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **86(23)**, 9446-9450

Boyd D and Beckwith J (1990) The role of charged amino acids in the localization of secreted and membrane proteins. *Cell* **62(6)**, 1031-1033

Boyer HW and Roulland-Dussoix D (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* **41(3)**, 459-472



## Literaturverzeichnis

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254

Breukink E, Demel RA, de Korte-Kool G, and de Kruijff B (1992) SecA insertion into phospholipids is stimulated by negatively charged lipids and inhibited by ATP: a monolayer study. *Biochem.* **31(4)**, 1119-1124

Breukink E, Keller RC, and de Kruijff B (1993) Nucleotide and negatively charged lipid-dependent vesicle aggregation caused by SecA. Evidence that SecA contains two lipid-binding sites. *FEBS Lett.* **331(1-2)**, 19-24

Breukink E, Nouwen N, van Raalte A, Mizushima S, Tommassen J, and de Kruijff B (1994) The C terminus of SecA is involved in both lipid binding and SecB binding. *J. Biol. Chem.* **270(14)**, 7902-7907

Breyton C, Haase W, Rapoport TA, Kühlbrandt W, and Collinson I (2002) Three-dimensional structure of the bacterial protein-translocation complex SecYEG. *Nature* **418(6898)**, 662-665

Bruch MD, McKnight CJ, and Gierasch LM (1989) Helix formation and stability in a signal sequence. *Biochem.* **28(21)**, 8554-8561

Brundage L, Hendrick JP, Schiebel E, Driessen AJM, and Wickner W (1990) The purified E. coli integral membrane protein SecY/E is sufficient for reconstitution of SecA-dependent precursor protein translocation. *Cell* **62(4)**, 649-657

Bukau B, Deuerling E, Pfund C, and Craig EA (2000) Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* **101(2)**, 199-122

Bullock WO, Fernandez JM, and Short JM (1987) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with b-galactosidase selection. *Bio Techniques* **5**, 376-378

Cao G, Cheng S, Whitley P, von Heijne G, Kuhn A, and Dalbey RE (1994) Synergistic insertion of two hydrophobic regions drives Sec-independent membrane protein assembly. *J. Biol. Chem.*, **269(43)**, 26898-26903

Cao G, Kuhn A, and Dalbey RE (1995) The translocation of negatively charged residues across the membrane is driven by the electrochemical potential: evidence for an electrophoresis-like membrane transfer mechanism. *EMBO J.* **14(5)**, 866-875

Carrasco S and Mérida I (2006) Diacylglycerol, when simplicity becomes complex. *TRENDS Biochem. Sci.* **32(1)**, 27-36

## Literaturverzeichnis

Celebi N, Yi L, Facey SJ, Kuhn A and Dalbey RE (2006) Membrane biogenesis of subunit II of cytochrome bo oxidase: contrasting requirements for insertion of N-terminal and C-terminal domains. *J. Biol. Chem.* **357(5)**, 1428-1436

Chang NC, Model P, and Blobel G (1979) Membrane biogenesis: cotranslational integration of the bacteriophage f1 coat protein into an Escherichia coli membrane fraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76(3)**, 1251-1255

Chen M, Samuelson JC, Jiang F, Müller M, Kuhn A, and Dalbey RE (2002) Direct interaction of YidC with the Sec-independent Pf3 coat protein during its membrane protein insertion. *J. Biol. Chem.* **277(10)**, 7670-7676

Chen M, Xie K, Nouwen N, Driessen AJM, and Dalbey RE (2003) Conditional lethal mutations separate the M13 procoat and Pf3 coat functions of YidC: different YIDC structural requirements for membrane protein insertion. *J. Biol. Chem.* **278(26)**, 23295-23300

Chen M, Xie K, Yuan J, Yi L, Facey SJ, Pradel N, Wu LF, Kuhn A, and Dalbey RE (2005) Involvement of SecDF and YidC in the membrane insertion of M13 procoat mutants. *Biochem.* **44(31)**, 10741-10749

Clemons WM Jr, Menetret JF, Akey CW, and Rapoport TA (2004) Structural insight into the protein translocation channel. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14(4)**, 390-396

Cline K and Mori H (2001) Thylakoid DeltapH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport. *J. Cell Biol.* **154(4)**, 719-729

Cline K and Theg SM (2007) The Sec and Tat translocation pathways in chloroplasts. *The Enzymes, Molecular Machines Involved in Protein Transport across Cellular Membranes* **25**, 455-485

Collier DN, Bankaitis VA, Weiss JB, and Bassford PJ Jr (1988) The antifolding activity of SecB promotes the export of the E. coli maltose-binding protein. *Cell* **53(2)**, 273-283

Collinson I, Breyton C, Doung F, Tziatzios C, Schubert D, Or E, Rapoport T, and Kühlbrandt W (2001) Projection structure and oligomeric properties of a bacterial core protein translocase. *EMBO J.* **20(10)**, 2462-2471

Cooper DB, Smith VF, Roth HC, Lilly AA, and Randall LL (2008) SecA, the motor of the secretion machine, binds diverse partners on one interactive surface. *J. Mol. Biol.* **282(1)**, 74-87

Cristóbal S, de Gier JW, Nielsen H, and van Heijne G (1999) Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in Escherichia coli. *EMBO J.* **18(11)**, 2982-2990

## Literaturverzeichnis

- Dalbey RE (1990) Positively charged residues are important determinants of membrane protein topology. *TRENDS Biochem. Sci.* **15(7)**, 253-257
- Dalbey RE and Chen M (2004) Sec-translocase mediated membrane protein biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1694(1)**, 37-53
- Dalbey RE and Kuhn A (2000) Evolutionarily related insertion pathways of bacterial, mitochondrial, and thylakoid membrane proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 51-87
- Dalbey RE and Kuhn A (2004) YidC family members are involved in the membrane insertion, lateral integration, folding, and assembly of membrane proteins. *J. Cell Biol.* **166(6)**, 769-774
- Daley DO, Rapp M, Granseth E, Melen K, Drew D, and von Heijne G (2005) Global topology analysis of the Escherichia coli inner membrane proteome. *Science* **308(5726)**, 1321-1323
- Daniels CJ, Bole DG, Quay SC, and Oxender DL (1981) Role for membrane potential in the secretion of protein into the periplasm of Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78(9)**, 5396-5400
- Date T, Goodman JM, and Wickner WT (1980) Procoat, the precursor of M13 coat protein, requires an electrochemical potential for membrane insertion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77(8)**, 4669-4673
- de Boeck H and Zidovetzki R (1992) Interactions of saturated diacylglycerols with phosphatidylcholine bilayers: A 2H NMR study. *Biochem.* **31(2)**, 623-630
- de Gier JW, Scotti PA, Sääf A, Valent QA, Kuhn A, Luirink J, and von Heijne G (1998) Differential use of the signal recognition particle translocase targeting pathway for inner membrane protein assembly in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95(25)**, 14646-14651
- de Gier JW, Valent QA, von Heijne G, and Luirink J (1997) The E. coli SRP: preferences of a targeting factor. *FEBS Lett.* **408(1)**, 1-4
- de Kruijff B (1997) Lipid polymorphism and biomembrane function. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1(4)**, 564-569
- de Leeuw E, Granjon T, Porcelle I, Alami M, Carr SB, Müller M, Sargent F, Palmer T, and Berks B C. (2002) Oligomeric properties and signal peptide binding by Escherichia coli Tat protein transport complexes. *J. Mol. Biol.* **322(5)**, 1135-1146

## Literaturverzeichnis

de Leeuw E, Porcelli I, Sargent F, Palmer T, and Berks BC (2001) Membrane interactions and self-association of the TatA and TatB components of the twin-arginine translocation pathway. *FEBS Lett.* **506(2)**, 143-148

de Leeuw E, te Kaat K, Moser C, Menestrina D, Demel R, de Kruijff B, Oudega B, Luirink J, and Sinning I (2000) Anionic phospholipids are involved in membrane association of FtsY and stimulate its GTPase activity. *EMBO J.* **19(4)**, 531-541

de Vrije T, de Swart RL, Dowhan W, Tommassen J, and de Kruijff B (1988) Phosphatidylglycerol is involved in protein translocation across *Escherichia coli* inner membranes. *Nature* **334(6178)**, 173-175

Deville K, Gold VAM, Robson A, Whitehouse S, Sessions RB, Baldwin SA, Radford SE, and Collinson I (2010) The oligomeric state and arrangement of the active bacterial translocon. *J. Biol. Chem.* **286(6)**, 4659-4669

du Plessis DJ, Berrelkamp G, Nouwen N, and Driessen AJ (2009) The lateral gate of SecYEG opens during protein translocation. *J. Biol. Chem.* **284(23)**, 15805-15814

du Plessis DJ, Nouwen N, and Driessen AJ (2006) Subunit a of cytochrome o oxidase requires both YidC and SecYEG for membrane insertion. *J. Biol. Chem.* **281(18)**, 12248-12252

du Plessis DJ, Nouwen N, and Driessen AJ (2010) The Sec translocase. *Biochim. Biophys. Acta* **1808(3)**, 851-865

Duong F (2003) Binding, activation and dissociation of the dimeric SecA ATPase at the dimeric SecYEG translocase. *EMBO J.* **22(17)**, 4375-4384

Düser MG, Bi Y, Zarrabi N, Dunn SD, and Börsch M (2008) The proton-translocating a subunit of F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase is allocated asymmetrically to the peripheral stalk. *J. Biol. Chem.* **283(48)**, 33602-33610

Düser MG, Zarrabi N, Cipriano DJ, Ernst S, Glick GD, Dunn SD, and Börsch M (2009) 36 degrees step size of proton-driven c-ring rotation in F<sub>o</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase. *EMBO J.* **28(18)**, 2689-2696

Economou A and Wickner W (1994) SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. *Cell* **78(5)**, 835-843

Economou A, Pogliano JA, Beckwith J, Oliver DB, and Wickner W (1995) SecA membrane cycling at SecYEG is driven by distinct ATP binding and hydrolysis events and is regulated by SecD and SecE. *Cell* **83(7)**, 1171-1181

## Literaturverzeichnis

Eisenhawer M, Cattarinussi S, Kuhn A, and Vogel H (2001) Fluorescence resonance energy transfer shows a close helix-helix distance in the transmembrane M13 procoat protein. *Biochem.* **40(41)**, 12321-12328

Enequist HG, Hirst TR, Harayama S, Hardy SJ, and Randall LL (1981) Energy is required for maturation of exported proteins in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **116(2)**, 227-233

Engelman DM and Steitz TA (1981) The spontaneous insertion of proteins into and across membranes: the helical hairpin hypothesis. *Cell* **23(2)**, 411-422

Eytan GD (1982) Use of liposomes for reconstitution of biological functions. *Biochim. Biophys. Acta.* **694(2)**, 185-202

Facey SJ and Kuhn A (2004) Membrane integration of *E. coli* model membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1694(1)**, 55-66

Facey SJ and Kuhn A (2010) Biogenesis of bacterial inner-membrane proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* **67(14)**, 2343-2362

Facey SJ, Neugebauer SA, Krauss S, and Kuhn, A (2007) The mechanosensitive channel protein MscL is targeted by the SRP to the novel YidC membrane insertion pathway of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **365(4)**, 995-1004

Farmery M, Macao B, Larsson T, and Samuelsson T (1998) Binding of GTP and GDP induces a significant conformational change in the GTPase domain of Ffh, a bacterial homologue of the SRP 54 kDa subunit. *Biochim. Biophys. Acta.* **1385(1)**, 61-68

Ferbitz L, Maier T, Patzelt H, Bukau B, Deuerling E, and Ban N (2004) Trigger factor in complex with the ribosome forms a molecular cradle for nascent proteins. *Nature* **431(7008)**, 590-596

Fröderberg L, Houben EN, Baars L, Luirink J, and de Gier JW (2004) Targeting and translocation of two lipoproteins in *Escherichia coli* via the SRP/Sec/YidC pathway. *J. Biol. Chem.* **279(30)**, 31026-31032

Funes S, Kauff F, van der Sluis EO, Ott M, and Herrmann JM (2011) Evolution of YidC/Oxa1/Alb3 insertases: three independent gene duplications followed by functional specialization in bacteria, mitochondria and chloroplasts. *Biol. Chem.* **392(1-2)**, 13-19

Gallusser A and Kuhn A (1990) Initial steps in protein membrane insertion. Bacteriophage M13 procoat protein binds to the membrane surface by electrostatic interaction. *EMBO J.* **9(9)**, 2723-2729

## Literaturverzeichnis

Gelis I, Bonvin AM, Keramisanou D, Koukaki M, Gouridis E, Karamanou S, Economou A, and Kalodimos CG (2007) Structural basis for signal-sequence recognition by the translocase motor SecA as determined by NMR. *Cell* **131(4)**, 756-769

Geller BL and Wickner W (1985) M13 procoat inserts into liposomes in the absence of other membrane proteins. *J. Biol. Chem.* **260(24)**, 13281-13285

Gerken U, Erhardt D, Bär G, Ghosh R, and Kuhn A (2008) Initial binding process of the membrane insertase YidC with its substrate Pf3 coat protein is reversible. *Biochem.* **47(22)**, 6052-6058

Glick BS and von Heijne G (1996) *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria lack a bacterial-type sec machinery. *Protein Sci.* **5(12)**, 2651-2652

Gohlke U, Pullan L, McDevitt CA, Porcelli I, de Leeuw E, Palmer T, Saibil HR, and Berks BC (2005) The TatA component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102(30)**, 10482-10486

Gold VAM, Robson A, Bao H, Romantsov T, Duong F, and Collinson I (2010) The action of cardiolipin on the bacterial translocon. *Biochem.* **107(22)**, 10044-10049

Greenwood J, Hunter GJ, and Perham RN (1991) Regulation of filamentous bacteriophage length by modification of electrostatic interactions between coat protein and DNA. *J. Mol. Biol.* **217(2)**, 223-227

Gu SQ, Peske F, Wieden HJ, Rodnina MV, and Wintermeyer W (2003) The signal recognition particle binds to protein L23 at the peptide exit of the *Escherichia coli* ribosome. *RNA* **9(5)**, 566-573

Hagan CL, Kim S, and Kahne D (2010) Reconstitution of outer membrane protein assembly from purified components. *Science* **328(5980)**, 890-892

Hanada M, Nishiyama K, and Tokuda H (1996) SecG plays a critical role in protein translocation in the absence of the proton motive force as well as at low temperature. *FEBS Lett.* **381(1-2)**, 25-28

Hanein D, Matlack K, Jungnickel B, Plath K, Kalies K, Miller K, Rapoport T, and Akey C (1996) Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation. *Cell* **87(4)**, 721-732

Hanke W and Hanke R (1997) *Methoden der Membranphysiologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin-Oxford

## Literaturverzeichnis

Hardy SJ and Randall LL (1991) A kinetic partitioning model of selective binding of nonnative proteins by the bacterial chaperone SecB. *Science* **251(4992)**, 439-443

Hayachi S and Wu HC (1990) Lipoproteins in bacteria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **22(3)**, 451-471

Hunter GJ, Rowitch DH, and Perham RN (1987) Interactions between DNA and coat protein in the structure and assembly of filamentous bacteriophage fd. *Nature* **327(6119)**, 252-254

Jack RL, Sargent F, Berks BC, Sawers G, and Palmer T (2001) Constitutive expression of *Escherichia coli* tat genes indicates an important role for the twin-arginine translocase during aerobic and anaerobic growth. *J. Bacteriol.* **183(5)**, 1801-1804

Jia L, Dienhart M, Schramp M, McCauley M, Hell K, and Stuart RA (2003) Yeast Oxa1 interacts with mitochondrial ribosomes: the importance of the C-terminal region of Oxa1. *EMBO J.* **22(24)**, 6438-6447

Jiang F, Chen M, Yi L, de Gier JW, Kuhn A, and Dalbey RE (2003) Defining the regions of *Escherichia coli* YidC that contribute to activity. *J. Biol. Chem.* **278(49)**, 48965-48972

Jong WSP and Luirink J (2008) The conserved extension of the Hbp autotransporter signal peptide does not determine targeting pathway specificity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **368(3)**, 522-527

Jong WSP, ten Hagen-Jongman CM, Ruijter E, Orru RVA, Genevaux P, and Luirink J (2010) YidC is involved in the biogenesis of the secreted autotransporter hemoglobin protease. *J. Biol. Chem.* **285(51)**, 39682-39690

Kaback HR, Sahin-Toth M, and Weinglass AB (2001) The kamikaze approach to membrane transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2(8)**, 610-620

Kaiser CM, Chang HC, Agashe VR, Lakshmipathy SK, Etchells SA, Hayer-Hartl M, Hartl FU, and Barral JM (2006) Real-time observation of trigger factor function on translating ribosomes. *Nature* **444(7118)**, 455-460

Karamanou S, Bariami V, Papanikou E, Kalodimos CD, and Economou A (2008) Assembly of the translocase motor onto the preprotein-conducting channel. *Mol. Microbiol.* **70(2)**, 311-322

Karamanou S, Vrontou E, Sianidis G, Baud C, Roos T, Kuhn A, Politou AS, and Economou A (1999) A molecular switch in SecA protein couples ATP hydrolysis to protein translocation. *Mol. Microbiol.* **34(5)**, 1133-1145

## Literaturverzeichnis

- Kato M, Tokuda H, and Mizushima S (1992) In vitro translocation of secretory proteins possessing no charges at the mature domain takes place efficiently in a protonmotive force-dependent manner. *J. Biol. Chem.* **267(1)**, 413-418
- Kaufmann A, Manting EH, Veenendaal AK, Driessen AJ, and van der Does C (1999) Cysteine-directed cross-linking demonstrates that helix 3 of SecE is close to helix 2 of SecY and helix 3 of a neighboring SecE. *Biochem.* **38(28)**, 9115-9125
- Kawashima Y, Miyazaki E, Müller M, Tokuda H, and Nishiyama K (2008) Diacylglycerol specifically blocks spontaneous integration of membrane proteins and allows detection of a factor-assisted integration. *J. Biol. Chem.* **283(36)**, 24489-24496
- Keenan RJ, Freymann DM, Stroud RM, and Walter P (2001) The signal recognition particle. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 755-775
- Kiefer D and Kuhn A (1999) Hydrophobic forces drive the spontaneous membrane insertion of the bacteriophage Pf3 coat protein without topological control. *EMBO J.* **18(22)**, 6299-6306
- Kiefer D, Hu X, Dalbey R, and Kuhn A (1997) Negatively charged amino acid residues play a role in orienting the Sec-independent Pf3 coat protein in the Escherichia coli inner membrane. *EMBO J.* **16(9)**, 2197-2204
- Kihara A, Akiyama Y, and Ito K (1995) FtsH is required for proteolytic elimination of uncomplexed forms of SecY, an essential protein translocase subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92(10)**, 4532-4536
- Kimura E, Akita M, Matsuyama S, and Mizushima S (1991) Determination of a region in SecA that interacts with presecretory proteins in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **266(10)**, 6600-6606
- Klenner C, Yuan J, Dalbey RE, and Kuhn A (2008) The Pf3 coat protein contacts TM1 and TM3 of YidC during membrane biogenesis. *FEBS Lett.* **582(29)**, 3967-3972
- Koch H-G and Müller M (2000) Dissecting the translocase and integrase functions of the Escherichia coli SecYEG translocon. *J. Cell Biol.* **150(3)**, 689-694
- Koch HG, Hengelage T, Neumann-Haefelin C, MacFarlane J, Hoffschulte K, Schimz L, Mechler B, and Müller M (1999) In vitro studies with purified components reveal signal recognition particle (SRP) and SecA/SecB as constituents of two independent protein-targeting pathways of Escherichia coli. *Mol. Biol. Chem.* **10(7)**, 2163-2173



## Literaturverzeichnis

- Koch H-G, Moser M, Schimz K-L, and Müller M (2002) The integration of YidC into cytoplasmic membrane of *E. coli* requires the signal recognition particle, SecA and SecYEG. *J. Biol. Chem.* **277(8)**, 5715-5718
- Kohler R, Boehringer D, Greber B, Bingel-Erlenmeyer R, Collinson I, Schaffitzel C, and Ban N (2009) YidC and Oxa1 form dimeric insertion pores on the translating ribosome. *Mol. Cell* **34(3)**, 344-353
- Kol S, Nouwen N, and Driessen AJM (2008) Mechanisms of YidC-mediated insertion and assembly of multimeric membrane protein complexes. *J. Biol. Chem.* **283(46)**, 31269-31273
- Kramer G, Rauch T, Rist W, Vorderwülbecke S, Patzelt H, Schulze-Specking A, Ban N, Deuerling E, Bukau B (2002) L23 protein functions as a chaperone docking site on the ribosome. *Nature* **419(6903)**, 171-174
- Krishtalik LI and Cramer WA (1995) On the physical basis for the cis-positive rule describing protein orientation in biological membranes. *FEBS Lett.* **369(2-3)**, 140-143
- Kuhn A (1987) Bacteriophage M13 procoat inserts into the plasma membrane as a loop structure. *Science* **238(4832)**, 1413-1415
- Kuhn A (1988) Alterations in the extracellular domain of M13 procoat protein make its membrane insertion dependent on secA and secY. *Eur. J. Biochem.* **177(2)**, 267-271
- Kuhn A (1995) Major coat proteins of bacteriophage Pf3 and M13 as model systems for Sec-independent protein transport. *FEMS Microbiol. Rev.* **17(1-2)**, 185-190
- Kuhn A (2009) From the Sec complex to the membrane insertase YidC. *Biol Chem.* **390(8)**, 701-706
- Kuhn A and Troschel D (1992) Distinct steps in the insertion pathway of bacteriophage coat proteins. *Membrane Biogenesis and Protein Targeting* **22**, 33-47
- Kuhn A and Wickner W (1985a) Isolation of mutants in M13 coat protein that affect its synthesis, processing and assembly into phage. *J. Biol. Chem.* **260(29)**, 15907-15913
- Kuhn A and Wickner W (1985b) Conserved residues of the leader peptide are essential for cleavage by leader peptidase. *J. Biol. Chem.* **260(29)**, 15914-15918
- Kuhn A, Kreil G, and Wickner W (1986) Both hydrophobic domains of M13 procoat are required to initiate membrane insertion. *EMBO J.* **5(13)**, 3681-3685

## Literaturverzeichnis

Kuhn A, Kreil G, and Wickner W (1987) Recombinant forms of M13 procoat with an OmpA leader sequence or a large carboxy-terminal extension retain their independence of secY function. *EMBO J.* **6(2)**, 501-505

Kuhn A, Rohrer J, and Gallusser A (1990) Bacteriophages M13 and Pf3 tell us how proteins insert into the membrane. *J. Struct. Biol.* **104(1-3)**, 38-43

Kuhn A, Stiegler N, Schubert A-K (2010) Membrane insertion of small proteins. *Methods Mol. Biol.* **619**, 39-62

Kuhn A, Stuart R, Henry R, and Dalbey RE (2003) The Alb3/Oxa1/YidC protein family: membrane-localized chaperones facilitating membrane protein insertion? *Trends Cell Biol.* **13(10)**, 510-516

Kuhn A, Wickner W, and Kreil G (1986a) The cytoplasmic carboxy terminus of M13 procoat is required for the membrane insertion of its central domain. *Nature* **322(6077)**, 335-339

Kuhn A, Zhu H-Y, and Dalbey RE (1990) Efficient translocation of positively charged residues of M13 procoat protein across the membrane excludes electrophoresis as the primary force for membrane. *EMBO J.* **9(8)**, 2385-2389

Kusters R, Breukink E, Gallusser A, Kuhn A, and de Kruijff B (1994) A dual role for phosphatidylglycerol in protein translocation across the Escherichia coli inner membrane. *J. Biol. Chem.* **269(2)**, 1560-1563

Kusters R, de Vrije T, Breukink E, and de Kruijff B (1989) SecB protein stabilizes a translocation-competent state of purified proPhoE protein. *J. Biol. Chem.* **264(35)**, 20827-20830

Kusters R, Dowhan W, and de Kruijff B (1991) Negatively charged phospholipids restore prePhoE translocation across phosphatidylglycerol-depleted Escherichia coli inner membranes. *J. Biol. Chem.* **266(14)**, 8659-8862

Lakowicz JR, Principles of Fluorescence Spectroscopy

Laws JK and Dalbey RE (1989) Positive charges in the cytoplasmic domain of Escherichia coli leader peptidase prevent an apolar domain from functioning as a signal. *EMBO J.* **8(7)**, 2095-2099

Lecker SH, Driessen AJ, and Wickner W (1990) ProOmpA contains secondary and tertiary structure prior to translocation and is shielded from aggregation by association with SecB protein. *EMBO J.* **9(7)**, 2309-2314

## Literaturverzeichnis

Lee JI, Kuhn A, Dalbey RE (1992) Distinct domains of an oligotopic membrane protein are Sec-dependent and Sec-independent for membrane insertion. *J. Biol. Chem.* **267(2)**, 938-943

Lee PA, Tullman-Ercek D, and Georgiou G (2006) The bacterial twin-arginine translocation pathway. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**, 373-395

Lévy D, Bluzat A, Seigneuret M, and Rigaud J-L (1990) A systematic study of liposome and proteoliposome reconstitution involving Bio-Bead-mediated Triton X-100 removal. *Biochim. Biophys. Acta* **1025(2)**, 179-190

Lill R, Cunningham K, Brundage LA, Ito K, Oliver D, and Wickner W (1989) SecA protein hydrolyzes ATP and is an essential component of the protein translocation ATPase of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **8(3)**, 961-966

Lill R, Dowhan W, and Wickner W (1990) The ATPase activity of SecA is regulated by acidic phospholipids, SecY, and the leader and mature domains of precursor proteins. *Cell* **60(2)**, 271-280

Linderoth NA, Simon MN, and Russel M (1997) The filamentous phage pIV multimer visualized by scanning transmission electron microscopy. *Science* **278(5343)**, 1635-1638

Lotz M, Haase W, Kühlbrandt W, and Collinson I (2008) Projection structure of yidC: a conserved mediator of membrane protein assembly. *J. Mol. Biol.* **375(4)**, 901-907

Luirink J and Sinning I (2004) SRP-mediated protein targeting: structure and function revisited. *Biochim. Biophys. Acta* **1694(1-3)**, 17-35

Luirink J, von Heijne G, Houben E, and de Gier JW (2005) Biogenesis of inner membrane proteins in *Escherichia coli*. *Rev. Microbiol.* **59**, 329-355

Lycklama a Nijeholt JA, Bulacu M, Marrink SJ, and Driessen AJ (2010) Immobilization of the plug domain inside the SecY channel allows unrestricted protein translocation. *J. Biol. Chem.* **285(31)**, 23747-23754

MacDonald RC, MacDonald RI, Menco BPM, Takeshita K, Subbarao NK, and Hu L (1991) Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1061(2)**, 297-303

Manting EH, van der Does C, Remigy H, Engel A, and Driessen AJ (2000) SecYEG assembles into a tetramer to form the active protein translocation channel. *EMBO J.* **19(5)**, 852-861

## Literaturverzeichnis

- Mao C, Hardy SJS, and Randall LL (2009) Maximal efficiency of coupling between ATP hydrolysis and translocation of polypeptides mediated by SecB requires two protomers of SecA. *J. Bacteriol.* **191(3)**, 978-984
- McGovern K, Ehrmann M, and Beckwith J (1991) Decoding signals for membrane protein assembly using alkaline phosphatase fusions. *EMBO J.* **10(10)**, 2773-2782
- Meyer T, Menetret J, Breitling R, Miller K, Akey CW, and Rapoport TA (1999) The bacterial SecY/E translocation complex forms channel-like structures similar to those of the eukaryotic Sec61p complex. *J. Mol. Biol.* **285(4)**, 1789-1800
- Milner HW, König ML, and Lawrence MS (1950) Reactivation of dispersed chloroplast material by reaggregation. *Arch. Biochem.* **28(2)**, 185-192
- Miroux W and Walker JE (1996) Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.* **260(3)**, 289-298
- Mitchell C and Oliver D (1993) Two distinct ATP-binding domains are needed to promote protein export by Escherichia coli SecA ATPase. *Mol. Microbiol.* **10(3)**, 483-497
- Mitra K, Schaffitzel C, Shaikh T, Tama F, Jenni S, Brooks CL, Ban N, and Frank J (2005) Structure of the E. coli protein-conducting channel bound to a translating ribosome. *Nature* **438(7066)**, 318-324
- Mori H, Tsukazaki T, Masui R, Kuramitsu S, Yokoyama S, Johnson A, Kimura Y, Akiyama Y, and Ito K (2003) Fluorescence resonance energy transfer analysis of protein translocase. SecYE from *Thermus thermophilus* HB8 forms a constitutive oligomer in membranes. *J. Biol. Chem.* **278(16)**, 14257-14264
- Müller M and Bobel G (1984a) In vitro translocation of bacterial proteins across the plasma membrane of Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81(23)**, 7421-7425
- Müller M and Bobel G (1984b) Protein export in Escherichia coli requires a soluble activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81(24)**, 7737-7741
- Nagamori S, Smirnova IN, and Kaback HR (2004) Role of YidC in folding of polytopic membrane proteins. *J. Cell Biol.* **165(1)**, 53-62
- Nagler C, Nagler G, and Kuhn A (2007) Cysteine residues in the transmembrane regions of M13 procoat protein suggest that oligomeric coat proteins assemble onto phage progeny. *J. Bacteriol.* **189(7)**, 2897-2905

## Literaturverzeichnis

Nargang FE, Preuss M, Neupert W, and Herrmann JM (2002) The Oxa1 protein forms a homooligomeric complex and is an essential part of the mitochondrial export translocase in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **277(15)**, 12846-12853

Ng DT, Brown JD, and Walter P (1996) Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J. Cell Biol.* **134(1)**, 269-278

Nilsson I and von Heijne G (1990) Fine-tuning the topology of a polytopic membrane protein: role of positively and negatively charged amino acids. *Cell* **62(6)**, 1135-1141

Nishiyama K-I, Hanada M, and Tokuda H (1994) Disruption of the gene encoding p12 (SecG) reveals the direct involvement and important function of SecG in the protein translocation of *Escherichia coli* at low temperature. *EMBO J.* **13(14)**, 3272-3277

Nishiyama K-I, Ikegami A, Moser M, Schiltz E, Tokuda H, and Müller M (2006) A derivative of lipid A is involved in signal recognition particle/SecYEG-dependent and -independent membrane integrations. *J. Biol. Chem.* **281(47)**, 35667-35676

Nishiyama K-I, Maeda M, Abe M, Kanamori T, Shimamoto K, Kusumoto S, Ueda T, and Tokuda H (2010) A novel complete reconstitution system for membrane integration of the simplest membrane protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **394(3)**, 733-736

Nishiyama K-I, Suzuki T, and Tokuda H (1996) Inversion of the membrane topology of SecG coupled with SecA-dependent preprotein translocation. *Cell* **85(1)**, 71-81

Nouwen N and Driessen AJ (2002) SecDFYajC forms a heterotetrameric complex with YidC. *Mol. Microbiol.* **44(5)**, 1397-1405

Ohno-Iwashita Y and Wickner W (1983) Reconstitution of rapid and asymmetric assembly of M13 procoat protein into liposomes which have bacterial leader peptidase. *J. Biol. Chem.* **258(3)**, 1895-1900

Oliver DB and Beckwith J (1982) Regulation of a membrane component required for protein secretion in *Escherichia coli*. *Cell* **30(1)**, 311-319

Osborne AR and Rapoport TA (2007) Protein translocation is mediated by oligomers of the SecY complex with one SecY copy forming the channel. *Cell* **129(1)**, 97-110

Osborne AR, Rapoport TA, and van den Berg B (2005) Protein translocation by the Sec61/SecY channel. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 529-550

## Literaturverzeichnis

- Papanikou E, Karamanou S, Baud C, Frank M, Sianidis G, Keramissanou D, Kalodimos C, Kuhn A, and Economou A (2005) Identification of the preprotein binding domain of SecA. *J. Biol. Chem.* **280(52)**, 43209-43217
- Perlman D and Halvorson HO (1983) A putative signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic and prokaryotic signal peptides. *J. Mol. Biol.* **167(2)**, 391-409
- Ploss M and Kuhn A (2010) Kinetics of filamentous phage assembly. *Phys. Biol.* **7(4)**, 045002
- Pogliano JA and Beckwith J (1994) SecD and SecF facilitate protein export in Escherichia coli. *EMBO J.* **13(3)**, 554-561
- Pradel N, Decorps A, Ye C, Santini CL, and Wu CF (2005) YidC-dependent translocation of green fluorescence protein fused to the FliP cleavable signal peptide. *Biochimie* **87(2)**, 191-196
- Preuss M, Ott M, Funes S, Luirink J, and Herrmann JM (2005) Evolution of mitochondrial oxa proteins from bacterial YidC. Inherited and acquired functions of a conserved protein insertion machinery. *J. Biol. Chem.* **280(3)**, 13004-13011
- Price CE, Kocer A, Kol S, van der Berg JP, and Driessen AJM (2011) In vitro synthesis and oligomerization of the mechanosensitive channel of large conductance, MscL, into a functional ion channel. *FEBS Lett.* **585(1)**, 249-254
- Pugsley AP (1993) The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev.* **57(1)**, 50-108
- Raetz CR (1978) Enzymology, genetics and regulation of membrane phospholipid synthesis in Escherichia coli. *Microbiol. Rev.* **42(3)**, 614-659
- Raetz CR and Newman KF (1978) Neutral lipid accumulation in the membranes of Escherichia coli mutants lacking diglyceride kinase. *J. Biol. Chem.* **253(11)**, 3882-3887
- Randall LL and Henzl M (2010) Direct identification of the site of binding on the chaperone SecB for the amino terminus of the translocon motor SecA. *Protein Science* **19(6)**, 1173-1179
- Rapoport TA (2007) Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* **450(7170)**, 663-669
- Rapoport TA, Goder V, Heinrich SU, and Matlack KE (2004) Membrane-protein integration and the role of the translocation channel. *Trends Cell Biol.* **14(10)**, 568-575

## Literaturverzeichnis

- Ravaud S, Stjepanovic G, Wild K, and Sinning I (2008) The crystal structure of the periplasmic domain of the Escherichia coli membrane protein insertase YidC contains a substrate binding cleft. *J. Biol. Chem.* **283(14)**, 9350-9358
- Ridder ANJA, Kuhn A, Killian JA, and de Kruijff B (2001) Anionic lipids stimulate Sec-independent insertion of a membrane protein lacking charged amino acid side chains. *EMBO Rep.* **2(5)**, 403-408
- Ridder ANJA, Morein S, Stam JG, Kuhn A, de Kruijff B, and Killian JA (2000) Analysis of the role of interfacial tryptophan residues in controlling the topology of membrane proteins. *Biochem.* **39(21)**, 6521-6528
- Ridder ANJA, van de Hoef W, Stam J, Kuhn A, de Kruijff B, and Killian JA (2002) Importance of hydrophobic matching for spontaneous insertion of a single-spanning membrane protein. *Biochem.* **41(15)**, 4946-4952
- Rietveld AG, Koorengel MC, and de Kruijff B (1995) Non-bilayer lipids are required for efficient protein transport across the plasma membrane of Escherichia coli. *EMBO J.* **14(22)**, 5506-5513
- Robinson C and Bolhuis A (2001) Protein targeting by the twin-arginine translocation pathway. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2(5)**, 350-356
- Robinson C, Woolhead C, and Edwards W (2000) Transport of proteins into and across the thylakoid membrane. *J. Exp. Botany* **51**, 369-374
- Rohrer J and Kuhn A (1990) The function of a leader peptide in translocating charged amino acyl residues across a membrane. *Science* **250(4986)**, 1418-1421
- Römisch K, Webb J, Herz J, Prehn S, Frank R, Vingron M, and Dobberstein B (1989) Homology of 54K protein of signal-recognition particle, docking protein and two E. coli proteins with putative GTP-binding domains. *Nature.* **340(6233)**, 478-482
- Roos T (2000) *In-vitro*-Untersuchungen der Insertionsmechanismen von Membranproteinen in *Escherichia coli*. Dissertation Universität Hohenheim, Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie, Verlag Grauer Beuren, Stuttgart, ISBN 3-86186-332-4
- Roos T, Kiefer D, Hugenschmidt S, Economou A, and Kuhn A (2001) Indecisive M13 procoat protein mutants bind to SecA but do not activate the translocation ATPase. *J. Biol. Chem.* **276(41)**, 37909-37915

## Literaturverzeichnis

Rotering H and Raetz CR (1983) Appearance of monoglyceride and triglyceride in the cell envelope of *Escherichia coli* mutants defective in diglyceride kinase. *J. Biol. Chem.* **258(13)**, 8068-8073

Sääf A, Monne M, de Gier JW, and von Heijne G (1998) Membrane topology of the 60-kDa Oxa1p homologue from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **273(46)**, 30415-30418

Salaj-Šmic E (1978) Colicinogeny of *Escherichia coli* MRE 600. *Antimicrob. Agents Chemother.* **14(5)**, 797-799

Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> edit, 3, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York

Samuelson J, Jiang F, Yi L, Chen M, de Gier J-W, Kuhn A, and Dalbey RE (2001) Function of YidC fort he insertion of M13 procoat protein in *E. coli*: translocation of mutants that show diefferences in their membrane potential dependence and Sec-requirement. *J. Biol. Chem.* **276(37)**, 34847-34852

Samuelson JC, Chen M, Jiang F, Möller I, Wiedmann M, Kuhn A, Phillips GJ, and Dalbey RE (2000) YidC mediates membrane protein insertion in bacteria. *Nature* **406(6796)**, 637-641

Sanger F, Nicklen S, and Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74(12)**, 5463-5467

Santini CL, Ize B, Chanal A, Müller M, Giordano G, and Wu LF (1998) A novel sec-independent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **17(1)**, 101-112

Sargent F, Bogsch EG, Stanley NR, Wexler M, Robinson C, Berks BC, and Palmer T (1998) Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. *EMBO J.* **17(13)**, 3640-3650

Sargent F, Gohlke U, de Leeuw E, Stanley NR, Palmer T, Saibil HR, and Berks BC (2001) Purified components of the *Escherichia coli* Tat protein transport system form a double-layered ring structure. *Eur. J. Biochem.* **268(12)**, 3361-3367

Sargent F, Stanley NR, Berks BC, and Palmer T (1999) Sec-independent protein translocation in *Escherichia coli*. A distinct and pivotal role for the TatB protein. *J. Biol. Chem.* **274(51)**, 36073-36082

Schatz PJ, Riggs PD, Jacq A, Fath MJ, and Beckwith J (1989) The secE gene encodes an integral membrane protein required for protein export in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **3(7)**, 1035-1044



## Literaturverzeichnis

Schiebel E, Driessen AJ, Hartl FU, and Wickner W (1991) Delta mu H<sup>+</sup> and ATP function at different steps of the catalytic cycle of preprotein translocase. *Cell* **64(5)**, 927-939

Schmidt MG, Rollo EE, Grodberg J, and Oliver DB (1988) Nucleotide sequence of the *secA* gene and *secA(Ts)* mutations preventing protein export in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170(8)**, 3404-3414

Schönbauer A-K (2011) Untersuchungen zur autonomen und YidC-vermittelten Membraninsertion von Pf3 coat-Protein mithilfe fluoreszenz-spektroskopischer Einzelmolekülmessungen, Dissertation Universität Hohenheim, Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie

Schuenemann D, Amin P, Hartmann E, and Hoffman NE (1999) Chloroplast SecY is complexed to SecE and involved in the translocation of the 33-kDa but not the 23-kDa subunit of the oxygen-evolving complex. *J. Biol. Chem.* **274(17)**, 12177-12182

Scotti PA, Urbanus ML, Brunner J, de Gier JW, von Heijne G, van der Does C, Driessen AJ, Oudega B, and Luirink J (2000) YidC, the *Escherichia coli* homologue of mitochondrial Oxa1p, is a component of the Sec translocase. *EMBO J.* **19(4)**, 542-549

Serek J (2005) Rekonstitution und funktionelle Analyse der *Escherichia coli* Membraninsertase YidC, Dissertation Universität Hohenheim, Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie

Serek J, Bauer-Manz G, Struhalla G, van den Berg L, Kiefer D, Dalbey R, and Kuhn A (2004) *Escherichia coli* YidC is a membrane insertase for Sec-independent proteins. *EMBO J.* **23(2)**, 294-301

Settles AM, Yonetani A, Baron A, Bush DR, Cline K, and Martienssen R (1997) Sec-independent protein translocation by the maize Hcf106 protein. *Science* **278(5342)**, 1467-1470

Siegel V, and Walter P (1988) Each of the activities of signal recognition particle (SRP) is contained within a distinct domain: analysis of biochemical mutants of SRP. *Cell* **52(1)**, 39-49

Sijbrandi R, Urbanus ML, ten Hagen-Jongman CM, Bernstein HD, Oudega B, Otto BR, and Luirink J (2003) Signal recognition particle (SRP)-mediated targeting and Sec-dependent translocation of an extracellular *Escherichia coli* protein. *J. Biol. Chem.* **278(7)**, 4654-4659

Singer SJ and Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175(23)**, 720-731

Soekarjo M, Eisenhawer M, Kuhn A, and Vogel H (1996) Thermodynamics of the membrane insertion process of the M13 procoat proteins, a lipid bilayer traversing proteins containing a leader sequence. *Biochem.* **35(4)**, 1232-1241

## Literaturverzeichnis

Stanley NR, Palmer T, and Berks BC (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)**, 11591-11596

Stathopoulos C (1996) An alternative topological model for *Escherichia coli* OmpA. *Protein Sci.* **5(1)**, 170-173

Stiegler N, Dalbey RE, and Kuhn A (2011) M13 procoat protein insertion into YidC and SecYEG proteoliposomes and liposomes. *J. Mol. Biol.* **406(3)**, 362-370

Stiegler NN (2004) YidC – Membraninsertase aus *Escherichia coli* – Rekonstitution und Orientierung, Diplomarbeit Universität Hohenheim, Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie

Studier FW and Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189(1)**, 113-30

Sundberg E, Slagter JG, Fridborg I, Cleary SP, Robinson C, and Coupland G (1997) Albino3, an *Arabidopsis* nuclear gene essential for chloroplast differentiation, encodes a chloroplast protein that shows homology to proteins present in bacterial membranes and yeast mitochondria. *Plant Cell* **9(5)**, 717-730

Szyrach G, Ott M, Bonnefoy N, Neupert W, and Herrmann JM (2003) Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. *EMBO J.* **22(24)**, 6448-6457

Tam PC, Maillard AP, Chan KK, and Duong F (2005) Investigating the SecY plug movement at the SecYEG translocation channel. *EMBO J.* **24(19)**, 3380-3388

Tarry MJ, Schäfer E, Chen S, Buchanan G, Greene NP, Lea SM, Palmer T, Saibil HR, and Berks BC (2009) Structural analysis of substrate binding by the TatBC component of the twin-arginine protein transport system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106(32)**, 13284-13289

Thiaudière E, Soekarjo M, Kuchinka E, Kuhn A, and Vogel H (1993) Structural characterization of membrane insertion of M13 procoat, M13 coat and Pf3 coat proteins. *Biochem.* **32(45)**, 12186-12196

Tziatzios C, Schubert D, Lotz M, Gundogan D, Betz H, Schägger H, Haase W, Duong F, and Collinson I (2004) The bacterial protein-translocation complex: SecYEG dimers associate with one or two SecA molecules. *J. Mol. Biol.* **340(3)**, 513-524

## Literatuurverzeichnis

Urbanus ML, Scotti PA, Froderberg L, Sääf A, de Gier JW, Brunner J, Samuelson JC, Dalbey RE, Oudega B, and Luirink J (2001) Sec-dependent membrane protein insertion: sequential interaction of nascent FtsQ with SecY and YidC. *EMBO Rep.* **2(6)**, 524-529

Valent QA, Kendall DA, High S, Kusters R, Oudega B, and Luirink J (1995) Early events in preprotein recognition in *E. coli*: interaction of SRP and trigger factor with nascent polypeptides. *EMBO J.* **14(22)**, 5494-505

van Bloois E, Dekker HL, Fröderberg L, Houben ENG, Urbanus ML, de Koster CG, de Gier JW, and Luirink J (2008) Detection of cross-links between FtsH, YidC, HflK/C suggests a linked role for these proteins in quality control upon insertion of bacterial inner membrane proteins. *FEBS Lett.* **582(10)**, 1419-1424

van Bloois E, Haan GJ, de Gier JW, Oudega B, and Luirink J (2004) F<sub>1</sub>F<sub>o</sub> synthase subunit c is targeted by the SRP to YidC in the *E. coli* inner membrane. *FEBS Letters* **576(1-2)**, 97-100

van Bloois E, Haan GJ, de Gier JW, Oudega B, and Luirink J (2006) Distinct requirements for translocation of the N-tail and C-tail of the Escherichia coli inner membrane protein CyoA. *J. Biol. Chem.* **281(15)**, 10002-10009

van Bloois E, Nagamori S, Koningstein G, Ullers RS, Preuss M, Oudega B, Harms N, Kaback HR, Herrmann JM, and Luirink J (2005) The Sec-independent function of Escherichia coli YidC is evolutionary-conserved and essential. *J. Biol. Chem.* **280(13)**, 12996-13003

van den Berg B, Clemons WM Jr, Collinson I, Modis Y, Hartmann E, Harrison SC, and Rapoport TA (2004) X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* **427(6969)**, 36-44

van der Does C, Swaving J, van Klompenburg W, and Driessen AJM (2000) Non-bilayer lipids stimulate the activity of the reconstituted bacterial protein translocase. *J. Biol. Chem.* **275(4)**, 2472-2478

van der Laan M, Bechtluft P, Kol S, Nouwen N, and Driessen AJM (2004) F<sub>1</sub>F<sub>o</sub> ATP syntase subunit c is a substrate of the novel YidC pathway for membrane protein biogenesis. *J. Cell Biol.* **165(2)**, 213-222

van der Laan M, Urbanus ML, Ten Hagen-Jongman CM, Nouwen N, Oudega B, Harms N, Driessen AJ, and Luirink J (2003) A conserved function of YidC in the biogenesis of respiratory chain complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100(10)**, 5801-5806

van Klompenburg W, Nilsson I von Heijne G, and de Kruijff B (1997) Anionic phospholipids are determinants of membrane protein topology. *EMBO J.* **16(14)**, 4261-4266

## Literaturverzeichnis

Veenendaal AK, van der Does C, and Driessen AJM (2001) Mapping the sites of interaction between SecY and SecE by cysteine scanning mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **276(35)**, 32559-32566

Veenendaal AK, van der Does C, and Driessen AJM (2004) The protein-conducting channel SecYEG. *Biochim. Biophys. Acta* **1694(1-3)**, 81-95

Venema K, Gibrat R, Grouzis JP, and Grignon C (1993) Quantitative measurement of cationic fluxes, selectivity and membrane potential using liposomes multilabelled with fluorescent probes. *Biochim. Biophys. Acta* **1146(1)**, 87-96

von Heijne G (1983) Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur. J. Biochem.* **133(1)**, 17-21

von Heijne G (1985) Signal sequences. The limits of variation. *J. Mol. Biol.* **184(1)**, 99-105

von Heijne G (1986) Net N-C charge imbalance may be important for signal sequence function in bacteria. *J. Mol. Biol.* **192(2)**, 287-290

von Heijne G (1986) The distribution of positively charged residues in bacterial inner membrane proteins correlates with the transmembrane topology. *EMBO J.* **5(11)**, 3021-3027

von Heijne G (1989) Control of topology and mode of assembly of a polytopic membrane protein by positively charged residues. *Nature* **341(6241)**, 456-458

von Heijne G (1989) The structure of signal peptides from bacterial lipoproteins. *Protein Eng.* **2(7)**, 531-534

von Heijne G (1992) Membrane protein structure prediction: Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J. Mol. Biol.* **225(2)**, 487-494

von Heijne G (1994) Sec-independent protein insertion into the inner E. coli membrane. A phenomenon in search of an explanation. *FEBS Lett.* **346(1)**, 69-72

Vrontou E and Economou A (2004) Structure and function of SecA, the preprotein translocase nanomotor. *Biochim. Biophys. Acta* **1694(1-3)**, 67-80

Wang L, Miller A, and Kendall DA (2000) Signal peptide determinants of SecA binding and stimulation of ATPase activity. *J. Biol. Chem.* **275(14)**, 10154-10159

Wang X, Bogdanov M, and Dowhan W (2002) Topology of polytopic membrane protein subdomains is dictated by membrane phospholipid composition. *EMBO J.* **21(21)**, 5673-5681

## Literaturverzeichnis

Wang, P., Kuhn, A., and Dalbey, R. E. (2010) Global change of gene expression and cell physiology in YidC-depleted Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **192(8)**, 2193-2209

Watanabe M and Blobel G (1989) Cytosolic factor purified from Escherichia coli is necessary and sufficient for the export of a preprotein and is a homotetramer of SecB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86(8)**, 2728-2732

Watts C, Silver P, and Wickner W (1981) Membrane assembly from purified components. II Assembly of M13 procoat inot liposomes reconstituted with purified leader peptidase. *Cell* **25(2)**, 347-353

Weiner JH, Bilous PT, Shaw GM, Lubitz SP, Frost L, Thomas GH, Cole JA, and Turner RJ (1998) A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins. *Cell* **93(1)**, 93-101

Wexler M, Sargent F, Jack RL, Stanley NR, Bogsch EG, Robinson C, Berks BC, and Palmer T (2000) TatD is a cytoplasmic protein with DNase activity. No requirement for TatD family proteins in sec-independent protein export. *J. Biol. Chem.* **275(22)**, 16717-16722

White GF, Racher KI, Lipski A, Hallet FR, and Wood JM (2000) Physical properties of liposomes and proteoliposomes from E. coli polar lipids. *Biochim. Biophys. Acta* **1468(1-2)**, 175-186

Wickner W (1979) The assembly of proteins into biological membranes: The membrane trigger hypothesis. *Annu. Rev. Biochem.* **48**, 23-45

Wickner W and Leonard MR (1996) Escherichia coli preprotein translocase. *J. Biol. Chem.* **271(47)**, 29514-29516

Winterfeld S, Imhof N, Roos T, Bär G, Kuhn A, and Gerken U (2009) Substrate-induced conformational change of the Escherichia coli membrane insertase YidC. *Biochem.* **48(28)**, 6684-6691

Wolfe PB, Rice M, and Wickner W (1985) Effects of two sec genes on protein assembly into plasma membrane of Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **260(3)**, 1836-1841

Xie K and Dalbey RE (2008) Inserting proteins into the bacterial cytoplasmic membrane using the Sec and YidC translocases. *Nat. Rev. Microbiol.* **6(3)**, 234-244

Xie K, Bogdanov M, Heacock P, and Dowhan W (2006) Phosphatidylethanolamine and monoglucosyldiacylglycerol are interchangeable in supporting topogenesis and function of the polytopic membrane protein lactose permease. *J. Biol. Chem.* **281(28)**, 19172-19178

## Literaturverzeichnis

- Xie K, Hessa T, Seppälä S, Rapp M, von Heijne G, and Dalbey RE (2007) Features of transmembrane segments that promote the lateral release from the translocase into the lipid phase. *Biochem.* **46(51)**, 15153-15161
- Xie K, Kiefer D, Nagler G, Dalbey RE, and Kuhn A (2006) Different regions of the nonconserved large periplasmic domain of Escherichia coli YidC are involved in the SecF interaction and membrane insertase activity. *Biochem.* **45(44)**, 13401-13408
- Yahr TL and Wickner WT (2000) Evaluating the oligomeric state of SecYEG in preprotein translocase. *EMBO J.* **19(16)**, 4393-4401
- Yahr TL and Wickner WT (2001) Functional reconstitution of bacterial Tat translocation in vitro. *EMBO J.* **20(10)**, 2472-2479
- Yen MR, Harley KT, Tseng YH, and Saier MH Jr (2001) Phylogenetic and structural analyses of the Oxa1 family of protein translocases. *FEMS Microbiol. Lett.* **204(2)**, 223-231
- Yoshihisa T and Ito K (1996) Pro-OmpA derivatives with a His6 tag in their N-terminal "translocation initiation domains" are arrested by Ni<sup>2+</sup> at an early post-targeting stage of translocation. *J. Biol. Chem.* **271(16)**, 9429-9436
- Yu Z, Koningstein G, Pop A, and Luirink J (2008) The conserved third transmembrane segment of YidC contacts nascent Escherichia coli inner membrane proteins. *J. Biol. Chem.* **283(50)**, 34635-34642
- Yu Z, Bekker M, Tramonti A, Cook GM, van Ulsen P, Scheffers D-J, Teixeira de Mattos J, de Biase D, and Luirink J (2011) Activators of glutamate-dependent acid resistance system alleviate deleterious of yidC depletion in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **193(6)**, 1308-1316
- Yuan J, Phillips GJ, and Dalbey RE (2007) Isolation of cold-sensitive yidC mutants provides insights into the substrate profile of the YidC insertase and the importance of transmembrane 3 in YidC function. *J. Bacteriol.* **189(24)**, 8961-8972
- Zarrabi N (2003) Physik eines Nanomotors: Kinetische Untersuchungen der H<sup>+</sup>-ATP Synthase in Lipiddoppelschichten, Diplomarbeit Universität Stuttgart, 3. Physikalisches Institut
- Zarrabi N, Ernst S, Düser MG, Golovina-Leiker A, Becker W, Erdmann R, Dunn SD, and Börsch M (2009) Simultaneous monitoring of the two coupled motors of a single F[<sub>sub</sub>0]F[<sub>sub</sub>1]-ATP synthase by three-color FRET using duty cycle-optimized triple-ALEX. *Proc. SPIE* **7185**, 718505-718519

## Literaturverzeichnis

Zhang W, Bogdanov M, Pi J, Pittard AJ, and Dowhan W (2003) Reversible topological organization within a polytopic membrane protein is governed by a change in membrane phospholipid composition. *J. Biol. Chem.* **278(50)**, 50128-50135

Zhang W, Campbell HA, King SC, and Dowhan W (2005) Phospholipids as determinants of membrane protein topology. Phosphatidylethanolamine is required for the proper topological organization of the gamma-aminobutyric acid permease (GabP) of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **280(28)**, 26032-26038

Zhou J and Xu Z (2003) Structural determinants of SecB recognition by SecA in bacterial protein translocation. *Nat. Struct. Biol.* **10(11)**, 942-947

Zimmer J and Rapoport TA (2009) Conformational flexibility and peptide interaction of the translocation ATPase SecA. *J. Mol. Biol.* **394(4)**, 606-612

Zimmer J, Nam Y, and Rapoport TA (2008) Structure of a complex of the ATPase SecA and the protein-translocation channel. *Nature* **455(7215)**, 879-880

Zimmermann R, Watts C, and Wickner W (1982) The biosynthesis of membrane-bound M13 coat protein. Energetics and assembly intermediates. *J. Biol. Chem.* **257(11)**, 6529-6536

Zito CR and Oliver D (2003) Two-stage binding of SecA to the bacterial translocon regulates ribosome-translocon interaction. *J. Biol. Chem.* **278(42)**, 40640-40646

Zubay G (1973) In vitro synthesis of protein in microbial systems. *Annu. Rev. Genet.* **7**, 267-287

Zwizinski C and Wickner W (1982) The purification of M13 procoat, a membrane protein precursor. *EMBO J.* **1(5)**, 573-578

## 9. Abkürzungen und Trivialnamen

<b>A</b>	Adenin
A	Alanin (Ala)
A	Ampere
Abb	Abbildung
Ac	Acetat
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATM	Atmosphäre (Druck)
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
<b>BCA</b>	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
<b>C</b>	Cystein
C	Cytosin
ca.	circa
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CHCl <sub>3</sub>	Chloroform
CL	Cardiolipin
C-Terminus	Carboxyterminus
<b>D</b>	Asparaginsäure (Asp)
(k)Da	(Kilo)Dalton
d.h.	das heißt
DAG	Diacylglycerin
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan



## Abkürzungen und Trivialnamen

dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat
DDM	Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid
ddNTP	Di-2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
dGTP	2'-Desoxy-Guanosin-5'-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DOPE	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidyl-ethanolamin
DOPG	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-(1'- <i>rac</i> -glycerol)
DPH	1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol
dTTP	2'-Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat
dUTP	2'-Desoxy-Uridin-5'-Triphosphat
<b>E</b>	Glutaminsäure (Glu)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	et aliter; und andere
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
<b>f</b>	femto
F	Phenylalanin (Phe)
Ffh	<i>fifty-four-homologue</i>
FOS	Dodecylphosphocholin (Fos-cholin <sup>12</sup> ) von Anatraxe
FPLC	fast protein liquid chromatography
FtsY	SRP-Rezeptor
<b>g</b>	Erdbeschleunigung
G	Glycin (Gly)
g	Gramm

## Abkürzungen und Trivialnamen

<b>G</b>	Guanin
ggf.	gegebenenfalls
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
<b>H</b>	Histidin (His)
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	destilliertes Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	bidestilliertes Wasser
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
HAc	Essigsäure
HCl	Salzsäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N-(2-ethanesulfonic acid)
His-tag	Histidinyl-Reste
<b>I</b>	Iod
I	Isoleucin (Ile)
IMAC	immobilisierte Ionen-Metall-Affinitätschromatographie
INV	invertierte Innenmembranvesikel
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
<b>K</b>	Lysin (Lys)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dikaliumhydrogenphosphat
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Kaliumsulfat
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KI	Kaliumiodid
KOH	Kaliumhydroxid
<b>L</b>	Leucin (Leu)
l	Liter
LB	Luria Bertani oder lysogeny broth
Lep	<i>Leaderpeptidase</i>
<b>M</b>	Methionin (Met)

## Abkürzungen und Trivialnamen

m	milli
M	molar (Mol/l)
M13 coat	Haupthüllprotein des Phagen M13
M13 procoat	Vorläuferprotein von M13 coat
max.	maximal
MeOH	Methanol
MG	Molekulargewicht
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgNO <sub>3</sub>	Magnesiumnitrat
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MnCl <sub>2</sub>	Mangan(II)-chlorid
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
<b>N</b>	Asparagin (Asn)
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Natriumsulfat
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge
nm	Nanometer
NTA	Nitrilotriessigsäure
N-Terminus	Aminoterminus
NTP	Nukleosid-5'-Triphosphat
<b>OD</b>	optische Dichte
OG	n-Octyl-β-D-glucoopyranosid
OmpA	<i>outer membrane protein A</i>
<b>P</b>	Pellet

## Abkürzungen und Trivialnamen

P	Prolin (Pro)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
Pel	Pellet
PG	Phosphatidylglyzerin
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethansulfonsäurefluorid, Phenylmethylsulfonylfluorid
Ponceau S	3-Hydroxy-4-[2-sulfo-4-(4-sulfo-phenylazo)phenylazo]-2,7-naphthalensulfonsäure , Na-Salz
PP	Probenpuffer
proOmpA	Vorläuferprotein von OmpA
psi	pounds per square inch
purity	Reinheit
<b>Q</b>	Glutamin (Gln)
<b>R</b>	Arginin (Arg)
RbCl	Rubidiumchlorid
RE	Rohextrakt
RNA	Ribonukleinsäure
RNC	ribosome-nascent-chain complex
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
<b>S</b>	Serin (Ser)
s	Sekunde
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat, Na-Salz
Sec	secretion
SecA	ATPase des Sec-Systems
SecB	Chaperon der Sekretion
SecD	Protein des SecDFYajC-Komplexes

## Abkürzungen und Trivialnamen

SecF	Protein des SecDFYajC-Komplexes
SecYEG	Sec-Translokase
Sn	Überstand
SRP	<i>signal recognition particle</i>
<b>T</b>	Threonin (Thr)
T	Tyrosin
Tab	Tabelle
TAT	<i>Twin arginine translocation</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-Base-Saline
TCA	Trichloressigsäure
TCEP	Tris-(2-Carboxylethyl)-Phosphinehydrochlorid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TF	<i>trigger factor</i>
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Transmembransegment
Total	eingesetzte Gesamtmenge
Tricin	N-[2-Hydroxy-1,1-bis (hydroxymethyl) ethyl]glycin
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
tRNA	<i>transfer RNA</i>
TX-100	Triton X-100
<b>u.a.</b>	unter anderem
Urea	Harnstoff
UTP	Uridin-5'-Triphosphat
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge
Ü	Überstand
ü/N	über Nacht
<b>V</b>	Valin (Val)
V	Volt
v/v	volume/volume

## Abkürzungen und Trivialnamen

Val	Valinomycin
Vol	Volumen
<b>W</b>	Tryptophan (Trp)
W	Watt
w/v	weight/volume
w/w	weight/weight
Wt	Wildtyp
<b>Y</b>	Tyrosin (Tyr)
μ	mikro
YajC	Protein des SecDFYajC-Komplexes
YidC	Membraninsertase von <i>E. coli</i>
<b>z.B.</b>	zum Beispiel

**Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Publikationen entstanden:**

Kuhn A, Stiegler N, Schubert A-K (2010) Membrane integration of small proteins. *Methods Mol. Biol.* **619**, 39-62

Stiegler N, Dalbey R, and Kuhn A (2011) M13 procoat protein insertion into YidC and SecYEG proteoliposomes and liposomes. *J. Mol. Biol.* **406(3)**, 362-370

## 10. Lebenslauf

Vor- und Zuname                      Natalie Nadine Stiegler  
Geburtsdatum                            01.02.1979 in Stuttgart

### Studium

11.2004 – 03.2010                      Universität Hohenheim in Stuttgart  
Promotion im Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie  
10.1998 – 09.2004                      Universität Hohenheim in Stuttgart  
Studium Biologie (Diplom)  
*Hauptfächer:*                            Mikrobiologie, Genetik  
*Nebenfächer:*                            Biochemie, Virologie  
11.2003 – 09.2004                      Diplomarbeit  
*Thema der*                                „YidC – Membraninsertase aus *Escherichia coli*  
*Diplomarbeit:*                            Rekonstitution und Orientierung“

### Schulbildung

1989 – 1998                              Königin-Katharina-Stift, Gymnasium in Stuttgart  
1985 – 1989                              Fuchsrainschule, Grundschule in Stuttgart

### Fachbezogene Nebentätigkeit

11.2004 – 03.2010                      Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Mikrobiologie und  
Molekularbiologie der Universität Hohenheim.



## 11. Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie der Universität Hohenheim unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Andreas Kuhn.

Mein besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Andreas Kuhn für die hervorragende kritische Begleitung und für die Bereitstellung des interessanten Themas. Für seine unermessliche Geduld in vielen anregenden Diskussionen und beim Korrekturlesen herzlichen Dank.

Für die Übernahme des Koreferats bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Hanke des Institutes für Physiologie der Universität Hohenheim.

Bei Herrn Prof. Dr. Robin Ghosh des Institutes für Bioenergetik der Universität Stuttgart möchte ich mich für die sehr hilfreiche Zusammenarbeit mit den Phospholipiden bedanken.

Bei Herrn Dr. Michael Börsch des 3. Physikalischen Institutes der Universität Stuttgart für die Anleitung in die Fluoreszenzmessungen am konfokalen Mikroskop möchte ich mich ebenfalls bedanken.

Für die Unterstützung und die erfahrene Hilfsbereitschaft bei der Anfertigung dieser Arbeit möchte ich mich herzlich bei Anne-Kathrin Schönbauer für viele konstruktive und aufbauende Gespräche, monatelanger Lipidarbeit, sowie eine wunderbare Freundschaft bedanken.

Bei Stefan Ernst für die ausdauernde Geduld mit physikalischen Problemen, seine unerschöpfliche Bereitschaft für die nicht enden wollenden Messungen am Mikroskop und die herzliche Begleitung in allzu dunklen physikalischen Zeiten.

Gerda Bär, Susanne Krauss und Gisela Nagler danke ich für viele Hilfestellungen während meiner Zeit im Institut und den „Lipidmädels“ für unermessliche Stunden beim Aliquotieren der Lipide im Kühlraum. Mein Dank gilt natürlich auch den anderen hier nicht namentlich genannten Mitarbeitern, die mir oft mit wertvollen Tipps zur Seite standen.

Mein größter Dank gilt meinem Mann, meiner Mutter und Schwester für die moralische Unterstützung und Liebe während der letzten Jahre.

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, Dipl. Biologin Natalie Nadine Stiegler, Doktorandin am Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie der Universität Hohenheim, dass ich diese Dissertation selbstständig angefertigt, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift