

**Molekulare Dynamik der YidC-Membraninsertase
aus *Escherichia coli***

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

Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim

Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie

vorgelegt von
Nora Imhof
aus Heilbronn

2011

Dekan: Prof. Dr. Heinz Breer
1. berichtende Person: Prof. Dr. Andreas Kuhn
2. berichtende Person: Prof. Dr. Ralf Kölling-Paternoga

Eingereicht am: 02.08.2011
Mündliche Prüfung am: 25.10.2011

Die vorliegende Arbeit wurde am 11.10.2011 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 <i>Escherichia coli</i> und seine Membranen	1
1.2 Translokation und Insertion von Proteinen	2
1.3 Die Sec-Translokase	2
1.4 Der Sec-abhängige Weg	3
1.4.1 Der SRP-Weg	4
1.4.2 Der SecB-Weg	5
1.5 Assoziation von YidC mit der Sec-Translokase	7
1.5.1 Sec- und YidC-abhängige Membranproteine	7
1.6 Der Sec-unabhängige Weg	8
1.6.1 YidC-abhängige Proteine	9
1.7 YidC	9
1.7.1 YidC-Homologe	11
1.7.2 Regionen von YidC und deren Bedeutung	12
1.8 Pf3 coat Protein	13
1.8.1 Insertion von Pf3 coat in die Cytoplasmamembran	13
1.9 Fluoreszenz von Proteinen	15
1.9.1 Historischer Rückblick	15
1.9.2 Grundlagen der Fluoreszenz	15
1.9.3 Fluoreszenz der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan	17
1.9.4 Spektrale Eigenschaften der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan	17
1.9.5 Tryptophan als Umgebungsmarker	19
1.9.6 Weitere Fluorophore	20
1.10 Fluoreszenzspektroskopie	21
1.11 Ziel der Arbeit	21
2. Material und Methoden	23
2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	23
2.2 Chemikalien	25

2.3 Antibiotika.....	27
2.4 Antikörper	27
2.5 Medien.....	28
2.6 Puffer und Lösungen	29
2.7 Kits	31
2.8 Materialien für ECL	31
2.9 Optische Filter und Polarisatoren.....	32
2.10 Enzyme.....	32
2.11 Phospholipide.....	32
2.12 Bakterienstämme	33
2.13 Plasmide	34
2.14 Primer	34
2.14.1 Sequenzierprimer.....	34
2.14.2 PCR-Primer.....	35
2.15 Molekularbiologische Methoden.....	35
2.15.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> XL-1 blue (Minipräparation).....	35
2.15.2 Bestimmung der DNA-Konzentration.....	36
2.15.3 Restriktionsspaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	36
2.15.4 Agarosegel-Elektrophorese.....	37
2.15.5 Herstellung der Längenstandards λ HindIII und λ PstI	38
2.15.6 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	38
2.15.7 Ligation von DNA-Fragmenten.....	39
2.15.8 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	39
2.15.9 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	40
2.15.10 Herstellung von Glycerin-Kulturen	40
2.15.11 Herstellung von LB-Agar-Platten mit gewünschten Komponenten.....	40
2.15.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	41
2.15.13 Sequenzierung von Plasmid-DNA.....	42
2.15.14 Herstellung eines Sequenziergels	43
2.15.15 Klonierung der YidC-Tryptophanmutanten sowie des YidC-Wildtyps	43
2.16 Proteinbiochemische Methoden	46
2.16.1 Radioaktive Markierung neusynthetisierter Proteine	46
2.16.2 Komplementations-Test.....	47

2.16.3 Expressionstest	48
2.16.4 Expression und Reinigung von YidC-Tryptophanmutanten	48
2.16.5 Expression und Reinigung des YidC-Wildtyps	50
2.16.6 Dialyse	50
2.16.7 Bestimmung der Proteinkonzentration	50
2.16.8 Aufbereitung von Phospholipiden und Erzeugung von Liposomen	51
2.16.9 Rekonstitution von Membranproteinen in Liposomen	52
2.16.10 Topologie-Bestimmung	52
2.16.11 Titration von rekonstituierten YidC-Tryptophanmutanten mit Pf3W0 coat	53
2.16.12 TCA-Fällung und Aceton-Waschen von Proteinen	53
2.16.13 SDS-PAGE	54
2.16.14 Autoradiographie	55
2.16.15 Coomassie Blau-Färbung	55
2.16.16 Western blot und Immundetektion	56
2.16.17 Enhanced Chemiluminescence (ECL)	57
2.17 Biophysikalische Methoden	57
2.17.1 „Steady-state“ Fluoreszenzspektroskopie	57
2.17.2 Fluoreszenz-Lebensdauer	57
2.17.3 Anisotropie und Rotationskorrelationszeit	58
2.17.4 Messung des Fluoreszenz-Intensitätszerfalls	61
2.17.5 Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung	63
2.17.6 Fluoreszenz-Intensitätszerfall von Fluoreszenz-Lebensdauer-Standards	64
2.17.7 Datenanalyse	67
2.17.7.1 Berechnung des Fluoreszenzmaximums und der Breite des Emissionsspektrums (FWHM)	67
2.17.7.2 Erstellen der Bindungskurve und Berechnung der Dissoziationskonstante (K_D)	67
2.17.7.3 Berechnung der Fluoreszenz-Lebensdauer	68
2.17.7.4 Berechnung der Anisotropie und Rotationskorrelationszeit	69
3. Ergebnisse	71
3.1 Funktionalität der YidC-Tryptophanmutanten und des YidC-Wildtyps	71
3.1.1 Komplementation des YidC-Depletionsstammes JS7131	72
3.1.2 Insertion von PClep in die Cytoplasmamembran von <i>E. coli</i>	76

3.2 Expressionstest von YidC _{W454} in pGZ119EH mit und ohne ersichtliches Shine-Dalgarno-Motiv im YidC-Depletionsstamm JS7131	79
3.3 Stabilität der Tryptophanmutante YidC _{W454} und des YidC-Wildtyps jeweils in pGZ119EH mit Shine-Dalgarno-Motiv im <i>E. coli</i> YidC-Depletionsstamm JS7131	81
3.4 Expression der YidC-Tryptophanmutanten in <i>E. coli</i>	83
3.5 Reinigung der YidC-Tryptophanmutanten und des YidC-Wildtyps.....	86
3.6 Membran-Topologie der rekonstituierten YidC-Tryptophanmutanten.....	88
3.7 Fluoreszenzspektroskopie	90
3.7.1 „Steady-state“ Fluoreszenzspektroskopie.....	92
3.7.1.1 Bindung von Pf3W0 coat Protein an rekonstituierte YidC-Tryptophanmutanten	92
3.7.1.2 Fluoreszenzspektren der rekonstituierten YidC-Tryptophanmutanten vor Titration mit Pf3W0 coat Protein	93
3.7.1.3 Fluoreszenzspektren der rekonstituierten YidC-Tryptophanmutanten nach Titration mit Pf3W0 coat Protein	93
3.7.1.4 Spektrale Eigenschaften des Pf3W0 coat Proteins.....	95
3.7.1.5 Fluoreszenzspektren von rekonstituiertem YidC _{2W} , YidC-Wildtyp sowie der YidC P1-Domäne	96
3.7.1.6 Fluoreszenzspektren der Detergenz-solubilisierten YidC-Tryptophanmutanten..	97
3.7.2 Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie.....	99
3.7.2.1 Apparatfunktion (IRF).....	100
3.7.2.2 Einfluss von Tyrosin-Resten durch Anregung bei 290 nm.....	100
3.7.2.3 Fluoreszenz-Intensitätszerfall der rekonstituierten YidC-Tryptophanmutanten vor und nach Bindung von Pf3W0 coat Protein.....	102
3.7.2.4 Fluoreszenz-Intensitätszerfall der Detergenz-solubilisierten YidC-Tryptophanmutanten	104
3.7.2.5 Fluoreszenz-Anisotropie und Rotationskorrelationszeit der rekonstituierten YidC-Tryptophanmutanten vor und nach Bindung von Pf3W0 coat Protein	106

4. Diskussion..... 111

4.1 Komplementation des YidC-Depletionsstammes JS7131 durch die YidC-Tryptophanmutanten	112
4.1.1 Interpretation der Ergebnisse des Komplementations-Tests der YidC-Tryptophanmutanten mit Shine-Dalgarno-Motiv.....	112
4.1.2 Interpretation der Ergebnisse des Komplementations-Tests der YidC-Tryptophanmutanten ohne ersichtliches Shine-Dalgarno-Motiv	113

4.2 Interpretation der Ergebnisse der Insertions-Experimente von PClep	115
4.3 Umgebung der Tryptophan-Reste der in Liposomen rekonstituierten YidC-Tryptophanmutanten	117
4.4 Umgebung der Tryptophan-Reste der gereinigten, Detergenz-solubilisierten YidC-Tryptophanmutanten	118
4.5 Änderung der Umgebung des Tryptophan-Restes der jeweiligen YidC-Tryptophanmutante durch Bindung von Pf3W0 coat Protein	120
4.6 Beweglichkeit der YidC-Tryptophanmutanten	122
5. Zusammenfassung/Summary	124
6. Literaturverzeichnis.....	127
Anhang.....	144
Abkürzungsverzeichnis	144
DNA-Sequenz von YidC.....	148
Publikationen.....	150
Danksagung.....	151

1. Einleitung

1.1 *Escherichia coli* und seine Membranen

E. coli ist ein Gram-negatives, fakultativ anaerobes, peritrich begeißeltes und stäbchenförmiges Bakterium, das seinen natürlichen Lebensraum im menschlichen und tierischen Darm hat. Es ist stammabhängig ca. 4 μm lang und 1 μm breit und gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae*. *E. coli* ist aufgrund seiner kurzen Generationszeit (ca. 20 min) schnell zu kultivieren und kann genetisch leicht manipuliert werden. Dadurch wurde es zu dem am besten untersuchten Prokaryonten. Gram-negative Bakterien wie *E. coli* sind von einer vielschichtigen Hülle umgeben (Abb. 1). Diese Hülle besteht aus der äußeren Membran, dem periplasmatischen Raum (de Petris, 1967) und der Cytoplasmamembran (= innere Membran).

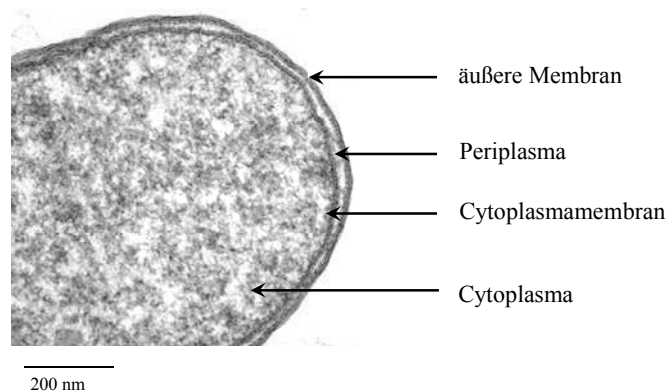


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Teils einer *E. coli* Zelle. Das wässrige Cytoplasma ist umgeben von der hydrophoben Cytoplasmamembran, dem hydrophilen Periplasma und der äußeren Membran (verändert nach Yenugu *et al.*, 2004).

Die Cytoplasmamembran von *E. coli* hat eine Dicke von 6 - 8 nm und besteht aus einer Phospholipid-Doppelschicht (Kellenberger & Ryter, 1958). Phosphatidylethanolamin ist hierbei das am häufigsten vorkommende Phospholipid (Kaneshiro & Marr, 1962). Es bildet ca. 70 - 75% der Cytoplasmamembran gefolgt von Phosphatidylglycerin (ca. 20%) und Cardiolipin (ca. 5%) (Ames, 1968; Burnell *et al.*, 1980). Das Genom des *E. coli* Stammes K-12 wurde als erstes vollständig sequenziert und fast alle Funktionen der 4288 proteincodierenden Gene sind bekannt (Blattner *et al.*, 1997). Ungefähr 2% der Gene von *E. coli* codieren für Membranproteine, die in der äußeren Membran lokalisiert sind (z. B. Porine) und ca. 25% der Gene codieren für Membranproteine der Cytoplasmamembran (z. B.

Translokasen) (Krogh *et al.*, 2001; Casadio *et al.*, 2003). Die restlichen Gene codieren für cytoplasmatische Proteine (z. B. DNA-Polymerasen).

1.2 Translokation und Insertion von Proteinen

Alle Proteine werden unabhängig von ihrer späteren Funktion im Cytoplasma an den Ribosomen synthetisiert und haben verschiedene Zielorte. Manche verbleiben im Cytoplasma, andere werden in die Cytoplasmamembran inseriert. Wiederum andere Proteine müssen durch die Cytoplasmamembran transloziert werden und sind im periplasmatischen Raum oder in der äußeren Membran lokalisiert. Diese werden als sekretorische Proteine bezeichnet.

Die Biogenese von Membranproteinen erfolgt in drei Schritten: 1. Proteine müssen zur Membran geleitet werden („Targeting“), 2. in diese Phospholipid-Doppelschicht inseriert werden und 3. in ihre native Konformation gefaltet und teilweise zu Komplexen zusammengeführt werden („Assembly“).

In der Cytoplasmamembran von *E. coli* wurden bisher drei Transportsysteme entdeckt, die Proteine in die Cytoplasmamembran inserieren oder über die Cytoplasmamembran translozieren können. Die Zwillings-Arginin-Translokase (twin-arginin-translocation, TAT) transloziert spezifisch periplasmatische Proteine, die ein N-terminales Signal-Peptid, welches ein Arginin-Paar enthält, aufweisen. Die wenigen von TAT zu translozierenden Proteine liegen bereits gefaltet im Cytoplasma vor und haben meistens Cofaktoren gebunden (Berks *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2001). Eine zweite Translokase, die Sec (secretion)-Translokase, exportiert ungefaltete Proteine aus dem Cytoplasma oder inseriert diese lateral in die Cytoplasmamembran. Die YidC-Insertase schließlich kann entweder in Kombination mit der Sec-Translokase oder selbständig Proteine in die Cytoplasmamembran inserieren. Dieser Weg wird als „YidC-only“ bezeichnet. Auf die Sec-Translokase sowie die YidC-Insertase wird im Folgenden genauer eingegangen.

1.3 Die Sec-Translokase

Die Sec-Translokase von *E. coli* ist die am besten charakterisierte bakterielle Translokase. Sie setzt sich aus verschiedenen Proteinkomponenten zusammen. Das SecYEG-Translokon ist ein Komplex, der aus den drei integralen Membranproteinen SecY, SecE und SecG besteht (SecYEG) (Brundage *et al.*, 1990; Douville *et al.*, 1994) und bildet zusammen mit dem peripher an der Innenseite der Cytoplasmamembran liegenden Protein SecA sowie dem

heterotrimeren Proteinkomplex SecDFYajC die sogenannte Sec-Translokase (Duong & Wickner, 1997).

SecY, SecE und SecG formen einen Kanal, welcher den Transport von hydrophilen Regionen von Membranproteinen durch die Membran erleichtert. SecY ist die größte Untereinheit des SecYEG-Heterotrimers und bildet die eigentliche Pore des Kanals (van den Berg *et al.*, 2004). SecY hat ein Molekulargewicht von 48 kDa und durchspannt die Cytoplasmamembran zehnmal (Akiyama & Ito, 1987). Die Komponente SecE hat ein Molekulargewicht von 13,6 kDa, durchspannt die Membran dreimal und ist zusammen mit SecY für die Funktion der Translokase essentiell (Schatz *et al.*, 1989; Akimaru *et al.*, 1991). SecG ist mit 11,4 kDa und zwei Transmembransegmenten die kleinste Untereinheit des SecYEG-Translokons (Nishiyama *et al.*, 1993). SecG stimuliert die Translokation von Proteinen, indem es vor allem bei niedrigen Temperaturen die SecA-Membraninteraktion unterstützt (Nishiyama *et al.*, 1994; Hanada *et al.*, 1994).

SecA ist die periphere Komponente der Sec-Translokase und liegt in verschiedenen Formen in der Zelle vor: löslich im Cytoplasma, membranassoziiert sowie transient in die Cytoplasmamembran inseriert und weist ATPase-Aktivität auf, d. h. SecA kann ATP binden und hydrolysieren. Aufgrund dessen ist SecA die energieliefernde Komponente der Sec-Translokase und dient als molekularer Motor, der die Translokation von sekretorischen Proteinen und großen periplasmatischen Domänen von Membranproteinen durch das SecYEG-Translokon antreibt (Oliver & Beckwith, 1982; Lill *et al.*, 1990; Neumann-Haefelin *et al.*, 2000). Einige Proteine wie beispielsweise OmpA (outer membrane protein A) benötigen zusätzlich das Membranpotential als Energiequelle der Translokation (Schiebel *et al.*, 1991).

SecDFYajC ist ein Membranproteinkomplex, der mit dem SecYEG-Translokon assoziiert ist und dessen Translokationsaktivität stimuliert. YajC, ein 8 kDa großes, einspänniges Protein, bildet wahrscheinlich eine strukturelle oder funktionelle Verbindung zwischen dem SecYEG- und SecDF-Komplex (Duong & Wickner, 1997). Es deutet jedoch nichts darauf hin, dass YajC für die Translokation *per se* benötigt wird (Pogliano & Beckwith, 1994).

1.4 Der Sec-abhängige Weg

Der Weg, über den Proteine zum SecYEG-Translokon geleitet werden, wird als „Sec-abhängiger Weg“ bezeichnet. Proteine, die über diesen Weg sekretiert oder in die Cytoplasmamembran inseriert werden sollen, müssen in einer losen, entfalteten Konformation

vorliegen (Randall & Hardy, 1986) und werden oft als Vorläuferproteine synthetisiert, die eine hydrophobe, N-terminale Region enthalten. Diese sogenannte Signal-Sequenz wird bei sekretorischen Proteinen als Signal-Peptid bezeichnet und wird meist vom Vorläuferprotein durch periplasmatische Signal-Peptidasen entfernt. Das Vorläuferprotein erlangt dadurch seine reife (mature) Form. Membranproteine, die mehrere Transmembrandomänen enthalten, sogenannte polytope Membranproteine, enthalten oft keine abspaltbare Signal-Sequenz, sondern eine hydrophobe Transmembrandomäne, die der Verankerung des Proteins in der Membran dient. Diese wird in der Regel nicht abgespalten (prozessiert) und wird als Signalanker-Sequenz bezeichnet (von Heijne, 1990). Die Substrate der Sec-Translokase reichen von stark hydrophilen Proteinen (sekretorische Proteine) bis zu stark hydrophoben Proteinen (Membranproteine). Sec-abhängige Proteine können über zwei Wege, die für unterschiedliche Substrate spezifisch sind, zum SecYEG-Translokon geleitet werden (Valent *et al.*, 1998). In Bakterien werden Membranproteine hauptsächlich durch das Signalerkennungs-Partikel (SRP, signal recognition particle) zur Membran transportiert und co-translational inseriert, während sekretorische Proteine post-translational durch SecB/SecA zur Membran geleitet werden (Kumamoto, 1989; Beck *et al.*, 2000; Ulbrandt *et al.*, 1997; de Gier *et al.*, 1996). Eine schematische Darstellung ist in Abb. 2 gezeigt.

1.4.1 Der SRP-Weg

Polytope, stark hydrophobe Membranproteine gelangen über den bakteriellen SRP-Weg co-translational zur Sec-Translokase (Beck *et al.*, 2000). Beispiele hierfür sind die Laktose Permease (LacY), die Leader Peptidase (Lep) und YidC (MacFarlane & Müller, 1995; de Gier *et al.*, 1996; Koch *et al.*, 2002). Als primäre Erkennungsstelle für das SRP dient eine stark hydrophobe Transmembrandomäne, die sogenannte Signalanker-Sequenz des am Ribosom wachsenden Proteins, der sogenannten naszierenden Polypeptidkette, an die das SRP nach deren Hervorragen aus dem Ribosom bindet (Valent *et al.*, 1997; Beck *et al.*, 2000). Das SRP besteht aus dem Protein fifty-four homologue (Ffh = p48) und einer 4,5 S RNA (Bernstein *et al.*, 1989; Poritz *et al.*, 1988; Poritz *et al.*, 1990). Nach der Bindung von SRP wird der heterotrimere Komplex aus Ribosom, naszierender Polypeptidkette und SRP co-translational, d. h. schon während der Synthese des Proteins, zur Cytoplasmamembran geleitet. An der Membran trifft das SRP auf FtsY, den bakteriellen SRP-Rezeptor (Ulbrandt *et al.*, 1997; Seluanov & Bibi, 1997). Dieser ist über SecY mit der Sec-Translokase verbunden (Angelini *et al.*, 2005). Ein Komplex aus SRP, FtsY und naszierendem Polypeptid wird gebildet und das

naszierende Polypeptid wird an das SecYEG-Translokon übergeben. Daraufhin wird die Hydrolyse von GTP am Ffh und FtsY stimuliert und führt dazu, dass sich das SRP und FtsY voneinander lösen. Die naszierende Polypeptidkette wird dann co-translational durch das SecYEG-Translokon in die Cytoplasmamembran inseriert (Keenan *et al.*, 2001; Valent *et al.*, 1998). Dieser co-translationaler Mechanismus verhindert, dass hydrophobe Membranproteine im wässrigen Milieu des Cytoplasmas aggregieren (Ahrem *et al.*, 1989).

1.4.2 Der SecB-Weg

Lösliche, periplasmatische Proteine und Proteine der äußeren Membran, sogenannte sekretorische Proteine, werden mit Hilfe von SecB zur Cytoplasmamembran geleitet und sind in der Regel unabhängig von SRP und dessen Rezeptor FtsY (Beck *et al.*, 2000). Zu den Proteinen, die diesen Weg gehen, gehören beispielsweise das periplasmatische Maltosebindungsprotein (MBP) und OmpA (outer membrane protein A; Außenmembranprotein A). Naszierende Polypeptidketten, die über den SecB-Weg an die Membran geleitet werden sollen, haben eine Signal-Sequenz, die nur schwach hydrophob ist. Dies bewirkt, dass der Triggerfaktor (TF) an die Signal-Sequenz bindet, was dazu führt, dass die Bindung des SRP verhindert wird (Eisner *et al.*, 2003; Beck *et al.*, 2000). Daraufhin findet die Synthese des Vorläuferproteins am Ribosom im Cytoplasma statt. Das zu exportierende Vorläuferprotein wird post-translational, d. h. nach vollständiger Synthese, an die Cytoplasmamembran geleitet (Randall, 1983). Proteine, die ihre stabile Tertiärstruktur eingenommen haben, können von der Translokase nicht entfaltet und dadurch nicht transloziert werden. Deshalb muss das Protein in einer exportkompetenten Form gehalten werden. Dies wird durch das cytosolische Chaperon SecB bewerkstelligt. Es bindet an mehrere Stellen des maturen Teils des Vorläuferproteins und verhindert, dass das zu translozierende Protein seine native Struktur annimmt (Randall & Hardy 1986; Kumamoto, 1989; Randall *et al.*, 1990; Topping & Randall, 1994). Neben der Rolle als Antifaltungshelfer sorgt SecB dafür, dass das Vorläuferprotein zur Cytoplasmamembran transportiert wird (Collier *et al.*, 1988), an welcher es zur peripher lokalisierten Translokasekomponente SecA transferiert wird. SecA transloziert das Vorläuferprotein ATP-abhängig durch das SecYEG-Translokon (Hartl *et al.*, 1990; Schiebel *et al.*, 1991). Durch mehrere Zyklen von Membraninsertion und Deinsertion von SecA, welche mit der Hydrolyse von ATP verbunden sind, wird die Translokation von sekretorischen Proteinen angetrieben (Economou & Wickner, 1994).

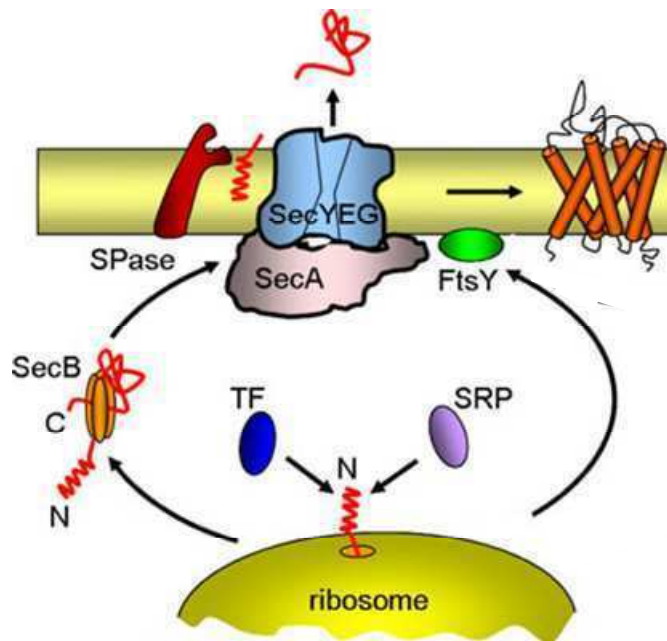


Abb. 2: Schematische Übersicht über den Sec-abhängigen Weg. Trigger Faktor (TF) und SRP konkurrieren um die Bindung des am Ribosom naszierenden Polypeptids. Dieses wird entweder nach Bindung von SRP (co-translational, meist Membranproteine) zum an der Cytoplasmamembran lokalisierten Rezeptor FtsY und daraufhin zur Sec-Translokase geleitet oder es wird nach Bindung des TF durch SecB (post-translational, meist sekretorische Proteine) zur Sec-Translokase geleitet. Die Sec-Translokase besteht aus dem Kanal SecYEG und der ATPase SecA sowie den zusätzlichen Komponenten YidC und SecDFYajC, welche aus Gründen der Übersicht nicht dargestellt sind. Die Signal-Peptidase (SPase) schneidet die Signal-Sequenz vom Vorläuferprotein an der periplasmatischen Seite der inneren Membran ab (verändert nach Facey & Kuhn, 2010).

Prinzipiell sind der SecB- und der SRP-Weg getrennte Translokationswege, die für sekretorische Proteine bzw. Membranproteine spezifisch sind (Scotti *et al.*, 1999; Koch *et al.*, 1999), sie kreuzen sich jedoch an der Cytoplasmamembran, indem die Substrate beider Wege auf das SecYEG-Translokation treffen (Valent *et al.*, 1998). Das SecYEG-Translokation muss einerseits in der Lage sein, sekretorische Proteine ins Periplasma zu entlassen und es muss andererseits Membranproteine lateral in die Phospholipid-Doppelschicht integrieren (du Plessis *et al.*, 2009). An der Membran angekommen, benötigen die unterschiedlichen Substrate anscheinend verschiedene Komponenten der Sec-Translokase. Membranproteine mit kleinen periplasmatischen Domänen benötigen die Komponenten SecA und SecE nicht für ihre Insertion (Koch & Müller, 2000). Membranproteine mit großen hydrophilen, periplasmatischen Domänen, die mindestens 60 Aminosäuren enthalten, benötigen jedoch für die Translokation der periplasmatischen Domäne zusätzlich SecA (Kuhn, 1988; Andersson &

von Heijne, 1993). SecA wird folglich nicht nur für die Translokation von sekretorischen Proteinen benötigt, sondern auch für die Translokation von großen, hydrophilen, periplasmatischen Domänen von Membranproteinen über die Cytoplasmamembran. YidC spielt eine Rolle bei der Insertion von Sec-abhängigen und Sec-unabhängigen Membranproteinen (Samuelson *et al.*, 2000).

1.5 Assoziation von YidC mit der Sec-Translokase

Da die Überexpression der Sec-Translokase-Komponenten auch zu einer Hochregulierung der Expression von YidC führte, kam die Vermutung auf, dass YidC in Kombination mit der Sec-Translokase arbeitet (Scotti *et al.*, 2000). Transmembrandomänen des zu inserierenden Membranproteins werden dabei von der Sec-Translokase lateral in die Membran transferiert. Die mit der Sec-Translokase assoziierte Form von YidC interagiert daraufhin mit hydrophoben Regionen von Membranproteinen und unterstützt diesen lateralen Transfer von Transmembrandomänen in die Cytoplasmamembran (Samuelson *et al.*, 2000; Beck *et al.*, 2001). Eine Interaktion von YidC mit dem SecYEG-Translokon wurde dadurch gezeigt, dass YidC mit dem SecDFyajC-Komplex, genauer gesagt mit SecD und SecF interagiert und mit diesem zusammen gereinigt werden kann. Da SecDF mit SecYEG interagiert, ist YidC somit indirekt mit dem SecYEG-Translokon verbunden (Nouwen & Driessen, 2002). YidC kann neben seiner Funktion als Insertase auch lediglich an der Faltung von Sec-abhängigen Membranproteinen beteiligt sein, nachdem diese durch die Sec-Translokase in die Cytoplasmamembran integriert wurden (Nagamori *et al.*, 2004).

1.5.1 Sec- und YidC-abhängige Membranproteine

Die Leader Peptidase (Lep) und die Mannitol Permease (MtlA) sind Membranproteine, die von der Sec-Translokase und von YidC abhängig sind. YidC kann mit den Transmembransegmenten dieser Proteine quervernetzt werden, nachdem das jeweilige Protein mit der Sec-Translokase assoziiert war und sorgt für deren Insertion in die Cytoplasmamembran (Houben *et al.*, 2000; Beck *et al.*, 2001).

YidC kann auch als Chaperon tätig sein, indem es die Faltung von Membranproteinen in ihre native Konformation innerhalb der Cytoplasmamembran unterstützt. YidC wird beispielsweise für die korrekte Faltung der Laktose Permease (LacY) in seine Tertiärstruktur innerhalb der Cytoplasmamembran benötigt, jedoch nicht für deren Insertion. Die Insertion

von LacY in die Cytoplasmamembran erfolgt stattdessen mittels SecY (Kuhn *et al.*, 2003; Nagamori *et al.*, 2004).

1.6 Der Sec-unabhängige Weg

Manche Membranproteine, insbesondere kleine ein- und zweispännige, die Sec-unabhängig in die Cytoplasmamembran inseriert werden, benötigen nicht die Sec-Translokase, sondern die YidC-Insertase (Samuelson *et al.*, 2000). Eine schematische Darstellung über beide Wege ist in Abb. 3 gezeigt. Membranproteine können über zwei verschiedene Wege zu in der Cytoplasmamembran lokalisiertem YidC gesteuert werden. Die Membranproteine können direkt aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen mit negativ geladenen Kopfgruppen von Lipiden an die Membran gelangen (Gallusser & Kuhn, 1990; Chen *et al.*, 2002) oder *via* SRP (Kap. 1.3.1).

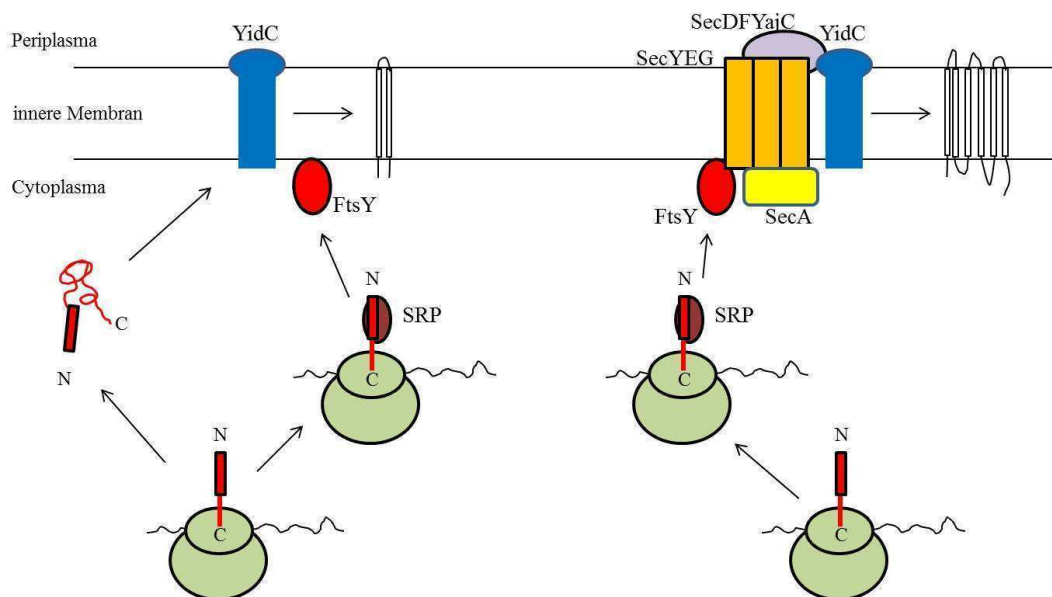


Abb. 3: Schematische Darstellung der Biogenese von Membranproteinen. Kleine ein- oder zweispännige Membranproteine werden durch die YidC-Insertase in die Cytoplasmamembran inseriert, mehrspännige Membranproteine mittels Sec-Translokase. Proteine werden an Ribosomen im Cytoplasma synthetisiert und gelangen durch elektrostatische Wechselwirkungen mit negativ geladenen Kopfgruppen der Phospholipide zu YidC oder mittels SRP und dessen Rezeptor FtsY. Sec-abhängige im Cytoplasma synthetisierte Proteine gelangen während ihrer Synthese mittels SRP sowie FtsY an die Cytoplasmamembran.

Ein Hinweis dafür, dass YidC nicht *per se* mit der Sec-Translokase interagiert, sondern auch als selbständige Insertase in der Zelle vorliegt, war die Entdeckung, dass YidC öfter in der Zelle vorkommt als SecE und SecY. Es sind ca. 2500 - 3000 Moleküle von YidC in einer *E. coli*-Zelle enthalten (Urbanus *et al.*, 2002), aber nur 300 - 600 Kopien von SecE und 200 - 400 Kopien von SecY (Matsuyama *et al.*, 1992). Die Funktion von YidC als selbständige Insertase wurde erstmals an der YidC-abhängigen Insertion der Hüllproteine M13 procoat und Pf3 coat (Kap. 1.8) von Bakteriophagen gezeigt (Samuelson *et al.*, 2000; Serek *et al.*, 2004).

1.6.1 YidC-abhängige Proteine

Es hängt von dem zu inserierenden Membranprotein ab, ob YidC zusammen mit der Sec-Translokase oder selbständig arbeitet. Komplexe, mehrspännige Proteine interagieren mit der Sec-Translokase. Kleine ein- oder doppelspannige Membranproteine mit kurzen periplasmatischen Domänen benötigen die YidC-Insertase um in die Membran inseriert zu werden. Beispiele hierfür sind die Hüllproteine M13 procoat und Pf3 coat von Bakteriophagen. Diese Proteine nutzen YidC um in die Cytoplasmamembran ihres Wirtes *E. coli* inseriert zu werden und benötigen kein SRP um an die Membran geleitet zu werden (de Gier *et al.*, 1998; Samuelson *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002). Auf das Protein Pf3 coat wird in Kap. 1.8 näher eingegangen.

Weitere Proteine, die über den sogenannten „YidC-only pathway“ in die Cytoplasmamembran inseriert werden, sind der mechanosensitive Kanal hoher Leitfähigkeit (MscL, mechanosensitive channel of large conductance), welcher SRP benötigt um an die Membran zu gelangen (Facey *et al.*, 2007) und die Untereinheit c der F₁F₀ ATP Synthase. Dies ist das erste endogene Protein von *E. coli*, das entdeckt wurde, welches Sec-unabhängig mittels YidC in die Cytoplasmamembran inseriert wird (van der Laan *et al.*, 2004). Bisher ist umstritten, ob die Untereinheit c via SRP zur Cytoplasmamembran geleitet wird (van der Laan *et al.*, 2004; van Bloois *et al.*, 2004).

1.7 YidC

YidC ist ein polytopes Membranprotein, das die Cytoplasmamembran sechsmal durchspannt. Dabei liegen der N- und C-Terminus auf der cytoplasmatischen Seite. Die bisher bekannte und angenommene Membrantopologie von YidC ist in Abb. 4 gezeigt. Das N-terminale Ende enthält 5 und das C-terminale Ende 12 Aminosäuren. Die N-terminale, erste

Transmembrandomäne ist durch eine große ungefähr 330 Aminosäuren (ca. Aminosäure 24 - 354) beinhaltende perioplasmatische Domäne P1 mit der zweiten Transmembrandomäne verbunden. Es folgen vier weitere nah aneinander liegende C-terminale Transmembrandomänen, die durch sehr kurze perioplasmatische Bereiche P2 (17 Aminosäuren) und P3 (3 Aminosäuren) sowie durch die cytoplasmatischen Domänen C1 und C2 (jeweils 45 Aminosäuren) miteinander verbunden sind. Die Transmembrandomänen selbst enthalten zwischen 16 - 20 Aminosäuren (Sääf *et al.*, 1998; Kiefer & Kuhn, 2007). Die große perioplasmatische Domäne von YidC konnte vor wenigen Jahren von Aminosäure 54 - 340 kristallisiert und dadurch strukturell ergründet werden. Der Großteil der P1-Domäne besteht aus zwei verdrehten β -Faltblättern, die zusammen ein sogenanntes β -Supersandwich bilden (Aminosäure 56 - 310) (Oliver & Paetzel, 2008; Ravaud *et al.*, 2008).

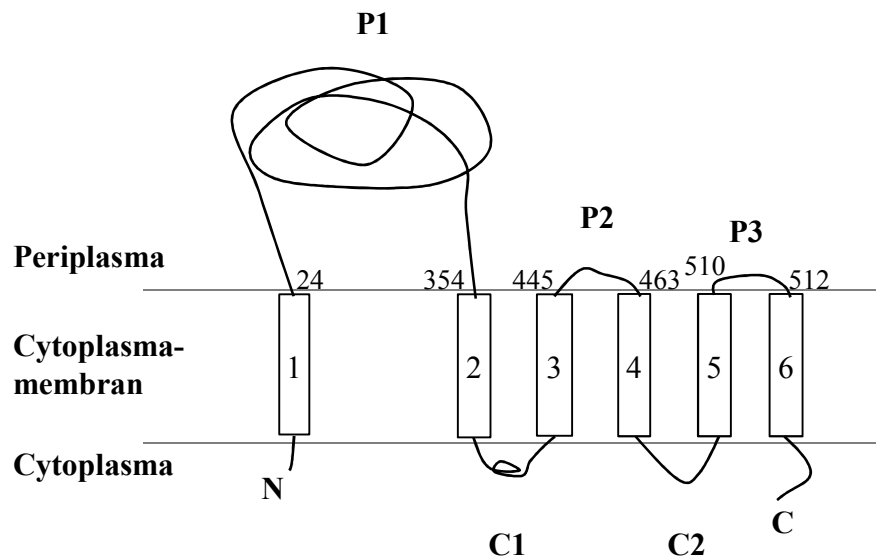


Abb. 4: Bisher bekannte Topologie von YidC. YidC enthält sechs Transmembrandomänen, welche die Cytoplasmamembran durchspannen (Rechtecke 1 - 6), wobei der C-Terminus (C) sowie der N-Terminus (N) im Cytoplasma lokalisiert sind. Die Transmembrandomänen werden auf der perioplasmatischen Seite durch die Bereiche P1, P2 und P3 sowie auf der cytoplasmatischen Seite durch die Bereiche C1 und C2 miteinander verbunden. Die Positionen der Aminosäuren, welche die Transmembrandomänen auf der perioplasmatischen Seite flankieren sind nummeriert (nach Kiefer & Kuhn, 2007).

Für die Insertion von YidC in die Cytoplasmamembran werden SRP, SecA und SecYEG benötigt (Koch *et al.*, 2002). YidC wird co-translational durch das SRP zur Membran geleitet und durch das SecYEG-Translokon in die Cytoplasmamembran inseriert. Dieses sorgt für den korrekten Einbau von YidC in die Cytoplasmamembran. SecA wird für die Translokation der

großen periplasmatischen Domäne P1 benötigt (Koch *et al.*, 2002). Eine weitere Arbeitsgruppe lieferte die gleichen Ergebnisse und kam zusätzlich zu der Erkenntnis, dass naszierendes YidC mit schon vorhandenem YidC in Kontakt kommt und dieses für die Insertion in die Cytoplasmamembran benötigt (Urbanus *et al.*, 2002).

1.7.1 YidC-Homologe

YidC-Homologe sind in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien vorhanden, wobei den Homologen aus Gram-positiven Bakterien die erste Transmembrandomäne des *E. coli* YidC fehlt und sie eine sehr kurze erste periplasmatische Domäne enthalten. Unter den Gram-negativen Bakterien, welche YidC-Homologe mit sechs Transmembrandomänen enthalten, sind die Transmembrandomänen 2 und 3 sowie die C1-Domäne von YidC die am stärksten konservierten Regionen. Das bisher am besten untersuchte prokaryontische YidC ist aus *E. coli*.

Das *E. coli* YidC hat nicht nur bakterielle Homologe, sondern weist auch Homologie zu dem mitochondrialen Membranprotein Oxa1 (oxidase assembly 1) und dem Membranprotein Alb3 (Albino 3) aus pflanzlichen Chloroplasten auf (Sundberg *et al.*, 1997). Diese beiden Homologen enthalten jedoch nur fünf Transmembrandomänen. Die N-terminale Transmembrandomäne und der Großteil der P1-Domäne des *E. coli* YidC fehlen, wohingegen das C-terminale Ende bei beiden Homologen verlängert ist. Alle drei Proteine dienen der Insertion von Membranproteinen (Kuhn *et al.*, 2003; Kuhn & Kiefer, 2007). Oxa1 und dessen Funktion wurden ursprünglich in Mitochondrien der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* untersucht (Bonney *et al.*, 1994). Oxa1 ist in der inneren Membran von Mitochondrien lokalisiert und kann Membranproteine, die vom Zellkern oder in den Mitochondrien codiert werden, in die innere Membran der Mitochondrien inserieren (Hell *et al.*, 1998; Hell *et al.*, 2001). Oxa1 ist beispielsweise am Assembly der Cytochrom c Oxidase beteiligt (Altamura *et al.*, 1996). Alb3 ist in der Thylakoidmembran von pflanzlichen Chloroplasten lokalisiert und wurde ursprünglich in *Arabidopsis thaliana* entdeckt. Es ist an der Insertion von Membranproteinen wie beispielsweise dem Lichtsammelkomplex-Protein (LHCP) in die Thylakoidmembran beteiligt (Moore *et al.*, 2000).

1.7.2 Regionen von YidC und deren Bedeutung

Das erste Transmembrandomänsegment von YidC stellt eine Signalanker-Sequenz dar, welche nicht abgespalten wird (Sääf *et al.*, 1998). Sie dient dazu, dass die große periplasmatische Domäne (P1-Domäne) mit Hilfe von SecA transloziert wird (Koch *et al.*, 2002). Diese erste Transmembrandomäne ist jedoch nicht *per se* notwendig für die Funktion von YidC (Jiang *et al.*, 2002). Auch die P1-Domäne wird größtenteils nicht für die Funktion benötigt, denn die Deletion von 90% der Domäne (Aminosäure 25 - 323) hat keine Auswirkung auf die Funktionalität von YidC. Das Protein SecF, welches Bestandteil des SecDFYajC-Heterotrimers ist, bindet innerhalb dieser Region an die Aminosäuren 215 - 265. Diese Bindung wird aber nicht für die Interaktion mit Sec-abhängigen oder Sec-unabhängigen Proteinen benötigt (Xie *et al.*, 2006). Die Funktion des Großteils der P1-Domäne steht wahrscheinlich in keinem funktionellen Bezug zur Proteininsertion in die Cytoplasmamembran durch YidC. Eine Möglichkeit ist, dass P1 mit anderen periplasmatischen Proteinen wie Chaperonen interagieren kann, die die Faltung und Translokation von YidC-Substraten erleichtern. Ein Teil der P1-Domäne könnte aber auch selber als Chaperon für YidC-Substrate tätig sein (Oliver & Paetzel, 2008; Ravaut *et al.*, 2008). Die cytoplasmatischen Domänen (C1, C2) und das C-terminale cytoplasmatische Ende von YidC sind für die Funktion nicht von entscheidender Bedeutung. Wichtig für die Aktivität von YidC sind hingegen die fünf C-terminalen Transmembrandomänen. Die Aktivität hängt jedoch nicht streng von bestimmten, einzelnen Aminosäuren ab. Diese sind in den Transmembrandomänen 2, 3 und 6 weitestgehend austauschbar. Die Transmembrandomänsegmente 4 und 5 können sogar ohne Beeinträchtigung der Funktion von YidC gegen Transmembrandomänen eines nicht verwandten Proteins ausgetauscht werden. Am wichtigsten scheint die dritte Transmembrandomäne zu sein, da sich der Austausch von Aminosäuren hier vermehrt auf die Aktivität von YidC auswirkt (Jiang *et al.*, 2003). Durch Mutationen in der dritten Transmembrandomäne wird kaltesensitives Wachstum von *E. coli* ausgelöst. Dies spricht ebenfalls für eine wichtige Rolle dieser Region bezüglich der Funktionalität von YidC (Yuan *et al.*, 2007). Die Transmembrandomänen dienen möglicherweise als Gerüst für die Bildung eines Kanals, wenn YidC als Insertase agiert oder die hydrophobe Struktur wird benötigt wenn YidC als Chaperon fungiert (Jiang *et al.*, 2003).

1.8 Pf3 coat Protein

Der Bakteriophage Pf3 wurde ursprünglich aus *Pseudomonas aeruginosa* isoliert (Stanisich, 1974) und kann auch *E. coli* infizieren. Pf3 ist ein ca. 760 nm langer, filamentöser Phage (Bradley, 1974), dessen Haupthüllprotein Pf3 coat ca. 86% der Masse des Bakteriophagen umfasst (Thomas *et al.*, 1983). Pf3 coat besteht aus 44 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 4625 Da. Es ist ein einspänniges Membranprotein, dessen N-Terminus im Periplasma lokalisiert ist. Das N-terminale Ende sowie die einzige Transmembrandomäne bestehen aus 18 Aminosäure-Resten. Das C-terminale Ende enthält acht Aminosäure-Reste und ist im Cytoplasma lokalisiert. Pf3 coat wird nicht als Vorläuferprotein synthetisiert und beinhaltet somit kein Signalpeptid (Luiten *et al.*, 1983).

1.8.1 Insertion von Pf3 coat in die Cytoplasmamembran

Das Protein Pf3 coat benötigt nicht die Sec-Translokase (Rohrer & Kuhn, 1990), sondern wird durch YidC in die Cytoplasmamembran von *E. coli* inseriert. Dabei interagiert YidC post-translational mit der hydrophoben Domäne von Pf3 coat (Chen *et al.*, 2002). Die Membranbiogenese von Pf3 coat ist in Abb. 5 dargestellt und verläuft *in vitro* zusammenfassend folgendermaßen: Pf3 coat gelangt zur Cytoplasmamembran, an welche dessen hydrophobe Domäne aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen angeheftet wird und in die Nähe von YidC gelangt. Dabei ist der negativ geladene N-terminale Teil und der positiv geladene C-terminale Teil von Pf3 coat im Cytoplasma lokalisiert. Daraufhin bindet YidC an die Transmembrandomäne von Pf3 coat und inseriert diese in die Membran. Gleichzeitig oder kurze Zeit später bewirkt das elektrochemische Membranpotential, ein Teil der protonenmotorischen Kraft, dass der N-terminale Teil von Pf3 coat, der zwei negativ geladene Aminosäuren enthält, über die Cytoplasmamembran ins Periplasma transloziert wird. Da die periplasmatische Seite der Cytoplasmamembran durch das elektrochemische Membranpotential positiv geladen ist wird die Translokation des negativ geladenen N-terminalen Teils von Pf3 coat wahrscheinlich durch einen elektrophoretischen Mechanismus bewirkt. Die zwei positiv geladenen Aminosäuren am C-terminalen Teil von Pf3 coat binden vor der Membraninsertion wahrscheinlich durch elektrostatische Interaktion an die Innenseite der durch das elektrochemische Membranpotential negativ geladenen Cytoplasmamembran und verhindern dadurch deren Translokation. Die elektrostatische Interaktion könnte auch mit

negativ geladenen Kopfgruppen der Phospholipide stattfinden (Kiefer *et al.*, 1997; Kiefer und Kuhn, 1999; Chen *et al.*, 2002).

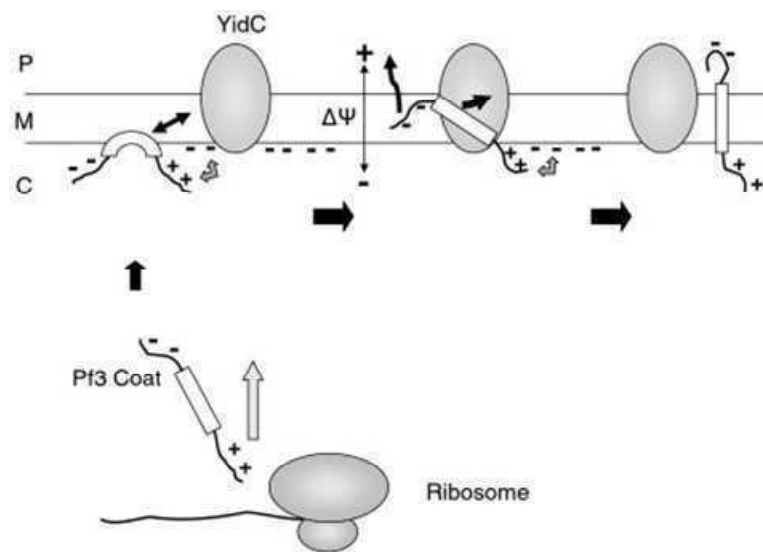


Abb. 5: Membranbiogenese von Pf3 coat mittels YidC. Pf3 coat wird an Ribosomen im Cytoplasma (C) synthetisiert und durch Interaktion der positiv geladenen Aminosäure-Reste am C-terminalen Ende mit der negativ geladenen Oberfläche der Cytoplasmamembran (M) an diese geleitet. Daraufhin wird die hydrophobe Region von Pf3 coat teilweise in die Membran integriert und interagiert mit YidC. Die protonenmotorische Kraft und YidC kooperieren bei der Translokation der N-terminalen Region. Das Membranpotential, welches durch die protonenmotorische Kraft erzeugt wird, ist hierbei für die Translokation der negativ geladenen N-terminalen Region von Pf3 coat ins Periplasma (P) verantwortlich. YidC unterstützt die Translokation und inseriert die hydrophobe Region von Pf3 coat in die Cytoplasmamembran. Das positiv geladene C-terminale Ende von Pf3 coat verbleibt durch Interaktion mit der negativ geladenen Membranoberfläche im Cytoplasma (Chen *et al.*, 2002).

In vivo Studien ergaben, dass sich die Transmembrandomäne von Pf3 coat und die erste sowie die dritte Transmembrandomäne von YidC in ihrem jeweiligen Zentrum kontaktieren (Klenner *et al.*, 2008). Es ist möglich, gereinigtes YidC Protein in Liposomen zu rekonstituieren, ohne dass es seine Funktionalität verliert. Darum ist YidC auch *in vitro* in der Lage Pf3 coat zu inserieren (Serek *et al.*, 2004). Die Bindung von Pf3 coat an YidC führt zu einer Konformationsänderung von YidC und hat eine Dissoziationskonstante (K_D) von ca. 1 μM (Winterfeld *et al.*, 2009; Gerken *et al.*, 2008). Dieser Bindungs-Prozess von Pf3 coat an YidC kommt überwiegend durch hydrophobe Wechselwirkungen zustande (Gerken *et al.*, 2008). Eine bisher ungeklärte Frage ist, an welcher Stelle bzw. an welchen Stellen genau der

erste Kontakt durch Bindung eines Substrates an YidC stattfindet und wie die Struktur von YidC durch Substratbindung beeinflusst wird.

1.9 Fluoreszenz von Proteinen

1.9.1 Historischer Rückblick

Seit Anfang des 20. Jahrhunderts ist bekannt, dass sich die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan mit ultraviolettem Licht anregen lassen. Dieses Erkenntnis wurde von mehreren Arbeitsgruppen genutzt und ausgebaut. Durch das Vorkommen dieser aromatischen Aminosäuren in Proteinen können diese mit ultraviolettem Licht angeregt werden und fluoreszieren daraufhin (Ward, 1923; Coulter *et al.* 1936; Teale & Weber 1957). Viele Studien, die sich mit der Fluoreszenz von Proteinen und den aromatischen Aminosäuren beschäftigten, folgten (Bowman *et al.* 1955; Shore & Pardee 1956; Duggan & Udenfriend 1956; Teale, 1960).

Im Lauf der Jahrzehnte wurden immer detailliertere Kenntnisse speziell über die Fluoreszenz des Tryptophans gewonnen. Mehrere Studien belegten, dass die Fluoreszenz von Tryptophan sensitiv auf Konformationsänderungen von Proteinen und Änderungen der Umgebung reagiert. So konnten Änderungen der Struktur von Proteinen bei verschiedenen pH-Werten und verschiedenen Temperaturen mittels Tryptophan-Fluoreszenz untersucht werden (Brand *et al.*, 1962; Schechter *et al.*, 1970; Burstein *et al.*, 1977). Der Zusammenhang zwischen der Fluoreszenz der Tryptophan-Reste und deren Umgebung wurde anhand von Azurin (Turoverov *et al.*, 1985), Trypsin, Trypsinogen (Turoverov & Kuznetsova, 1986) und vielen anderen Proteinen erforscht.

1.9.2 Grundlagen der Fluoreszenz

Die Fluoreszenzspektroskopie ist eine biophysikalische Methode um strukturelle und dynamische Eigenschaften von Proteinen und anderen Biomolekülen zu untersuchen. Voraussetzung dafür ist das Vorhandensein eines sogenannten Fluorophors, das elektromagnetische Strahlung im ultravioletten, sichtbaren oder infraroten Bereich absorbieren und diese bei einer längeren Wellenlänge als Fluoreszenz emittieren kann. Die Entstehung von Fluoreszenz wird im Folgenden besprochen.

Abb. 6 zeigt eine vereinfachte Darstellung der Entstehung von Fluoreszenz. Das anfangs absorbierende Molekül (Fluorophor) befindet sich im elektronischen Grundzustand S_0 . Durch ein Photon (Lichtquant) der elektromagnetischen Strahlung kann der sich im Grundzustand befindende Fluorophor angeregt werden. Das Photon wird absorbiert, wodurch ein Elektron auf das höhere Energieniveau S_1 angehoben wird. Der Fluorophor befindet sich nun in einem angeregten Zustand. Dieser Zustand ist instabil, sodass das Elektron wieder in den S_0 -Zustand zurückkehrt. Die aufgenommene Energie wird durch Emission eines Photons wieder abgegeben. Schnelle strahlungslose Prozesse (internal conversions) mit Zeitkonstanten im Bereich von 10^{-12} s sind dafür verantwortlich, dass das angeregte Elektron zuerst zur energetischen Unterkante des S_1 -Zustandes gelangt von der es anschließend strahlend in den S_0 -Zustand zurückkehren kann. Dieser Vorgang findet üblicherweise innerhalb von Nanosekunden nach Anregung statt und wird als Fluoreszenz bezeichnet. Die Zeitkonstanten für Absorption und Emission (Fluoreszenz) eines Photons liegen in der Größenordnung von 10^{-15} bzw. 10^{-9} s. Das angeregte Molekül kann aber auch aus dem S_1 -Zustand in einen energetisch tiefer liegenden Triplett-Zustand T_1 geraten. Aus diesem Zustand erfolgt unter Emission eines Photons der Übergang in den S_0 -Zustand (= Phosphoreszenz) mit einer Zeitkonstante von ca. 10^{-3} s oder mehr. Dieser Übergang ist quantenmechanisch verboten und ist daher unwahrscheinlich bzw. langsam und spielt sich im Zeitraum von Sekunden bis zu mehreren Stunden nach Anregung ab. Das durch Fluoreszenz emittierte Photon ist im Vergleich zum absorbierten Photon rotverschoben, d. h. in einen längerwelligen Bereich verschoben („red shift“). Diese Verschiebung wird als Stokes-Shift bezeichnet und ist bei der Phosphoreszenz deutlich größer als bei der Fluoreszenz. Das bedeutet, dass die Fluoreszenz/Phosphoreszenz eines Moleküls bei längeren Wellenlängen stattfindet als die Absorption. Die absorbierte Energie ist demnach höher als die emittierte Energie. Es gilt: je kürzer die Wellenlänge, desto größer ist die Energie eines Photons der betreffenden elektromagnetischen Strahlung (Lakowicz, 2006; Helm & Wöfl, 2007).

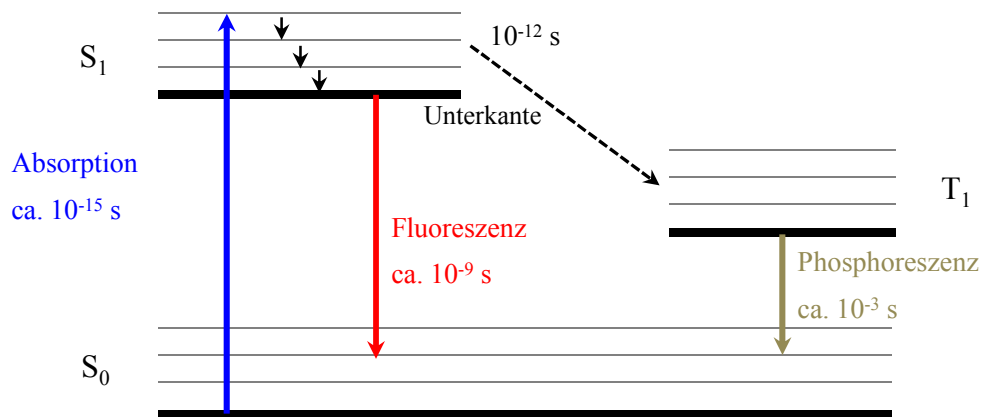


Abb. 6: Vereinfachte Darstellung der Entstehung von Fluoreszenz. Ein Fluorophor wird durch Absorption eines Photons aus dem elektronischen Grundzustand S_0 in einen Zustand höherer Energie S_1 versetzt und gelangt nach schnellen, strahlungslosen Prozessen (internal conversions) ab der energetischen Unterkante des S_1 -Zustandes durch Emission eines Photons (= Fluoreszenz) zurück in den S_0 -Zustand. Das angeregte Molekül kann selten auch vom S_1 -Zustand in den Triplett-Zustand T_1 geraten. Aus diesem Zustand erfolgt unter Emission eines Photons (= Phosphoreszenz), der Übergang in den S_0 -Zustand. Die Zeitkonstanten der einzelnen Vorgänge sind jeweils angegeben.

1.9.3 Fluoreszenz der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan

Die Absorption von Proteinen zwischen 250 - 305 nm wird durch die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin verursacht. Diese drei Aminosäuren sind im Vergleich zu allen anderen Aminosäuren selten in Proteinen vorhanden. Tryptophan kommt zu ≈ 1 mol% vor. Die geringe Häufigkeit ist wahrscheinlich durch dessen aufwändige Synthese bedingt. Die aromatischen Aminosäuren gehören zu den sogenannten intrinsischen Fluorophoren, welche natürlich in den zu analysierenden Proben vorhanden sind (Lakowicz, 2006).

1.9.4 Spektrale Eigenschaften der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan

Die Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften von Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan in Wasser sind in Abb. 7 dargestellt. Phenylalanin weist die kürzesten Absorptions- (Maximum bei ≈ 250 nm) und Emissionswellenlängen (Maximum bei 282 nm) auf. Die Absorption bei

280 nm ist durch Tyrosin und Tryptophan bedingt. Bei Wellenlängen von 290 - 300 nm absorbiert hauptsächlich Tryptophan. Die von Tyrosin-Resten absorbierte Energie wird oft auf Tryptophan-Reste im selben Protein übertragen, wodurch die Fluoreszenz des Tyrosins gelöscht wird (Energie-Transfer). Das Emissionsmaximum von Tyrosin liegt bei 303 nm. Tryptophan emittiert unter den aromatischen Aminosäuren bei der längsten Wellenlänge (Maximum bei ca. 350 nm) und weist den größten Extinktionskoeffizienten ϵ auf (Teale & Weber 1957; Lakowicz, 2006).

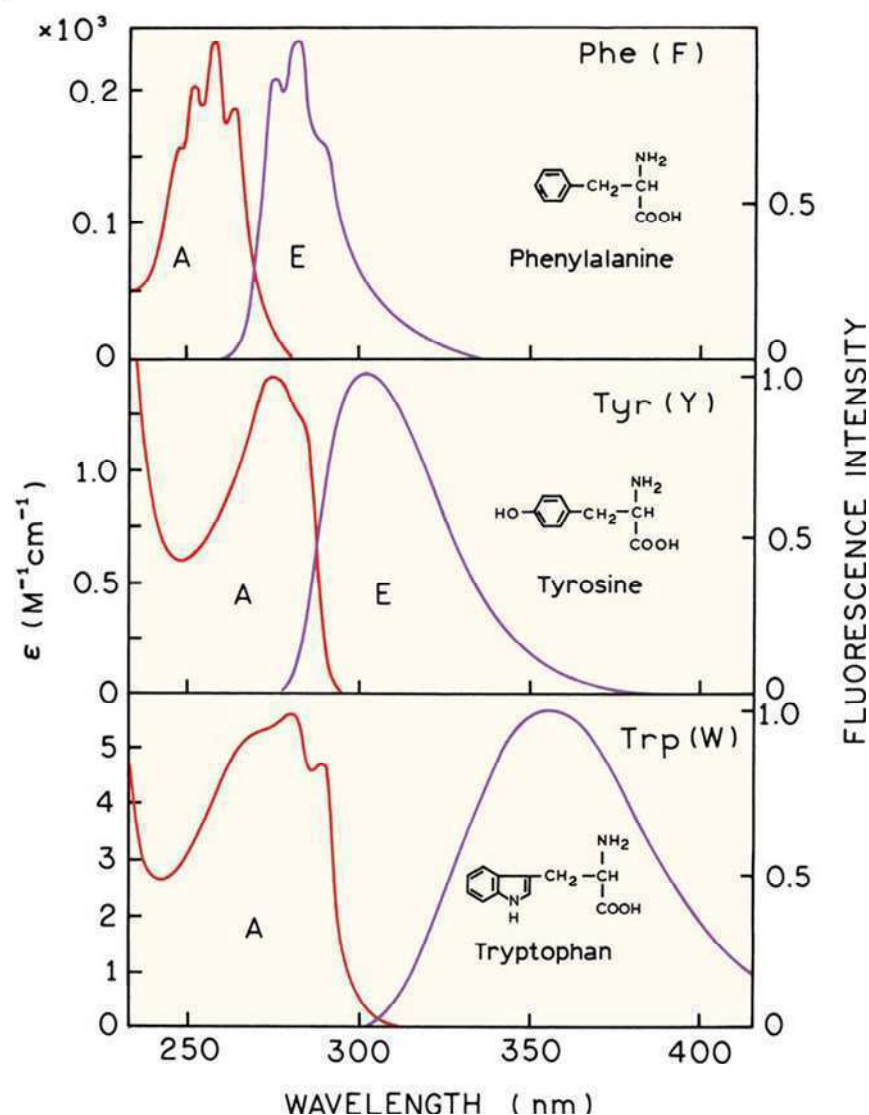


Abb. 7: Absorption- und Emissionsspektren der aromatischen Aminosäuren. Dargestellt ist das jeweilige Absorptions- (A) und Emissionsspektrum (E) der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan in wässriger Lösung (pH 7,0), sowie deren jeweilige Strukturformel (Lakowicz, 2006).

Verglichen mit dem Extinktionskoeffizienten von Tyrosin und Tryptophan im nahen UV-Bereich (200 - 380 nm) ist der des Phenylalanins unbedeutend (Abb. 8). Deshalb ist die Proteinfluoreszenz im Wesentlichen auf Tryptophan- und Tyrosin-Reste zurückzuführen. Bei Anregung zwischen 290 - 295 nm wird die Fluoreszenz von Proteinen durch die Fluoreszenz des Tryptophans dominiert, welches den größten Extinktionskoeffizienten aufweist.

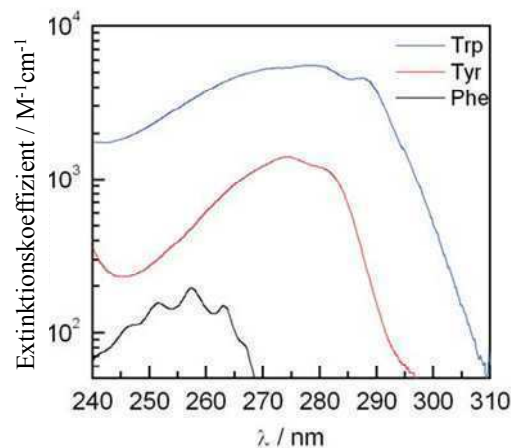


Abb. 8: Extinktionskoeffizienten der aromatischen Aminosäuren. Dargestellt sind die Extinktionskoeffizienten der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin (Phe), Tyrosin (Tyr) und Tryptophan (Trp) im nahen UV-Bereich (Gerken & Imhof, 2010).

Die aromatischen Aminosäuren weisen zudem verschiedene Quantenausbeuten auf. Die Quantenausbeute ist unabhängig von der Anregungswellenlänge und bezeichnet das Verhältnis von emittierten Photonen zu absorbierten Photonen und ist folglich kleiner oder gleich eins. Substanzen mit der größten Quantenausbeute, zu denen z. B. die Farbstoffe Rhodamine gehören, weisen die höchste Quantenausbeute auf. Die Quantenausbeute des fluoreszierenden Farbstoffes Rhodamin 101 beispielsweise liegt bei 1,0. Im Vergleich dazu sind die Quantenausbeuten der aromatischen Aminosäuren gering: Phenylalanin 0,024, Tyrosin 0,14 bzw. Tryptophan 0,13 (Chen, 1967). Der Vergleich der Quantenausbeuten sowie der Extinktionskoeffizienten der aromatischen Aminosäuren untereinander zeigt, dass die Fluoreszenz von Phenylalanin im Gegensatz zu der des Tryptophans und Tyrosins unbedeutend ist.

1.9.5 Tryptophan als Umgebungsmarker

Tryptophan reagiert unter den aromatischen Aminosäuren auf Änderungen seiner lokalen Umgebung. In vielen Fällen ändert sich das Emissionsverhalten des Tryptophans als Reaktion

auf Konformationsänderungen des Proteins (Kulinski *et al.*, 1997), auf die Proteinfaltung (Rischel *et al.*, 1996) und auf die Bindung eines Liganden (Kurzban *et al.*, 1989, Winterfeld *et al.*, 2009). Konformationsänderungen können durch Änderungen des pH-Wertes oder Temperaturänderungen erzeugt werden. Alle diese Vorgänge können zu Variationen in der Umgebung des Tryptophans führen indem dieses in einen hydrophoben Bereich eines Proteins eingebettet wird, in wässrige Bereiche gerät und dadurch exponiert vorliegt oder in eine amphiphile Grenzschicht beider Bereiche gelangt. Die Emission verändert sich dadurch hinsichtlich der Lage des Fluoreszenzmaximums, der Fluoreszenzintensität, der Fluoreszenz-Lebensdauer (Kap. 2.17.2) sowie der Anisotropie (Kap. 2.17.3). Durch Untersuchung dieser Parameter können Schlussfolgerungen über die Faltung/Entfaltung eines Proteins, die Bindung eines Substrats an ein Protein, die Zugänglichkeit eines Proteins usw. gezogen werden.

Durch ortsgerichtete Mutagenese können an gewünschten Stellen eines Proteins Tryptophan-Reste eingebracht werden, bzw. durch eine nicht fluoreszierende Aminosäure ersetzt werden. Dadurch ist es möglich genau festgelegte Stellen des Proteins zu untersuchen.

Die Tryptophan-Fluoreszenz wird üblicherweise bei 290 - 295 nm angeregt, da bei dieser Wellenlänge Tyrosin nicht angeregt wird. Die maximale Wellenlänge der Tryptophan-Fluoreszenz reicht je nach Umgebung des Tryptophans von ≈ 308 nm bis ≈ 352 nm. Azurin aus *Pseudomonas aeruginosa* enthält einen Tryptophan-Rest in einer stark apolaren Umgebung und hat ein Fluoreszenzmaximum bei ≈ 308 nm (Finazzi-Agrò *et al.*, 1970). Ein weiteres Extrembeispiel ist die Fluoreszenz von Glukagon. Das Fluoreszenzmaximum des Tryptophan-Restes liegt hier bei ≈ 352 nm. Dieser Tryptophan-Rest liegt vollständig exponiert in polarer Umgebung vor (Eftink & Ghiron, 1976).

1.9.6 Weitere Fluorophore

Zu den intrinsischen Fluorophoren gehören neben den bereits erwähnten aromatischen Aminosäuren, unter anderem auch natürliche Farbstoffe wie Carotinoide, Chlorophylle und Flavine sowie das grün fluoreszierende Protein GFP (green fluorescent protein). Diese Farbstoffe sowie das GFP fluoreszieren im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums. Flavine wie Riboflavin, FMN (Flavin Mononukleotid) und FAD (Flavinadenindinukleotid) absorbieren Licht im sichtbaren Bereich (≈ 450 nm) und die Emission erfolgt bei ≈ 525 nm (Lakowicz, 2006).

Das zu den Chlorophyllen gehörende Chlorophyll a absorbiert in Hexan gelöst bei ≈ 380 nm, woraufhin die Emission bei ≈ 715 nm erfolgt (Fräckowiak *et al.*, 1994).

β -Carotin, welches zu den Carotinoiden gehört, hat sein Absorptionsmaximum bei 463 nm wenn es in Chloroform gelöst ist. Die Emission erfolgt bei 540 nm (van Riel *et al.*, 1983).

Ein weiterer Fluorophor, das GFP, wurde ursprünglich in der Qualle *Aequorea victoria* entdeckt. Durch Anregung entweder im nahen UV oder mit blauem Licht (≈ 470 nm) fluoresziert dieses Protein grün (≈ 508 nm) (Shimomura *et al.*, 1962; Morise *et al.*, 1974).

1.10 Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzmessungen können in zwei Arten von Messungen eingeordnet werden: „steady-state“ und zeitaufgelöste-Messungen.

Bei der „steady-state“ Fluoreszenzspektroskopie wird die Probe mit einer kontinuierlichen Lichtquelle beleuchtet und das Emissionsspektrum (= Fluoreszenzspektrum) aufgezeichnet. Bei zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie wird die Probe mit einer gepulsten Lichtquelle angeregt. Der Fluoreszenz-Intensitätszerfall wird daraufhin mit einem schnellen Detektionssystem aufgenommen, das die Messung von Fluoreszenz-Intensitätszerfällen im Bereich von wenigen Pikosekunden bis hin zu einigen hundert Nanosekunden ermöglicht. Dadurch können Informationen über transiente Ereignisse, die während der Lebensdauer des angeregten Zustandes stattfinden erlangt werden. Dazu gehört z. B. die Rotation des gesamten Proteins, die von Segmenten der Polypeptidketten oder die Rotation einzelner Aminosäure-Seitenketten (Lakowicz, 2006).

1.11 Ziel der Arbeit

Durch Bindung von Pf3 coat kommt es zu Konformationsänderungen in der Tertiärstruktur von YidC. Diese molekulare Dynamik von YidC soll anhand von „steady-state“ und zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie genauer untersucht werden. Um diese Messungen durchzuführen werden YidC-Tryptophanmutanten verwendet, die jeweils nur einen Tryptophan-Rest an Position 354, 454 bzw. 508 enthalten. Zusätzlich wird eine Mutante verwendet, die Tryptophan-Reste an Position 332 und 334 enthält. Der jeweilige Tryptophan-Rest soll als intrinsischer Fluorophor dienen. Die verschiedenen Tryptophanmutanten müssen funktionell sein und sollen deshalb auf ihre Funktionalität hin untersucht werden. Zum einen wird getestet, ob die Mutanten den Wachstumsdefekt des *E. coli* YidC-Depletionsstammes

JS7131 komplementieren können. Zum anderen wird analysiert, ob das strikt von YidC abhängige Protein PClep mittels der Mutanten in die Cytoplasmamembran des Depletionsstammes inseriert werden kann. Nach Reinigung der YidC-Tryptophanmutanten sollen diese in Liposomen rekonstituiert und *in vitro* mit einer Tryptophan-freien Mutante von Pf3 coat (genannt Pf3W0 coat) titriert werden. Da sich die Tryptophan-Reste der YidC-Mutanten in bzw. nahe den periplasmatischen Bereichen von YidC befinden, können diese Regionen gezielt untersucht werden. Durch die Messung von Emissionsspektren und der Fluoreszenz-Lebensdauer soll die Umgebung der Tryptophan-Reste sowie mittels Anisotropie-Messungen die Beweglichkeit der Tryptophan-Reste jeweils vor und nach Titration mit Pf3W0 coat analysiert werden. Des Weiteren sollen die Emissionsspektren sowie die Fluoreszenz-Lebensdauern von gereinigten, Detergenz-solubilisierten YidC-Tryptophanmutanten gemessen und mit denen der rekonstituierten Mutanten verglichen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Agarosegelkammer	Owl Separation Systems, Rochester, NY (USA)
Autoklaven	Varioklav Typ 75S, H + P Labortechnik AG, Oberschleißheim (D) Varioklav Typ 135S, H + P Labortechnik AG, Oberschleißheim (D)
Bio-Beads SM-2	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA (USA)
Blotkammer	Owl Separation Systems Inc., Portsmouth, NH (USA)
Dialyseschlauch	Visking Typ 20/32, 14 kDa Ausschlussvolumen, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (D)
Elektrophoresekammer	Vertical Dual Gel Mini Electrophoresis Unit, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Extruder	Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL (USA)
Feinwaage	Sartorius Competence CP224S, Sartorius AG, Göttingen (D)
Filterpapier	Whatmanfilter GB 005, Whatman GmbH, Dassel (D)
French Pressure Cell Press	American Instrument Company, Inc., MD (USA)
Geltrockner	gel dryer, Model 583, Bio Rad Laboratories, Richmond, CA (USA)
Inkubationsschüttelschrank	Certomat BS-1, Sartorius AG, Göttingen (D)
LED (light emitting diode)	PLS 290, PicoQuant, Berlin (D)
Membranfilter	0,2 µm, Sartorius AG, Göttingen (D)
Netzgeräte	Standard Power Pack P25, Biometra GmbH, Göttingen (D) PowerPac 200, Bio Rad Laboratories, Richmond, CA (USA)

2. Material und Methoden

Nitrozellulose Transfermembran	Protran, Whatman GmbH, Dassel (D)
Partikelgrößen-Messgerät	Sub-Micron Particle Analyzer, Model N4 SD, Coulter Electronics, Inc., Hialeah, FL (USA)
PCR-Geräte	T Gradient, Biometra GmbH, Göttingen (D) Gene Amp PCR System 9600, Perkin Elmer, Waltham, MA (USA)
Petrischalen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (D)
pH-Meter	620 pH-Meter, Metrohm AG, Herisau (CH) 827 pH lab, Metrohm AG, Herisau (CH)
Phosphorimager	BAS Reader-1500 Fujifilm, Raytest GmbH, Straubenhardt (D)
Rotationsverdampfer	Rotavapor-R, Büchi Labortechnik AG, Flawil (CH)
Säulenmaterial	Ni-NTA Superflow, Qiagen GmbH, Hilden (D)
Sequenziergerät	LI-COR DNA sequencer readir 4200, LI-COR Biosciences GmbH, Lincoln, NE (USA)
Spektrometer	Digital Photometer LP2W, Dr. Bruno Lange GmbH, Berlin (D) Fluorolog FL3-22, Horiba Jobin Yvon GmbH, Unterhaching (D) Life-Time Spektrometer FluoTime 100, PicoQuant GmbH, Berlin (D)
Thermoblock	Nr. 1102, SKS Biomedical Instruments Ltd., Luton (UK)
Thermomixer	Thermomixer compact, Eppendorf GmbH, Hamburg (D)
Thermostate	F10, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach (D) Haake F3,

Vortex-Gerät	Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen (D)
Waagen	Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY (USA)
	Sartorius Basic, Sartorius AG, Göttingen (D)
	Sartorius 1264 MP, Sartorius AG, Göttingen (D)
Wasseraufbereitungsanlage	Milli Q water purification system, Millipore GmbH, Eschborn (D)
Wasserbadschüttler	Infors AG, Bottmingen (CH)
Zentrifugen	Avanti J-25, Beckman Coulter, Krefeld (D)
	Air-Driven-Ultracentrifuge, Beckman Coulter, Krefeld (D)
	Nr. 5417R, Eppendorf GmbH, Hamburg (D)
	Optima LE-80K Ultracentrifuge, Beckman Coulter, Krefeld (D)
	Speed Vac Concentrator, Bachofer, Reutlingen (D)

2.2 Chemikalien

Aceton	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (D)
Agar	GERBU Biotechnik GmbH, Gaiberg (D)
Agarose (ultrapure)	USB Corporation, Cleveland, OH (USA)
Aminosäuren	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
APS	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Arabinose (L+)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (D)
Bacto-Hefeextrakt	Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire (GB)
Bacto-Trypton	Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire (GB)
Borsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Bromphenolblau	Bio Rad Laboratories, Richmond, CA (USA)
CaCl ₂	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Chloroform	AppliChem, Darmstadt (D)

2. Material und Methoden

Coomassie brilliant blue R250

	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg (D)
CuSO ₄	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
DDM	GERBU Biotechnik GmbH, Gaiberg (D)
DTT	GERBU Biotechnik GmbH, Gaiberg (D)
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Essigsäure	BASF, Ludwigshafen (D)
Ethanol	Fisher Scientific, Leicestershire (UK)
Ethidiumbromid	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Ficoll 400	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Folin-Reagenz	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Glycerin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Glukose (D+)	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Harnstoff	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
HCl (37% rauchend)	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Imidazol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
IPTG	AppliChem, Darmstadt (D)
Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
KAc	Merck KGaA, Darmstadt (D)
KCl	Merck KGaA, Darmstadt (D)
KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
K ₂ HPO ₄	Merck KGaA, Darmstadt (D)
LUDOX [®] HS-30	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Long Ranger	FMC Bio Products, Rockland, ME (USA)
Magermilchpulver	Heirler Cenovics GmbH, Radolfzell (D)
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (D)
MgSO ₄	Merck KGaA, Darmstadt (D)
MnCl ₂	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Monomerlösung	Rotiphorese Gel 30, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (D)
MOPS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)
NaCl	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)
NaHCO ₃	Merck KGaA, Darmstadt (D)

2. Material und Methoden

NaOH	Merck KGaA, Darmstadt (D)
NATA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
NATE	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Natriumtartrat	Merck KGaA, Darmstadt (D)
NH ₄ Cl	Riedel-de Haën, Seelze (D)
Ponceau S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
PPO	Merck KGaA, Darmstadt (D)
RbCl	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg (D)
Salzsäure	Merck KGaA, Darmstadt (D)
SDS	Merck KGaA, Darmstadt (D)
[³⁵ S]-Methionin	Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Cleveland, OH (USA)
TCA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Thiamin	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Tris	USB Corporation, Cleveland, OH (USA)
Tween 20	Merck KGaA, Darmstadt (D)

2.3 Antibiotika

Ampicillin	USB Corporation, Cleveland, OH (USA), 100 mg/ml Stammlösung, 100 µg/ml Arbeitskonzentration Die Stammlösung wurde steril filtriert.
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D), 100 mg/ml Stammlösung, 25 µg/ml Arbeitskonzentration Die Stammlösung wurde steril filtriert.

2.4 Antikörper

Anti-His	monoklonaler Antikörper, IgG _{2a} , gegen das His-Peptid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Anti-P1	polyklonaler Antikörper, gegen die P1-Domäne von YidC, Institutsbestand

2. Material und Methoden

Anti-YidC	polyklonaler Antikörper, gegen den C-Terminus von YidC, Institutsbestand
Anti-Rabbit	IgG, mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Anti-Mouse	IgG, mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Cleveland, OH (USA)

2.5 Medien

LB-Medium (w/v)	Bacto-Trypton	1%
	Bacto-Hefeextrakt	0,5%
	NaCl	1%
	pH 7,5 mit NaOH	
	Das Medium wurde autoklaviert.	
LB-Agar	LB-Medium + 1,5% Agar (w/v) Nach dem Autoklavieren konnte LB-Agar mit den gewünschten Zusätzen versetzt und in Petrischalen gegossen werden (Kap. 2.15.11).	
M9-Minimalmedium	ddH ₂ O	40 ml
	10-fach M9-Salzlösung	5 ml
	MgSO ₄ ·2H ₂ O (1 M)	500 µl
	CaCl ₂ (1 M)	5 µl
	Das Medium wurde autoklaviert und kurz vor Gebrauch wurden die folgenden, steril filtrierte Komponenten zugegeben:	
19 AS ohne Methionin	5 ml	
(je 200 µg/ml)		
Carbonquelle	500 µl	
(20% Glukose/Arabinose (w/v))		
Thiamin (50 mg/ml)	250 µl	

2. Material und Methoden

M9-Salzlösung (10-fach)	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	60 g
	KH ₂ PO ₄	30 g
	NH ₄ Cl	10 g
	NaCl	5 g
	ddH ₂ O	1000 ml

Die Lösung wurde autoklaviert.

2.6 Puffer und Lösungen

Coomassie-Färbelösung	Coomassie brilliant blue	0,025% (w/v)
	Methanol	40% (v/v)
	Essigsäure	7% (v/v)
DNA-Probenpuffer (10-fach)	Tris/HCl (pH 7,5)	10 mM
	EDTA	50 mM
	Ficoll 400	10% (w/v)
	BPB	0,25% (w/v)
Entfärber (v/v)	Essigsäure	10%
Fixier-Lösung (v/v)	Methanol	40%
	Essigsäure	7%
PBS (10-fach)	NaCl	1,5 M
	KCl	30 mM
	KH ₂ PO ₄	15 mM
	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	80 mM
Ponceau S-Lösung (v/v)	Ponceau S	0,1% (w/v)
	Essigsäure	5% (v/v)
SDS-Laufpuffer	Tris	0,025 M
	Glycin	0,192 M
	SDS	0,1% (w/v)

2. Material und Methoden

pH 8,3 mit HCl

SDS-Probenpuffer (2-fach) Lösung 1 : Lösung 2 : 1 M DTT = 5:4:1

Lösung 1:

1 M Tris 2 ml

0,2 M EDTA pH 7,0 1 ml

ddH₂O 7 ml

Die Lösung wurde steril filtriert.

Lösung 2:

1 M Tris pH 6,8 4 ml

25% SDS 16 ml

100% Glycerin 14 ml

0,5% Bromphenolblau 14 ml

Die Lösung wurde steril filtriert.

TBE-Puffer (10-fach) Tris 0,89 M
Borsäure 0,89 M
EDTA 20 mM

TBS-Puffer (10-fach) NaCl 1,5 M
KCl 30 mM
Tris 0,25 M
pH 7,4 mit HCl

TE-Puffer Tris 10 mM
EDTA 1 mM
pH 8,0 mit HCl
Der Puffer wurde autoklaviert.

TFB1-Puffer KAc 30 mM
MnCl₂ 50 mM
RbCl 100 mM

2. Material und Methoden

	CaCl ₂	10 mM
	Glycerin	15% (v/v)
	pH 5,8 mit Essigsäure	
	Der Puffer wurde steril filtriert.	
TFB2-Puffer	MOPS	10 mM
	CaCl ₂	75 mM
	RbCl	10 mM
	Glycerin	15% (v/v)
	pH 7,0 mit HCl	
	Der Puffer wurde steril filtriert.	
Transferpuffer (10-fach)	Tris	50 mM
	Glycin	200 mM

2.7 Kits

Zyppy Plasmid Miniprep Kit,

Zymo Research Corporation, Orange, CA (USA)

Ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit,

GE Healthcare, Buckinghamshire (UK)

ECL Immobilon Western Chemilumineszenz HRP Substrate,

Millipore Corporation, Billerica, MA (USA)

Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit,

USB, Affymetrix, Inc., Cleveland, OH (USA)

2.8 Materialien für ECL

Entwickler

Agfa Rodinal,

Agfa Gevaert AG, Leverkusen (D)

Fixierer

Agfa Agefix,

Agfa Gevaert AG, Leverkusen (D)

Röntgenfilm,

Agfa Cronex 5,

Agfa Gevaert AG, Leverkusen (D)

2.9 Optische Filter und Polarisatoren

Bandpassfilter	HC 357/44, AHF Analystechnik, Tübingen (D) FF01-310/25, Semrock, Inc., Rochester, NY (USA)
Quarz-Polarisator	Linos Photonics AG, Göttingen (D)
Dünnschicht-Polarisator	Transmissionswellenlänge: 330 - 450 nm, Linos Photonics AG, Göttingen (D)

2.10 Enzyme

DNA-Polymerasen	Thermo Sequenase, USB, Affymetrix, Inc., Cleveland, OH (USA) Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase, New England Biolabs GmbH, Frankfurt (D)
Ligase	T4-DNA-Ligase, MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot (D)
Proteaseinhibitor Cocktail	Complete, EDTA-free, Roche Diagnoststics GmbH, Mannheim (D)
Restriktionsendonukleasen	<i>HindIII</i> , <i>KpnI</i> , <i>NcoI</i> , <i>NdeI</i> , <i>XbaI</i> , MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot (D)
Trypsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)

2.11 Phospholipide

1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine (DOPC), Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL (USA)
1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-(1'- <i>rac</i> -glycerol) (DOPG), Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL (USA)

2.12 Bakterienstämme

E. coli XL-1 blue

Genotyp: *recA1 thi supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 lac F' (proAB⁺ lacI^q lacZΔM15 Tn10)*

Der Stamm *E. coli* XL-1 blue ist ein Derivat des *E. coli*-Stammes K12 (Bullock *et al.*, 1987). Es handelt sich dabei um einen Sicherheitsstamm, welchem Pathogenitätsgene fehlen. Sein *lacZ*-Genotyp ermöglicht eine Blau-Weiß-Selektion mit X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid). *E. coli* XL-1 blue wird für die Transformation und Isolierung von Plasmid-DNA verwendet.

E. coli JS7131

Genotyp: *Δ(codB-lac)3 galK16 galE15 λ⁻ relA1 rpsL150 spoT1 hsdR2 ara⁺ attB::R6Kori ParaBAD⁻yidC⁺ (Spec^r) ΔyidC*

Der Stamm *E. coli* JS7131 (Samuelson *et al.*, 2000) ist ein YidC-Depletionsstamm, in dem das genomische Wildtyp *yidC*-Gen von Basenpaar 745 - 1566 deletiert ist. Ein alternatives *yidC*-Gen ist in den *attB* Locus inseriert und steht unter Kontrolle eines *araBAD*-Promotors und eines Operators. Dadurch wird das *yidC*-Gen durch Zugabe von Arabinose exprimiert und durch Zugabe von Glukose reprimiert. Des Weiteren weist dieser Stamm eine Spectinomycinresistenz auf.

E. coli C43(DE3)

Der *E. coli* Stamm C43(DE3) ist eine Mutante des *E. coli* Stammes C41(DE3) (Miroux & Walker, 1996). Dieser Stamm wiederum ist eine Spontanmutante des *E. coli* Stammes BL21(DE3), dessen Genotyp nicht näher bestimmt wurde. C43(DE3) wird für die Überexpression von Membranproteinen verwendet.

2.13 Plasmide

Tabelle 1: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide. Angegeben sind der Name sowie die Eigenschaften und zugehörige Referenz des jeweiligen Plasmids.

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pET-16b	T7-Promotor, Shine-Dalgarno-Sequenz, N-terminaler His ₁₀ -Tag, β -Lactamase-Gen (Ampicillinresistenz)	Studier <i>et al.</i> , 1990; Novagen, Inc., Madison, WI (USA)
pGZ119EH	Tac-Promotor, Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen (Chloramphenicolresistenz)	Lessl <i>et al.</i> , 1992
pMS119EH	Tac-Promotor, β -Lactamase-Gen (Ampicillinresistenz)	Balzer <i>et al.</i> , 1992
pT7-7	T7-Promotor, Shine-Dalgarno-Sequenz, β -Lactamase-Gen (Ampicillinresistenz)	Tabor & Richardson, 1985
pUC19	β -Lactamase-Gen (Ampicillinresistenz)	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985

2.14 Primer

2.14.1 Sequenzierprimer

Alle in dieser Arbeit verwendeten Sequenzierprimer (Tab. 2) waren fluoreszenzmarkiert (IRD 800). Tac-forward, Tac-back, Imid und Imid-2 wurden von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg (D) bezogen. T7-forward und T7-reverse wurden von der Firma Biomers.net GmbH, Ulm (D) bezogen.

Tabelle 2: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Sequenzierprimer. Angegeben sind der Name sowie die Sequenz und Annealingtemperatur des jeweiligen Sequenzierprimers.

Name	Sequenz	Annealingtemperatur
T7-forward	5`-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3`	54°C
T7-reverse	5`-CGC TGA GAT AGG TGC AC-3`	58°C
Tac-forward	5`-GAC AAT TAA TCA TCG GCT CG-3`	55°C
Tac-back	5`-GGC TGA AAA TCT TCT CTC ATC CG-3`	58°C
Imid	5`-GCA ACA GTA TTT CGC GAC GG-3`	58°C
Imid-2	5`-CGC TTA TGT GCT GGC TGA AGG TC-3`	62°C

2.14.2 PCR-Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten PCR-Primer (Tab. 3) wurden von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg (D) bezogen.

Tabelle 3: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten PCR-Primer. Angegeben sind der Name sowie die Sequenz und Annealingtemperatur des jeweiligen PCR-Primers.

Name	Sequenz	Annealingtemperatur
fw- <i>Nco</i> I	5`-GTA CAC CAT GGC GAA GAT GCG TAT GTT GCA GCC G-3`	63°C
rv- <i>Hind</i> III	5`-CTA GAA GCT TCA GTG GTG GTG GTG GTG GTG GTG GTG GTG GTG GGA TTT TTT CTT CTC GCG GC-3`	72°C

2.15 Molekularbiologische Methoden

2.15.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* XL-1 blue (Minipräparation)

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* XL-1 blue wurde nach Anleitung des Zippy Plasmid Miniprep Kits (Zymo Research Corporation, Orange, CA, USA) durchgeführt. Bei dieser Methode werden *E. coli*-Zellen einer alkalischen Lyse unterzogen und chromosomale DNA, Proteine sowie Zellwandbestandteile von der Plasmid-DNA getrennt.

600 µl einer *E. coli* Übernachtskultur wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 100 µl 7x Lysepuffer versetzt und zum Mischen mehrmals invertiert. Nach Zugabe von 350 µl kaltem Neutralisierungs-Puffer wurde der Ansatz erneut mehrmals invertiert und für 3 min bei 15000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Zymo-Spin II-Säule überführt, welche in ein Collection Tube eingesetzt und für 15 s bei 15000 g zentrifugiert wurde. Der Durchlauf wurde verworfen und 200 µl Endo-Waschpuffer wurden auf die Säule gegeben. Nach erneuter Zentrifugation (15 s, 15000 g) wurden 400 µl Zippy Waschpuffer auf die Säule gegeben und diese für 30 s bei 15000 g zentrifugiert. Danach wurde die Säule in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gesetzt und die Plasmid-DNA in 50 µl ddH₂O oder in 50 µl 1x TE-Puffer durch Zentrifugation (30 s, 15000 g) eluiert. Die isolierte Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.15.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde spektrometrisch bestimmt. Es gilt, dass bei doppelsträngiger DNA eine Extinktion von 1 bei einer optischen Dichte von 260 nm einer Konzentration von 50 µg/ml entspricht.

Jede zu messenden DNA-Probe wurde 1:20 mit ddH₂O verdünnt und in eine Quarzküvette gegeben. Nun konnte die Extinktion bei 260 nm mittels Photometer bestimmt werden. Die DNA-Konzentration wurde daraufhin nach folgender Formel berechnet:

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

c = DNA-Konzentration

E₂₆₀ = Extinktion bei λ = 260 nm

F = Verdünnungsfaktor

2.15.3 Restriktionsspaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind eine Gruppe von Enzymen, die von Bakterien abstammen und DNA schneiden. Die hier verwendeten, kommerziell erhältlichen Restriktionsendonukleasen (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D) gehören der Klasse II an, die kurze definierte Nukleotidsequenzen (4 - 6 Nukleotide) des DNA-Moleküls erkennen und die kovalente Phosphodiesterbindung der DNA an bestimmten Stellen innerhalb der definierten Sequenz

schneiden. Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen sind in Tabelle 4 angegeben.

Die durch Minipräparation (Kap. 2.15.1) erhaltene Plasmid-DNA wurde mit 1 µl der gewünschten Restriktionsendonuklease und dem entsprechenden 10x Puffer versetzt. Der Ansatz hatte ein Volumen von 10 - 30 µl und wurde für mindestens 2 h bei der für das jeweilige Enzym angegebenen Temperatur im Thermoblock inkubiert. Bei der Verwendung von zwei verschiedenen Enzymen pro Ansatz wurden die Pufferbedingungen mit Hilfe des Fermentas Double-Digest-Programms (www.fermentas.com/en/tools/doubledigest) ermittelt. Anschließend wurde die jeweilige Restriktionsendonuklease entweder durch Hitze bei der für das Enzym angegebenen Temperatur inaktiviert, oder der Ansatz wurde auf ein Agarosegel aufgetragen (Kap. 2.15.4).

Tabelle 4: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen. Angegeben sind der Name sowie die Erkennungssequenz und die Parameter der Hitzeinaktivierung der jeweiligen Restriktionsendonuklease.

Name	Erkennungssequenz	Hitzeinaktivierung
<i>Hind</i> III	5`-A↓AGCTT-3`	65°C, 20 min
<i>Kpn</i> I	5`-GGTAC↓C-3`	—
<i>Nco</i> I	5`-C↓CATGG-3`	65°C, 20 min
<i>Nde</i> I	5`-CA↓TATG-3`	65°C, 20 min
<i>Pst</i> I	5`-CTGCA↓G-3`	80°C, 20 min
<i>Xba</i> I	5`-T↓CTAGA-3`	65°C, 20 min

2.15.4 Agarosegel-Elektrophorese

Mittels Agarosegel-Elektrophorese kann DNA getrennt und identifiziert werden. Durch die negativen Ladungen des Phosphatrückgrats wandert DNA als Anion zur Anode. Die Trennung der DNA hängt von deren Länge und Konformation ab. Durch Zugabe von Ethidiumbromid, welches in die doppelsträngige DNA interkaliert und unter UV-Licht fluoresziert, werden die DNA-Fragmente sichtbar gemacht.

Eine Konzentration von 0,7 - 1,5% Agarose wurde durch Aufkochen in 40 ml TBE-Puffer gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wurden 0,5 mg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Die Lösung wurde dann in eine horizontale Gelapparatur gegossen und der Probenplatzhalter wurde eingesetzt. Nach dem Aushärten der Gellösung für 30 min, wurde diese mit 1x TBE-

Puffer überschichtet und die in DNA-Probenpuffer aufgenommenen DNA-Proben konnten in Taschen innerhalb des Agarosegels gegeben werden. Der Probenpuffer dient dazu die Dichte der Lösung zu erhöhen, sodass ein Diffundieren der Probe aus den Taschen heraus verhindert wurde. Als Längenstandard wurde Lambda-DNA, die von der Restriktionsendonuklease *HindIII* bzw. *PstI* geschnitten wurde, mitgeführt (Kap. 2.15.5). Anhand der Wanderstrecke dieser Standards konnte das Molekulargewicht der DNA-Probe bestimmt werden. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 75 - 90 V durchgeführt und das Agarosegel anschließend unter UV-Licht analysiert.

2.15.5 Herstellung der Längenstandards λ *HindIII* und λ *PstI*

Zu 40 μ l λ -DNA und 47 μ l H₂O, wurden 10 μ l Orange buffer und 3 μ l *PstI* bzw. 10 μ l Red buffer und 3 μ l *HindIII* gegeben. Der Restriktionsverdau der λ -DNA durch das entsprechende Enzym wurde für 2 h oder über Nacht bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurden 8 μ l jedes Ansatzes entnommen, mit 2 μ l DNA-Probenpuffer versetzt und auf ein Agarosegel aufgetragen um zu prüfen, ob der Restriktionsverdau erfolgreich war (Kap. 2.15.4). Wenn die gesamte λ -DNA geschnitten war, wurden zu jedem Ansatz 150 μ l TE-Puffer, 5 μ l EDTA (0,5 M) und 50 μ l DNA-Probenpuffer gegeben. Die Größen der einzelnen Banden, der mit dem jeweiligen Enzym geschnittenen λ -DNA, sind bekannt. Die Längenstandards konnten nun verwendet werden.

2.15.6 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte nach Anleitung des Illustr GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kits (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

Das Agarosegelstück mit der zu isolierenden DNA wurde unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Das Reaktionsgefäß wurde zuvor gewogen, sodass die nun einzusetzende Menge an Capture buffer type 3 (10 μ l/10 mg Gelstück) berechnet werden konnte. Der Ansatz wurde bei 60°C inkubiert, bis das Agarosestück gelöst war. Der Ansatz wurde daraufhin auf eine GFX MicroSpin Säule, welche sich in einem Collection tube befand, gegeben, für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 16000 g für 30 s zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die an die Säule gebundene DNA mit 500 μ l Wash buffer type 1 mittels

Zentrifugation (16000 g, 30 s, RT) gewaschen. Der Durchlauf wurde erneut verworfen und die Säule trocken zentrifugiert (16000 g, 30 s, RT). Dann wurde die DNA für 1 min bei Raumtemperatur in 40 µl Elution buffer type 6 inkubiert und anschließend durch Zentrifugation (16000 g, 1 min, RT) in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß eluiert.

2.15.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Durch das Schneiden von zwei verschiedenen DNA-Molekülen mit derselben Restriktionsendonuklease entstehen komplementäre Enden. Um diese zu verbinden wird die T4-DNA-Ligase verwendet. Die Ligase knüpft unter ATP-Verbrauch Phosphodiesterbindungen zwischen dem 3'-Hydroxylende des einen und dem 5'-Phosphatende des anderen DNA-Fragments, sodass diese dauerhaft miteinander verbunden werden.

Für die Ligation wurden Insert- und Vektor-DNA im Verhältnis 3:1 eingesetzt. Die Menge wurde durch Agarosegel-Elektrophorese abgeschätzt (Kap. 2.15.4). Nach Zugabe von 2 µl 10x Ligasepuffer wurde der Ansatz auf 19 µl mit ddH₂O aufgefüllt und 1 µl T4-DNA-Ligase zugegeben. Der Ansatz wurde über Nacht bei 7°C inkubiert. Anschließend wurden 10 µl des Ligationsansatzes in *E. coli* XL-1 blue transformiert (Kap. 2.15.9).

2.15.8 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden verändert nach Hanahan (Hanahan, 1983) hergestellt. Wie diese Kompetenz im Detail erzeugt wird, ist nicht bekannt.

100 ml LB-Medium wurden 1:100 mit der entsprechenden *E. coli* Übernacht-Kultur beimpft und bei 37°C im Wasserbadschüttler bis zu einer OD₆₀₅ von 0,5 inkubiert. Daraufhin wurde die Kultur auf Eis abgekühlt und in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (3000 g, 10 min, 4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet auf Eis in 30 ml TFB1-Puffer resuspendiert. Nach 1,5 h Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut zentrifugiert (3000 g, 10 min, 4°C) und das Zellpellet in 2 ml TFB2-Puffer auf Eis resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.15.9 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Als Transformation wird die Aufnahme von DNA in kompetente Bakterienzellen bezeichnet. Die Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen wurde verändert nach Hanahan (Hanahan, 1983) durchgeführt.

1 µl Plasmid-DNA (50 - 200 ng DNA) bzw. 10 µl Ligationsansatz (Kap. 2.15.7) wurde zu 50 µl auf Eis aufgetauten, kompetenten *E. coli*-Zellen gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Daraufhin erfolgte im Thermoblock für 90 s bei 42°C ein Hitzeschock mit anschließender Inkubation auf Eis für 2 min. Nach Zugabe von 100 µl LB-Medium wurden die Zellen für 1 h bei 37°C im Thermoschüttler leicht geschüttelt und auf antibiotikahaltigen LB-Agar-Platten ausplattiert. Es sollten somit nur Zellen wachsen, die das gewünschte Plasmid mit dem Gen, das die entsprechende Antibiotikaresistenz vermittelt, enthielten. Nach Inkubation für 16 h bei 37°C konnten Einzelkolonien gepickt werden. Jeweils eine Einzelkolonie wurde in 2 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt und für 16 h bei 37 °C im Wasserbadschüttler inkubiert. Diese Kultur wird im Folgenden als Übernachtskultur bezeichnet.

2.15.10 Herstellung von Glycerin-Kulturen

Durch das Herstellen von Glycerin-Kulturen des gewünschten *E. coli*-Stammes konnte dieser konserviert und zum Beimpfen von LB-Medium verwendet werden. Dazu wurden 100 µl steriles Glycerin in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt. 400 µl der gewünschten *E. coli*-Übernachtskultur (Kap. 2.15.9) wurden zugegeben und mit Hilfe des Vortex-Gerätes (Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY, USA) gemischt. Die Glycerin-Kultur wurde dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.15.11 Herstellung von LB-Agar-Platten mit gewünschten Komponenten

Zur Herstellung von LB-Agar-Platten wurde dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 1,5% Agar (w/v) hinzugefügt. Nach dem Autoklavieren wurde das Medium bei Raumtemperatur auf ca. 50°C abgekühlt und daraufhin mit dem gewünschten Antibiotikum (Kap. 2.3) bzw. eine Carbonquelle (Glukose/Arabinose, Endkonzentration 0,2% (w/v)) oder IPTG (Endkonzentration 1 mM) versetzt. Nach leichtem Mischen der Komponenten durch

Schwenken konnten sterile Petrischalen mit dem Medium befüllt werden. Der LB-Agar wurde anschließend bei Raumtemperatur aushärten gelassen.

2.15.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (= Polymerase Chain Reaction, PCR) können beliebige DNA-Sequenzen spezifisch *in vitro* vervielfältigt werden (Saiki *et al.*, 1985). Die dadurch entstandenen Amplifikate können mittels Agarosegel-Elektrophorese isoliert werden (Kap. 2.15.4). In die Reaktion werden template-DNA, Oligonukleotide, Desoxynukleotide (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), thermostabile DNA-Polymerase, Puffer und Salze eingesetzt. Als template können Plasmide, chromosomale DNAs und PCR-Produkte dienen. Durch eine Denaturierung bei ca. 90°C werden die beiden Stränge der DNA getrennt. An die nunmehr einzelsträngige DNA binden durch das Absenken der Temperatur auf ca. 50°C kurze Oligonukleotide (Primer), wobei der sense-Primer komplementär zum Plusstrang, der antisense-Primer komplementär zum Minusstrang des templates ist (Annealing). Die thermostabile DNA-Polymerase benutzt die freien 3'-OH-Gruppen der beiden Primer, um aus den Desoxynukleotiden bei ca. 72°C (Temperaturoptimum des Enzyms) die komplementären Stränge in 5'→3'-Richtung zwischen den flankierenden Primern zu synthetisieren (Elongation). Dieses Temperaturprofil wird bis zu 35x wiederholt.

Die Amplifikation erfolgte in einem programmierbaren Thermocycler, der ein gewünschtes „PCR-Programm“ mit den notwendigen Temperaturen zur Denaturierung, zum Annealing und zur Elongation sowie die Anzahl der Zyklen regelte. Für die PCR wurden folgende Komponenten in einem Reaktionsgefäß gemischt, wobei die Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase (New England Biolabs GmbH, Frankfurt, D) als letztes zugegeben wurde:

5x Puffer mit MgCl ₂	10 µl
10 mM dNTPs	1 µl
sense-Primer	0,5 µM
antisense-Primer	0,5 µM
template-DNA	10 ng
DNA-Polymerase	0,5 µl
H ₂ O (nukleasefrei)	auf 50 µl

Die PCR wurde mit den in Tabelle 5 angegebenen Zyklusschritten durchgeführt.

Tabelle 5: Programm des Thermocyclers zur Durchführung einer PCR. Angegeben ist der jeweilige Reaktionsschritt mit entsprechender Temperatur, Dauer und Anzahl der Zyklen.

Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Dauer (min)	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	98	3:00	1
Denaturierung	98	1:00	30
Primerannealing	primerabhängig	0:40	
Elongation	72	0:20 (30 s/kb)	
finale Elongation	72	5:00	1
Endtemperatur	4	∞	

2.15.13 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA wurde nach der Didesoxymethode von Sanger (Sanger *et al.*, 1977) sequenziert. Dabei wird die DNA ausgehend von einem fluoreszenzmarkierten Primer *in vitro* amplifiziert. Zusätzlich zu den vier Desoxynukleotiden (dA, dC, dG und dT) wird zu jedem Reaktionsansatz ein Didesoxynukleotid (ddA, ddC, ddG oder ddT) gegeben, welches die DNA-Polymerase an der Kettenverlängerung hindert. Im Ansatz, der beispielsweise ddA enthält, liegen nach Synthese DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge vor, die alle mit einem ddA enden. Die DNA-Fragmente aller vier Ansätze werden mittels Gel-Elektrophorese der Länge nach getrennt. Für die Sequenzierung von DNA mit dem LI-COR Sequenziergerät (LI-COR Biosciences GmbH, Lincoln, NE, USA) werden Primer benötigt, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Diese werden am unteren Ende der Gelapparatur durch einen Infrarotlaser angeregt und die Fluoreszenz detektiert. Das Signal wird abhängig von der Zeit als zweidimensionales Bild gespeichert. Mit dieser Methode können bis zu 800 bp gelesen und am Computer mittels e-Seq V3.0-Software (LI-COR Biosciences GmbH, Lincoln, NE, USA) ausgewertet werden. Die Sequenzierungs-Reaktion wurde nach Anleitung des Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kits (USB, Affymetrix, Inc., Cleveland, OH, USA) durchgeführt.

4 µl einer Mischung aus den 4 verschiedenen dNTPs und jeweils einem ddNTP wurden in 4 PCR-Reaktionsgefäße vorgelegt. In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 13 µl Plasmid-DNA, 2 µl Reaktionspuffer, 1 µl fluoreszenzmarkierter Primer (2 pmol/µl; Tab. 2) und 1,5 µl Thermo-Sequenase (DNA-Polymerase) gemischt. Je 4 µl dieses Reaktionsansatzes wurden in

die vorbereiteten Reaktionsgefäße gegeben. Die Amplifikation des DNA-Abschnitts wurde mit den in Tabelle 6 angegebenen Zyklusschritten durchgeführt.

Tabelle 6: Programm des Thermocyclers zur Durchführung der Sequenzierreaktion. Angegeben ist der jeweilige Reaktionsschritt mit entsprechender Temperatur, Dauer und Anzahl der Zyklen.

Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Dauer (min)	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	95	2:00	1
Denaturierung	95	0:30	50
Primerannealing	primerabhängig	0:30	
Elongation	72	1:00	
Endtemperatur	4	∞	1

Anschließend wurden in jedes Reaktionsgefäß 3 µl Stopplösung gegeben. Die zu sequenzierenden Proben wurden vor dem Auftragen auf das Sequenziergel für 2 min bei 80°C erhitzt.

2.15.14 Herstellung eines Sequenziergels

21 g Harnstoff wurden in 6 ml Acrylamid Long Ranger, 5 ml 10x TBE und 10 ml ddH₂O bei 37°C gelöst und mit ddH₂O auf 50 ml aufgefüllt. 3 ml dieser Lösung wurden als Bodengel verwendet und nach Zugabe von 32 µl APS (10% Stammlösung) sowie 4 µl TEMED von unten zwischen die vorbereiteten Glasplatten pipettiert. Der Rest der Lösung wurde mittels Wasserstrahlpumpe für 10 min entgast und diente als Sammelgel. Nach Zugabe von 250 µl APS (10% Stammlösung) und 25 µl TEMED wurde diese Sammelgel-Lösung von oben mit einer Plastikspritze zwischen die Glasplatten gefüllt und der Probenplatzhalter wurde eingesetzt. Nach 1,5 h Polymerisation konnte die Gelapparatur in das Sequenziergerät eingehängt und auf 50°C vorgeheizt werden. Die zu sequenzierenden Proben konnten nun aufgetragen werden.

2.15.15 Klonierung der YidC-Tryptophanmutanten sowie des YidC-Wildtyps

Eine Übersicht der einzelnen Klonierungsschritte ist in Abb. 9 dargestellt.

Das *yidC*-Gen, welches für die jeweilige YidC-Tryptophanmutante YidC_{2W}, YidC_{W354}, YidC_{W454}, YidC_{W508} bzw. für den YidC-Wildtyp codierte – hier aus Gründen der Übersichtlichkeit als *yidC* bezeichnet – lag ursprünglich ohne His₁₀-Tag und mit einer *NdeI*-Schnittstelle als Start-Codon im Vektor pUC19 vor. Zudem enthielt das *yidC*-Gen eine interne *NcoI*-Schnittstelle. Durch PCR wurde ein Genfragment amplifiziert, welches am C-Terminus einen His₁₀-Tag mit einer *HindIII*-Schnittstelle am Stop-Codon von *yidC* und am N-Terminus eine *NcoI*-Schnittstelle, die innerhalb von *yidC* lag, enthielt. Dieses sogenannte Amplifikat konnte durch Restriktionsverdau mit *NcoI* und *HindIII* geschnitten und mit dem ebenso geschnittenen ursprünglichen Vektor pUC19 in dessen multiple Klonierungsstelle ligiert werden. Dadurch wurde ein Gen generiert, welches für das Protein YidC mit einem C-terminalen His₁₀-Tag codierte. Dieses Gen wurde durch Restriktionsverdau mit *NdeI* und *HindIII* geschnitten und über diese Schnittstellen in die multiple Klonierungsstelle des ebenfalls mit diesen Enzymen geschnittenen Vektors pT7-7 eingebracht. Dieser Vektor enthält ein Shine-Dalgarno-Motiv in korrektem Abstand zu den Nukleotiden, die auf mRNA-Ebene das Start-Codon bilden. Somit konnte das jeweilige *yidC*-Gen mit His₁₀-Tag und Shine-Dalgarno-Motiv über die Restriktionsendonuklease-Schnittstellen *XbaI* und *HindIII* in die jeweilige multiple Klonierungsstelle der ebenso geschnittenen Vektoren pGZ119EH und pMS119EH, jeweils unter Kontrolle eines Tac-Promotors, eingebracht werden. Das YidC-Konstrukt in pMS119EH wurde für einen Expressionstest verwendet (Kap. 2.16.3) und das Konstrukt in pGZ119EH wurde zusätzlich für die Funktionalitäts-Tests (Kap. 2.16.2) eingesetzt. Um ein *yidC*-Gen mit His₁₀-Tag und ohne ersichtliches Shine-Dalgarno-Motiv zu generieren wurde das *yidC*-Gen, durch Restriktionsverdau mit *KpnI* und *HindIII*, aus dem Vektor pUC19, in welchen zuvor das Amplifikat ligiert wurde, geschnitten und mit dem ebenso geschnittenen Vektor pGZ119EH ligiert. Dieses YidC-Konstrukt wurde für die Funktionalitäts-Tests (Kap. 2.16.2) und einen Expressionstest (Kap. 2.16.3) verwendet. Die multiple Klonierungsstelle des Vektors pGZ119EH mit Shine-Dalgarno-Motiv und ohne ersichtliches Shine-Dalgarno-Motiv ist in Abb. 10 gezeigt. Durch Restriktionsverdau des ursprünglichen Vektors pUC19 mit *NdeI* und *HindIII* konnte das *yidC*-Gen in den durch Restriktionsverdau mit denselben Enzymen geschnittenen Vektor pET-16b ligiert werden. Dieser Vektor codierte in der multiplen Klonierungsstelle für einen N-terminalen His₁₀-Tag. Dadurch wurde ein *yidC*-Gen erzeugt, das zusätzlich für einen N-terminalen His₁₀-Tag codierte, ein Shine-Dalgarno-Motiv enthielt und unter Kontrolle eines T7-Promotors stand. Dieser Vektor wurde lediglich für einen Expressionstest (Kap. 2.16.3) eingesetzt.

2. Material und Methoden

Alle *YidC*-Konstrukte wurden mit den entsprechenden Sequenzierprimern sequenziert (Kap. 2.15.13).

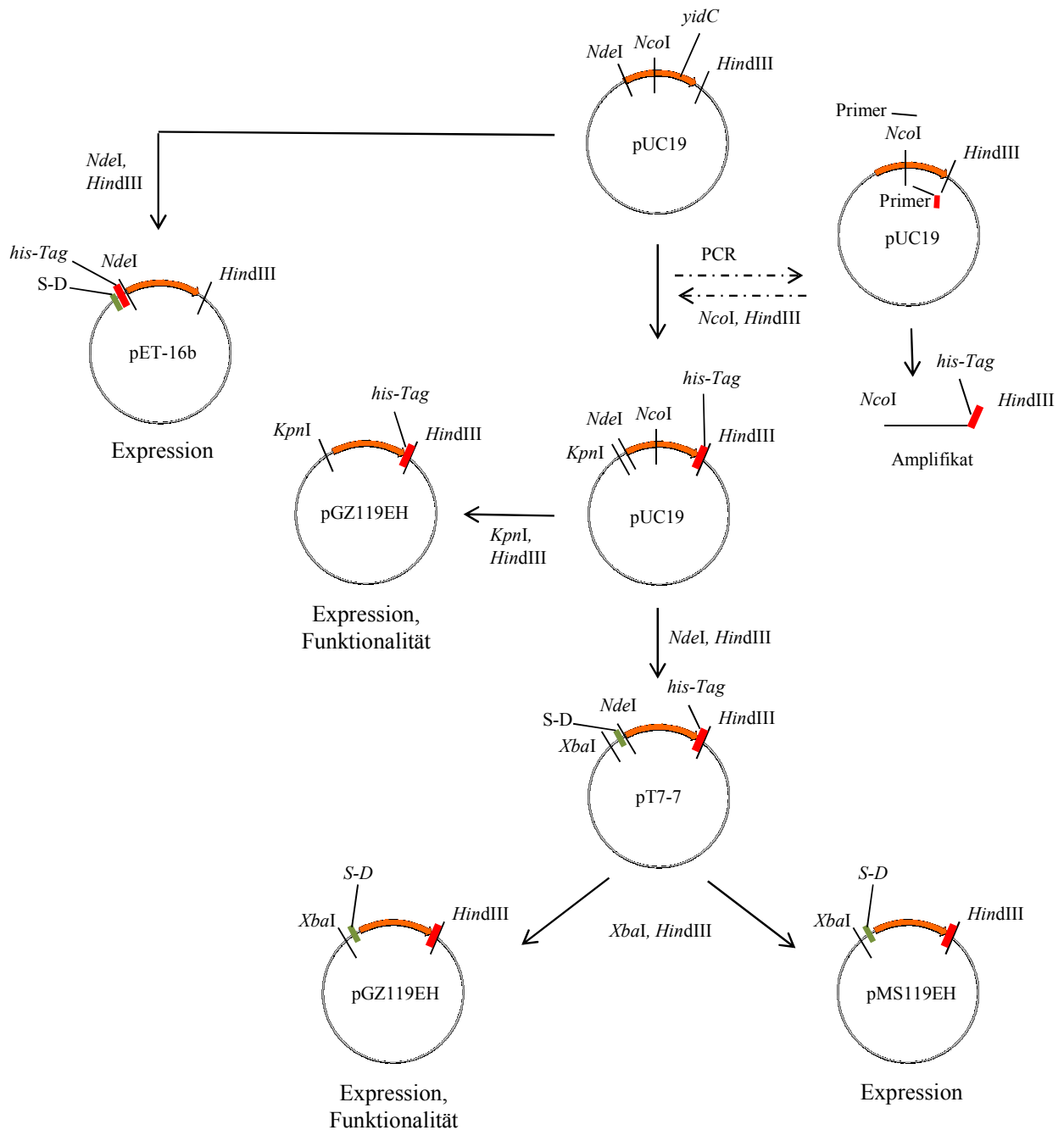


Abb. 9: Darstellung der Klonierungsschritte der *YidC*-Tryptophanmutanten bzw. des *YidC*-Wildtyps. Dargestellt sind die entsprechenden Vektoren mit Restriktionsschnittstellen, die für die Klonierung relevant sind, und der Verwendungszweck der erhaltenen Konstrukte. Das jeweilige *yidC*-Gen ist anhand eines dickgedruckten Pfeils dargestellt, wobei die Spitze in Richtung Gene-Ende (3'-Richtung) zeigt. Das Shine-Dalgarno-Motiv (S-D), sowie der *his-Tag* sind als Rechtecke dargestellt.

A *yidC-his* mit Shine-Dalgarno-Motiv in pGZ119EH:

*Xba*I

... GAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAAATAATTTTGT
TTAACTTTAAG AAGGAG ATATA CAT ATG ... *yidC-his* ... TGA AGCTT ...

*Hind*III

B *yidC-his* ohne ersichtliche Shine-Dalgarno-Motiv:

*Kpn*I *Hind*III

... GAATTCGAGCTCGGTACCCAATTCAT ATG ... *yidC-his* ... TGA AGCTT ...

Abb. 10: Multiple Klonierungsstelle des Vektors pGZ119EH mit ligiertem *yidC*-Gen. Das *yidC*-Gen welches für eine der vier YidC-Tryptophanmutanten bzw. für den YidC-Wildtyp codierte wurde mit Shine-Dalgarno-Motiv (A) und ohne ersichtliches Shine-Dalgarno-Motiv (B) in den Vektor pGZ119EH kloniert und war jeweils mit einem His₁₀-Tag fusioniert. Die für die Klonierung bedeutenden Restriktionsschnittstellen sind angegeben. Die jeweiligen Nukleotide, welche auf mRNA-Ebene das Start- (ATG) und Stop-Codon (TGA) bilden sowie das Shine-Dalgarno-Motiv sind markiert.

2.16 Proteinbiochemische Methoden

2.16.1 Radioaktive Markierung neusynthetisierter Proteine

Um neusynthetisierte Proteine *in vivo* radioaktiv zu markieren werden Zellen eine bestimmte Zeit lang mit einer radioaktiv markierten Aminosäure gefüttert, welche kurz danach mit einer sehr viel größeren Menge derselben, jedoch nicht radioaktiv markierten Aminosäure verdünnt wird. Dadurch erfolgt für kurze Zeit eine radioaktive Markierung eines hohen Anteils der in diesem Zeitraum neu synthetisierten Proteine.

2 ml LB-Medium mit 0,2% Arabinose und dem entsprechenden Antibiotikum wurden mit einer Einzelkolonie des *E. coli* YidC-Delpetionsstammes JS7131 (Samuelson *et al.*, 2000), welche das gewünschte, plasmidcodierte Gen enthielt, beimpft. Nach Inkubation für 16 h bei 37°C im Wasserbadschüttler wurden 500 µl dieser Kultur in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und zweimal mit je 1 ml LB-Medium mittels Zentrifugation (12000

g, 1 min, RT) gewaschen um die Arabinose zu entfernen. Die Zellen wurden ein weiteres Mal sedimentiert und in 500 µl LB-Medium aufgenommen. Mit dieser Vorkultur wurden 2 ml LB-Medium, das 0,2% Arabinose (Expression von YidC) bzw. 0,2% Glukose (Repression von YidC) sowie das entsprechende Antibiotikum enthielt, 1:50 beimpft und für 4 h im Wasserbadschüttler bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit sollte YidC im Ansatz, der Glukose enthielt, depletiert sein. Daraufhin wurden 500 µl der jeweiligen Kultur in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach zwei Waschschrritten mit je 1 ml M9-Medium durch Zentrifugation (12000 g, 1 min, RT) wurden die Zellen in 500 µl M9-Minimalmedium, das mit 0,2% Arabinose bzw. 0,2% Glukose sowie dem entsprechenden Antibiotikum versetzt war, resuspendiert und für 30 min bei 37°C im Wasserbadschüttler inkubiert. Dieser Schritt diente dazu, das Medium zu wechseln und die Zellen in Methionin-freiem Medium zu züchten. Daraufhin wurde die Proteinexpression mit 1 mM IPTG induziert. Nach 5 min Inkubation bei 37°C im Wasserbadschüttler erfolgte die Zugabe von 5 µl radioaktiv markiertem [³⁵S]-Methionin (Stammlösung 10 µCi/µl), sodass eine radioaktive Markierung aller neusynthetisierten Proteine stattfand. Nach 30 s wurden 50 µl Methionin (Stammlösung 5 mg/ml) im Überschuss zugegeben, damit die vollständige Translation aller radioaktiv markierten Proteine beendet werden konnte. Nach 2 min Inkubation bei 37°C im Wasserbadschüttler wurden die Zellen schließlich in TCA überführt um die Proteine zu fällen (Kap. 2.16.12). Nach SDS-PAGE (Kap. 2.16.13) konnte das Gel mittels Autoradiographie analysiert werden (Kap. 2.16.14).

2.16.2 Komplementations-Test

Mit Hilfe des Komplementations-Tests konnten YidC-Mutanten auf ihre Funktionalität untersucht werden. Dazu wurde der *E. coli* YidC-Depletionsstamm JS7131 verwendet, in welchem das genomische *yidC*-Gen von Basenpaar 745 - 1566 deletiert ist. Dadurch wird kein funktionsfähiges YidC-Protein codiert. Ein alternatives, funktionelles *yidC*-Gen liegt unter Kontrolle eines *araBAD*-Promotors und Operators in den *attB* Lokus inseriert vor (Abb. 17). Dadurch kann die Expression von genomischem YidC mit Arabinose induziert und mit Glukose reprimiert werden (Samuelson *et al.*, 2000).

Je 2 ml LB-Medium, das mit Arabinose (Endkonzentration 0,2%) und Chloramphenicol (Endkonzentration 25 µg/ml) versetzt war, wurden mit einer Kolonie des YidC-Depletionsstammes, der den Vektor pGZ119EH mit dem zu untersuchenden Gen enthielt, beimpft und für 16 h bei 37°C im Wasserbadschüttler inkubiert. 10 µl dieser Kultur wurden

mit 90 µl LB-Medium verdünnt und 5 µl der Verdünnung wurden mit einer Impföse auf LB-Agar-Platten, die Arabinose (Endkonzentration 0,2%), Glukose (Endkonzentration 0,2%), Arabinose und IPTG (Endkonzentration 1 mM) bzw. Glukose und IPTG enthielten ausgestrichen (Kap. 2.15.11). IPTG bewirkte die Expression des plasmidcodierten YidC-Konstruktes. Die Platten konnten nach Inkubation für 16 h bei 37°C ausgewertet werden.

2.16.3 Expressionstest

Ein Expressionstest dient dazu die Expression verschiedener Proteine unter verschiedenen Expressions-Bedingungen zu untersuchen.

Dafür wurden 2 ml LB-Medium das mit dem entsprechenden Antibiotikum und, stammabhängig, mit 0,2% Arabinose versetzt war vorbereitet. Mit einer abgeflamnten, sterilen Impföse wurde eine Kolonie *E. coli*-Zellen, welche mit dem gewünschten plasmidcodierten Gen transformiert war (Kap. 2.15.9) in das Medium überführt und für 16 h bei 37°C im Wasserbadschüttler inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 3 ml LB-Medium, zu welchem das entsprechende Antibiotikum bzw. bei Bedarf eine Carbonquelle (0,2% Arabinose/Glukose) gegeben wurde, 1:100 beimpft. Diese Hauptkultur wurde bei 37°C im Wasserbadschüttler bis zu einer $OD_{605} = 0,5$ inkubiert und die Proteinexpression mit 1 mM IPTG induziert. Die Induktion wurde bei 37°C oder bei 20°C fortgeführt. Nach Induktionszeiten von 1, 2, 3, 4 und 16 h wurde jeweils 100 - 250 µl Probe mit TCA gefällt und anschließend mit Aceton gewaschen (Kap. 2.16.12). Daraufhin konnten die Proben durch SDS-PAGE (Kap. 2.16.13), Western blot und Immundetektion mit dem entsprechenden Antikörper analysiert werden (Kap. 2.16.16).

2.16.4 Expression und Reinigung von YidC-Tryptophanmutanten

60 ml chloramphenicolhaltiges (Endkonzentration 25 µg/ml) LB-Medium wurden mit dem *E. coli* Stamm C43(DE3), welcher mit der jeweiligen plasmidcodierten, His₁₀-Tag-fusionierten YidC-Tryptophanmutante (Expressionsvektor pGZ119EH) transformiert war, beimpft und für 16 h bei 37°C im Wasserbadschüttler inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 6 l chloramphenicolhaltiges LB-Medium 1:100 beimpft. Diese Hauptkultur wurde bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (OD_{605}) von 0,5 im Luftschüttler inkubiert. Nach Abkühlen der Kultur auf ca. 20°C im Eisbad wurde die Proteinexpression mit 0,7 mM steril filtriertem IPTG induziert und bei 20°C für 16 h auf dem Luftschüttler fortgeführt. Anschließend wurden die

Zellen durch Zentrifugation (5000 g, 10 min, 4°C) sedimentiert und in TBS-Puffer (1 ml/1 g Zellen) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte nach Zugabe von 500 µl Protease Inhibitor Cocktail (Complete, EDTA-free, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D) mittels French Pressure Cell bei 8000 psi. Nach zwei Durchgängen wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation sedimentiert (5000 g, 15 min, 4°C) und verworfen. Die sich im Überstand befindende Cytoplasmamembranfraktion wurde entnommen und durch Zentrifugation (220000 g, 50 min 4°C) sedimentiert. Die Membranproteine wurden nun mit Hilfe des Detergenzes n-Dodecyl-β-D-Maltosid (DDM) aus der Cytoplasmamembran gelöst (= solubilisiert). Das Detergenz besteht aus einem hydrophilen Teil und einem hydrophoben Teil, der sich an die hydrophoben Transmembrandomänen des Proteins anlagert und dadurch die Phospholipide verdrängt und das Protein aus der Membran löst. Die Membranproteine lagen dadurch Detergenz-solubilisiert, d. h. in einem Komplex aus Detergenz und Protein vor. Für das Solubilisieren wurde TBS-Puffer, der 1% DDM enthielt, für 1,5 h auf Eis unter Rühren mit der Membranfraktion inkubiert. Nach Zentrifugation (240000 g, 20 min, 4°C) befanden sich die solubilisierten Komponenten im Überstand. Die mit einem His-Tag fusionierten Proteine konnten nun mittels Affinitätschromatographie gereinigt werden. Dafür wurde als Säulenmaterial Ni-NTA Superflow (Qiagen GmbH, Hilden, D) verwendet. Ni²⁺-Ionen sind über die Nitriloessigsäure (NTA) an die Agarosematrix gebunden und binden zudem an die Imidazolgruppe des jeweiligen Histidin-Restes des His-Tags. Die Nickel-Affinitätsmatrix (1,5 ml Bettvolumen) wurde zweimal mit je 10 ml ddH₂O gewaschen und in 10 ml TBS-Puffer äquilibriert. Die solubilisierten Komponenten wurden nach Zugabe von 40 mM Imidazol für 1 h bei 4°C auf dem Drehrad mit der Matrix inkubiert. Danach wurde die Lösung bei 4°C in eine senkrecht befestigte Plastikspritze, in welche ein Filterpapier eingelegt wurde, überführt und hinaustropfen gelassen. Nicht gebundene Bestandteile konnten dadurch verworfen werden und die Matrix, die sich durch das Filterpapier zurückgehalten, in der Spritze befand wurde mit 25 ml TBS-Puffer, der 60 mM Imidazol und 0,03% DDM enthielt, gewaschen. Durch diesen Waschschrift wurden unspezifisch gebundene Proteine von der Matrix entfernt. Die Elution der Proteine mit His-Tag erfolgte in 8 ml TBS-Puffer, der mit 280 mM Imidazol und 0,1% DDM versetzt war. Das Imidazol verdrängt den mit dem Protein fusionierten His-Tag und bewirkt das Lösen der Proteine von der Matrix. Die Reinheit der eluierten Proteine konnte mittels SDS-PAGE (Kap. 2.16.13) und anschließender Coomassie Blau-Färbung (Kap. 2.16.15) überprüft werden. Das Imidazol, welches zur Störung von Fluoreszenzmessungen führte, wurde mittels Dialyse entfernt (Kap. 2.16.6).

2.16.5 Expression und Reinigung des YidC-Wildtyps

30 ml ampicillinhaltiges (Endkonzentration 100 µg/ml) LB-Medium wurden mit dem *E. coli*-Stamm C43(DE3), welcher den Expressionsvektor pMS119EH mit dem Gen des His₁₀-Tag-fusionierten YidC-Wildtyps enthielt, beimpft und für 16 h bei 37°C im Wasserbadschüttler inkubiert. 3 l ampicillinhaltiges LB-Medium wurden 1:100 mit dieser Vorkultur beimpft und bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₅) von 0,5 wachsen gelassen. Die Proteinexpression wurde mit 0,7 mM sterilfiltriertem IPTG induziert und erfolgte für 3 h bei 37°C auf dem Luftschüttler. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (5000 g, 10 min, 4°C) sedimentiert, in TBS-Puffer (1 ml/1 g Zellen) resuspendiert und bei -80°C eingefroren. Die Reinigung erfolgte wie für die YidC-Tryptophanmutanten beschrieben (Kap. 2.16.4).

2.16.6 Dialyse

Die Dialyse dient dem Entfernen von Salzen aus Proteinlösungen und dem Austausch von Puffer.

Das Imidazol, welches bei spektroskopischen Messungen störte, wurde durch Dialyse aus den Elutionsfraktionen des gereinigten Proteins (Kap. 2.16.4 und 2.16.5) entfernt. Zuerst mussten die Dialyseschläuche (Ausschlussvolumen: 14 kDa, Visking Typ 20/32, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D) vorbehandelt werden. Dafür wurden diese in gewünschte Längen zugeschnitten, für 10 min in einer Lösung aus 2% NaHCO₃ (w/v) und 1 mM EDTA gekocht und daraufhin mit ddH₂O gewaschen sowie für weitere 10 min in ddH₂O gekocht. Die Dialyseschläuche konnten dann verwendet oder in ddH₂O bei 4°C gelagert werden. Vor Benutzung mussten die Dialyseschläuche mit ddH₂O gespült werden. Daraufhin wurden die gewünschten Elutionsfraktionen in einen Dialyseschlauch überführt. Dieser wurde von beiden Seiten mit Klammern verschlossen und die Elutionsfraktionen wurden 1:100 gegen Puffer (300 mM NaCl, 20 mM Tris (HCl pH 7,0), 10% Glycerin, 0,035% DDM) unter Rühren bei 4°C für 16 h dialysiert. Anschließend konnte die Proteinkonzentration bestimmt werden (Kap. 2.16.7).

2.16.7 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach Lowry (Lowry *et al.*, 1951) durchgeführt. Dafür wurden folgende Lösungen benötigt:

10% SDS (w/v)

0,8 N NaOH

2 N Folin-Reagenz (Merck KGaA, Darmstadt, D)

CTC-Lösung:

1. 0,2% CuSO₄ (w/v) + 0,4% Natriumtartrat (w/v) jeweils in H₂O gelöst
 2. 20% Na₂CO₃ (w/v) in H₂O gelöst
1. und 2. 1:1 mischen.

Die gewünschte Proteinprobe wurde mit TCA gefällt (Kap. 2.16.12) und nach Zugabe von 500 µl ddH₂O in 500 µl Lösung A (CTC:SDS:NaOH = 1:1:1) resuspendiert. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 250 µl Lösung B (Folin-Reagenz:ddH₂O = 1:5) zugegeben und der Ansatz wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption der Proben wurde bei 750 nm gegen H₂O gemessen. Für die Eichgerade wurden 0,2 µl, 5 µl, 10 µl, 20 µl und 25 µl einer BSA-Standardlösung (0,5 mg/ml) unter gleichen Bedingungen gemessen.

2.16.8 Aufbereitung von Phospholipiden und Erzeugung von Liposomen

Um aus den in Pulverform vorliegenden Phospholipiden Liposomen zu erzeugen, mussten die Lipide folgendermaßen aufbereitet werden:

50 mg einer 1:1 Mischung von 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) und 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) (DOPG) wurden in einen lichtgeschützten Rundkolben überführt und in 2 ml CHCl₃ gelöst. Der Rundkolben wurde daraufhin an einen Rotationsverdampfer angeschlossen, bis das Chloroform verdampft war. Dadurch bildete sich ein gleichmäßig verteilter Lipidteppich, der für 6 h unter Vakuum getrocknet wurde. Anschließend wurden 2 Glaskügelchen in den Kolben gegeben um die Lipide unter Schwenken in 5 ml ddH₂O aufzunehmen. Die Phospholipide konnten nach Begasen mit N₂ aliquotiert und bei -80°C gelagert werden.

Um Liposomen mit einem Durchmesser von 250 nm zu erhalten, wurde ein Extruder (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL, USA) verwendet. Eine Membran mit einer Porengröße von 0,4 µm wurde zwischen jeweils ein Filterpapier in die Extruder-Apparatur gelegt. Die Apparatur wird daraufhin mit 400 µl Puffer (20 mM Tris (pH 7,0), 300 mM NaCl) äquilibriert. Der Puffer wurde verworfen und 400 µl Phospholipide wurden 15-mal durch die Membran hin und her gedrückt. Der Extruder wurde nach Verwendung mit Isopropanol und

anschließend mit ddH₂O gespült. Um die Größe der erzeugten Liposomen zu messen wurden 10 µl Liposomen mit 1 ml Puffer (20 mM Tris (pH 7,0), 300 mM NaCl) verdünnt, in eine Glasküvette überführt und die Partikelgröße durch Photonen-Korrelations-Spektroskopie mit dem Sub-Micron Particle Analyzer Model N4 SD (Coulter Electronics, Inc., Hialeah, FL, USA) bestimmt. Diese unilamellaren Liposomen wurden als künstliche Membranen verwendet, in welche gereinigte, Detergenz-solubilisierete Membranproteine rekonstituiert wurden (Kap. 2.16.9).

2.16.9 Rekonstitution von Membranproteinen in Liposomen

Der Einbau (= Rekonstitution) von Membranproteinen in Liposomen wurde folgendermaßen bewerkstelligt:

12 mM Liposomen (Kap. 2.16.8) wurden für 3 Tage bei 4°C mit 1,5 mM DDM inkubiert. Anschließend wurden 1,5 mM der vorbehandelten Liposomen mit 3 µM des gereinigten, Detergenz-solubilisierten Membranproteins (Kap. 2.16.4 und 2.16.5) für 2 h bei 4°C auf dem Drehrad äquilibriert. Das Detergenz wurde danach durch Inkubation mit Bio-Beads (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) bei 4°C auf dem Drehrad entzogen, damit das hydrophobe Protein in die Liposomen rekonstituiert wurde. Zuerst wurden 40 mg Bio-Beads mit ddH₂O und anschließend mit Puffer (20 mM Tris (pH 7,0), 300 mM NaCl) gewaschen. Diese Bio-Beads wurden für 1,5 h bei 4°C mit dem Liposomen-Protein-Gemisch inkubiert. Dann erfolgte ein Austausch gegen dieselbe Menge gewaschener Bio-Beads und eine weitere Inkubationszeit von 1,5 h auf dem Drehrad bei 4°C. Daraufhin wurden die somit entstandenen Proteoliposomen durch Zentrifugation (120000 g, 10 min, 4°C) in der Air-Driven-Ultracentrifuge (Beckman Coulter, Krefeld, D) sedimentiert und in Puffer (20 mM Tris (pH 7,0), 300 mM NaCl) aufgenommen.

2.16.10 Topologie-Bestimmung

Die Topologie-Bestimmung diente der Ermittlung der Richtung, in welcher gereinigtes, Detergenz-solubilisieretes YidC in die Liposomen rekonstituiert wurde. YidC kann entweder mit der P1-Domäne im Inneren der Liposomen vorliegen oder die P1-Domäne kann sich außerhalb der Liposomen befinden. Für die Bestimmung wurden 200 µl Proteoliposomen (Kap. 2.16.9) durch Zentrifugation sedimentiert (120000 g, 10 min, 4°C), in 100 µl Puffer (20 mM Tris (HCl pH 7,0), 300 mM NaCl) resuspendiert und mit Trypsin (Endkonzentration 0,05

mg/ml) versetzt. Der Verdau wurde für 30 min bei 25°C im Thermoblock durchgeführt. Ein zweiter Proteoliposomen-Ansatz ohne Trypsin wurde ebenso behandelt. Anschließend wurden die Proben mit TCA gefällt und mit Aceton gewaschen (Kap. 2.16.12). Durch SDS-PAGE (Kap. 2.16.13) und Western blot konnten die Proben analysiert und mit dem Antikörper gegen den Periplasmatischen Loop (P1) von YidC markiert werden (Kap. 2.16.16). Der Nachweis des detektierten Fragments erfolgte mit Hilfe eines ECL exponierten Films (Kap. 2.16.17) und die Quantifizierung mit Hilfe der Aida Development-Software (Version 2.01.53, Raytest GmbH, Straubenhardt, D).

2.16.11 Titration von rekonstituierten YidC-Tryptophanmutanten mit Pf3W0 coat

Die in Liposomen rekonstituierten YidC-Tryptophanmutanten (Kap. 2.16.9) wurden in 350 µl Puffer (20 mM Tris (pH 7,0), 300 mM NaCl) aufgenommen und in eine Quarzküvette (Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, D) überführt. Die rekonstituierten Mutanten wurden daraufhin schrittweise mit Pf3W0 coat (Stammkonzentration 27 µM) titriert. Zuerst erfolgten zwei Zugabeschritte mit Volumina von je 2 µl, danach mehrere variable Zugabeschritte bis zu einer Endkonzentration von 2,1 µM Pf3W0 coat. Nach jedem Titrationsschritt erfolgte eine Äquilibrierung für 5 min bei 20°C mit anschließender Aufnahme des Fluoreszenzspektrums (Kap. 2.17.1).

2.16.12 TCA-Fällung und Aceton-Waschen von Proteinen

Die TCA-Fällung diente dazu Proteine zu konzentrieren.

Dazu wurde für mindestens 1 h bei 4°C eine Endkonzentration von 15 - 20% TCA (Stammlösung 50% (w/v)) mit der zu fällenden Protein-haltigen Probe inkubiert. Im Anschluss wurden die gefällten Proteine durch Zentrifugation (21000 g, 15 min, 4°C) sedimentiert, der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mittels Zentrifugation (21000 g, 15 min, 4°C) mit je 1 ml eiskaltem Aceton gewaschen. Das Pellet wurde durch Zentrifugation im Speed Vac Concentrator (Bachofer, Reutlingen, D) getrocknet und in 20 µl SDS-Probenpuffer bei anschließender Verwendung von kleinen SDS-Polyacrylamidgelen bzw. in 40 µl bei Verwendung von großen Gelen resuspendiert. Nach Erhitzen für 5 min bei 70°C konnten die Proben durch SDS-PAGE getrennt werden (Kap. 2.16.13).

2.16.13 SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Bei dieser Methode werden die Proteine denaturiert und nach ihrer molekularen Masse auf einem SDS-Polyacrylamidgel getrennt.

Vor der Elektrophorese wurden die Proteinproben in 20 - 40 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 70°C erhitzt. Das im SDS-Probenpuffer enthaltene DTT dient der Reduzierung von Disulfidbrücken der Polypeptidketten. Durch das ebenfalls im SDS-Probenpuffer enthaltene anionische Detergenz SDS werden alle Polypeptide denaturiert und negativ geladen. Die Proteine unterscheiden sich dadurch nur noch in ihrer Größe und wandern abhängig von ihrem Molekulargewicht zur Anode. Je nach Porengröße des Polyacrylamidgels wandern die Proteine schneller oder langsamer. Bei einem hochprozentigen Gel sind die Poren klein und die Proteine wandern langsamer als in einem niederprozentigen Gel.

Herstellung eines 12% SDS-Polyacrylamidgels:

Für das Trenngel wurden 12 ml Monomerlösung, 5,6 ml Tris-Puffer (2 M Tris/pH 8,8), 12,1 ml ddH₂O und 120 µl SDS (Stammlösung 25% (w/v)) gemischt. Nach Zugabe von 150 µl APS (Stammlösung 10% (w/v)) und 10 µl TEMED wurde die Lösung in die vorbereitete Gelgießapparatur gegossen und mit 400 µl Isopropanol überschichtet.

Für das Sammelgel wurden 2,7 ml Monomerlösung, 2,5 ml Tris-Puffer (1 M Tris/pH 6,8), 14,6 ml ddH₂O und 80 µl SDS (Stammlösung 25% (w/v)) gemischt. Das Isopropanol wurde entfernt und nach Zugabe von 100 µl APS (Stammlösung 10% (w/v)) und 10 µl TEMED wurde die Lösung über das Trenngel geschichtet sowie der Probenplatzhalter eingesetzt. Nach 1 h Polymerisation konnte das SDS-Polyacrylamidgel verwendet werden.

SDS-PAGE kleiner SDS-Polyacrylamidgele:

Die Elektrophorese kleiner SDS-Polyacrylamidgele dauerte ca. 70 min bei 17 mA pro Gel. Kleine Gele hatten eine Größe von 10 x 8 cm, waren 1 mm tief und konnten mit maximal 10 Proben beladen werden. Sie wurden genutzt um nach Elektrophorese einen Western blot (Kap. 2.16.16) oder eine Coomassie Blau-Färbung (Kap. 2.16.15) durchzuführen.

SDS-PAGE großer SDS-Polyacrylamidgele:

Die Elektrophorese großer SDS-Polyacrylamidgele dauerte bei 30 mA ca. 2,5 h. Die Gele hatten eine Größe von 14 x 10,5 cm, waren 1,5 mm dick und konnten mit bis zu 21 Proben beladen werden. Große Gele wurden genutzt um nach Elektrophorese einen Western blot (Kap. 2.16.16) durchzuführen oder um radioaktiv markierte Proteine mittels Autoradiographie zu analysieren (Kap. 2.16.14).

2.16.14 Autoradiographie

Radioaktiv markierte Proteine wurden nach Auftrennung durch SDS-PAGE mit einem großen SDS-Polyacrylamidgel (Kap. 2.16.13) durch Autoradiographie nachgewiesen. Das SDS-Polyacrylamidgel wurde für 30 min in Fixier-Lösung inkubiert und danach auf ein dünnes Filterpapier gelegt sowie mit einer Klarsichtfolie überdeckt. Das Gel wurde daraufhin für 4 h bei 65°C im Geltrockner unter Vakuum getrocknet. Für die Analyse von radioaktiv markierten Proteinen wurde für mindestens 24 h eine Phosphorimager-Platte auf das getrocknete Gel gelegt. Die durch von der Platte absorbierte Strahlung konnte in einem Phosphorimager über laserinduzierte Fluoreszenz gemessen und mittels BASReader-Software (Version 2.11, Raytest GmbH, Straubenhardt, D) am Computer dargestellt sowie mit der Aida Development-Software (Version 2.01.53, Raytest GmbH, Straubenhardt, D) ausgewertet werden.

2.16.15 Coomassie Blau-Färbung

Die Coomassie Blau-Färbung bewirkt die Visualisierung von Proteinen nach SDS-PAGE (Kap. 2.16.13).

Die SDS-Polyacrylamidgele wurden mit Coomassie Blau-Lösung überschichtet, für 30 s bei 500 W in der Mikrowelle erhitzt und anschließend für 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die überschüssige Coomassie Blau-Lösung wurde entfernt und der ungebundene Farbstoff durch Inkubation des Gels in Entfärber entfernt. Die SDS-Polyacrylamidgele konnten dann dokumentiert werden.

2.16.16 Western blot und Immundetektion

Durch einen Western blot werden die mittels SDS-PAGE getrennten Proteine (Kap. 2.16.13) auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Das gewünschte Protein kann daraufhin anhand spezifischer Antikörper detektiert werden.

Eine Nitrozellulosemembran (Protran, Whatman GmbH, Dassel, D) und das SDS-Gel wurden zwischen zwei Schichten, bestehend aus je zwei Filterpapieren gelegt und in eine Blotkammer überführt. Durch Anlegen einer Stromstärke von 2 mA/cm^2 SDS-Polyacrylamidgel für 1 h wurden die Proteine aus dem Gel heraus auf die Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran wurde daraufhin für 3 min mit Ponceau S-Lösung inkubiert. Diese Lösung färbt reversibel alle Proteinbanden und diente der Überprüfung, ob die Proteine auf die Membran übertragen wurden bzw. ermöglicht das Einzeichnen der Proteinbanden des Markers. Nach Entfernen der Ponceau S-Lösung durch mehrmaliges Spülen mit H_2O wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in 5% Magermilchpulver (w/v) gelöst in 1xTBS unter Schütteln inkubiert. Dadurch wurden freie Bindungsstellen der Membran gesättigt. Im Anschluss wurde die Membran dreimal für 5 min mit je 40 ml 1x TBS gewaschen und für mindestens 3 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit dem Erstantikörper inkubiert. Dieser Antikörper bindet spezifisch an das gewünschte Protein. Um überschüssige Antikörper zu entfernen wurde die Membran anschließend dreimal für je 5 min mit je 40 ml 1x TBE gewaschen. Daraufhin wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln mit dem entsprechenden Zweitantikörper inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen der Membran mit 1x TBS konnten die Proteinbanden mit den gebundenen Antikörpern über ECL (Kap. 2.16.17) nachgewiesen werden.

Verdünnung der Antikörper:

- Der Antikörper Anti-P1 wurde 1:5000 in TBS pH 7,4 + 0,05% Tween-20 (v/v) + 4% Magermilchpulver (w/v) verdünnt. Der zweite Antikörper Anti-Rabbit wurde 1:12000 mit TBS pH 7,4 + 0,05% Tween-20 (v/v) + 4% Magermilchpulver (w/v) verdünnt.
- Der Antikörper Anti-YidC wurde 1:10000 in TBS pH 7,4 verdünnt. Der zweite Antikörper Anti-Rabbit wurde 1:12000 mit TBS pH 7,4 verdünnt.
- Der Antikörper Anti-His wurde 1:5000 in TBS pH 7,4 verdünnt. Der zweite Antikörper Anti-Mouse wurde 1:7500 in TBS pH 7,4 verdünnt.

2.16.17 Enhanced Chemiluminescence (ECL)

Die Enhanced Chemiluminescence (ECL) dient der Darstellung von antikörpergebundenem Protein auf einem Röntgenfilm. Nach Western blot und Immundetektion (Kap. 2.16.16) wird dabei die an den Zweitantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase durch Luminol in Gegenwart eines chemischen Verstärkers oxidiert. Das dadurch angeregte Luminol kehrt durch Aussenden von Licht wieder in seinen Grundzustand zurück. Diese Lumineszenz kann auf einem Film sichtbar gemacht werden. Für die Durchführung wurde das ECL-Kit „ECL Immobilon Western Chemilumineszenz HRP Substrate“ (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) verwendet.

Die 2 Lösungen des Kits (Luminol und chemischer Verstärker) wurden 1:1 gemischt und für 2 min bei Raumtemperatur mit der Nitrozellulosemembran inkubiert. Danach wurde die Membran in eine durchsichtige Plastikhülle gelegt und zusammen mit einem Röntgenfilm (Agfa Cronex 5, Agfa Gevaert AG, Leverkusen, D) in eine Belichtungskammer eingeschlossen. Nach 2 - 5 min Belichtung wurde der Film in Entwickler gelegt und bis zum Erscheinen von schwarzen Banden darin geschwenkt. Anschließend wurde der entwickelte Film für 1 min in Essigwasser inkubiert und für 5 min in Fixierer fixiert.

2.17 Biophysikalische Methoden

2.17.1 „Steady-state“ Fluoreszenzspektroskopie

Für die „steady-state“ Fluoreszenzspektroskopie wurde ein Spektrofluorometer (Fluorolog FL3-22, Horiba Jobin Yvon GmbH, Unterhaching, D) verwendet, dessen Probenhalter mit Hilfe eines Wasserbades (F10, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, D) auf 25°C temperiert wurde. Die Anregung erfolgte bei 295 nm und die Fluoreszenzspektren wurden zwischen 305 und 450 nm aufgenommen. Die Aufnahmegeschwindigkeit betrug 1 nm/s. Die Spaltbreite für die Anregung wurde auf 2 nm sowie die Spaltbreite für die Emission auf 3 nm eingestellt.

2.17.2 Fluoreszenz-Lebensdauer

Als Fluoreszenz-Lebensdauer wird die durchschnittliche Zeit bezeichnet, in der ein Fluorophor im angeregten Zustand verbleibt. Gleichartige Fluorophore emittieren nicht alle

nach derselben Zeit. Eine große Anzahl an Fluorophoren emittiert sehr schnell kurz nach der Anregung, und einige emittieren nach Zeiten, die länger als die Fluoreszenz-Lebensdauer sind. Diese zeitliche Streuung von emittierten Photonen wird als Fluoreszenz-Intensitätszerfall bezeichnet (Lakowicz, 2006). Durch Messen des Fluoreszenz-Intensitätszerfalls (Kap. 2.17.4) kann die Fluoreszenz-Lebensdauer berechnet werden (Kap. 2.17.7.3).

2.17.3 Anisotropie und Rotationskorrelationszeit

Die Beweglichkeit von Fluorophoren bzw. Molekülen wird durch deren Größe und Form sowie durch die Viskosität der Umgebung bestimmt. Fluorophore in Proteinen sind zudem für gewöhnlich nicht starr an das Makromolekül fixiert, sondern sind beweglich. Diese Beweglichkeit rührt u. a. von der Flexibilität des Proteinrückgrats und der Beweglichkeit einzelner Domänen innerhalb des Proteins. Zur Bestimmung der Beweglichkeit wird im Allgemeinen ein Versuchsaufbau wie in Abb. 11 eingesetzt.

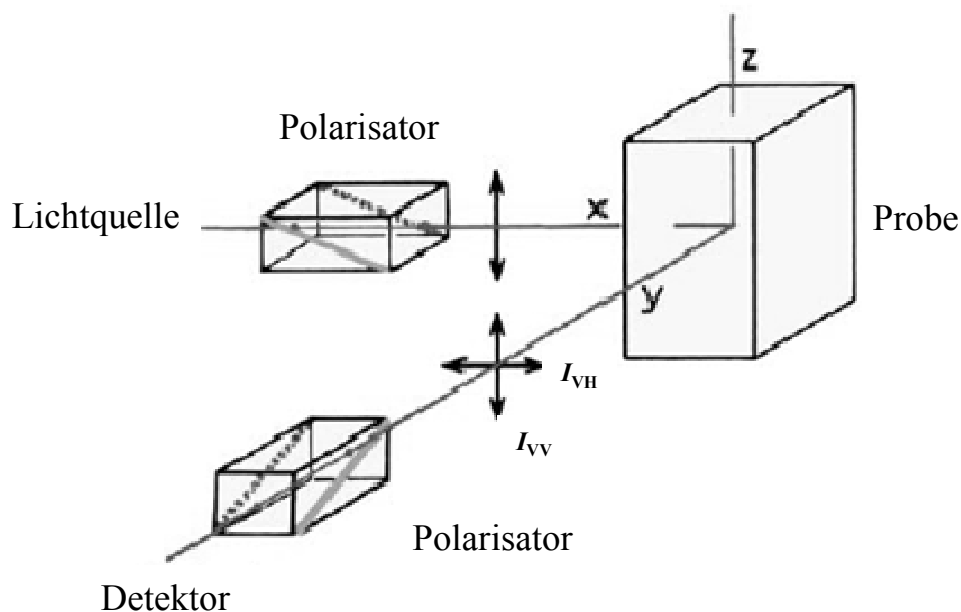


Abb. 11: Prinzip der Fluoreszenz-Anisotropie-Messung. Eine Probe wird mit vertikal polarisiertem Licht (parallel zur z-Achse) angeregt und die ebenfalls polarisierte Emission (vertikal = I_{VV} oder horizontal = I_{VH}) wird detektiert (verändert nach Lakowicz, 2006).

Dabei wird eine Fluorophor-haltige Probe mit vertikal polarisiertem Licht (= Licht einer bestimmten Schwingungsrichtung, hier: parallel zur z-Achse) angeregt und deren Emission mittels eines Polarisators (Analysators) im Strahlengang der Emission senkrecht (I_{VH}) sowie parallel (I_{VV}) zur Polarisation des Anregungslichtes detektiert (Ein Beispiel dieser Messungen ist in Abb. 35 dargestellt.). Die normierte Differenz dieser beiden Signale wird als Anisotropie bezeichnet und ist definiert als:

$$r = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + 2I_{VH}} \quad (1)$$

Die Anisotropie kann als Maß für die Beweglichkeit eines Fluorophoren angesehen werden. Fluorophore besitzen innerhalb ihrer Struktur Dipolmomente für Absorption und Emission. Für den Fall einer Probe unbeweglicher Fluorophoren, deren Absorptions- und Emissionsdipole parallel zueinander liegen, werden nur die Fluorophore angeregt, deren Absorptionsdipole nicht senkrecht zur Polarisationsrichtung des Anregungslichtes liegen. Die Fluoreszenz ist vorzugsweise in Richtung der Polarisationsrichtung der Anregung polarisiert, d. h. I_{VV} ist maximal. In diesem speziellen Fall ist auch die Anisotropie maximal und besitzt den Wert $r = 0,4$. Moleküle in wässriger Lösung ändern jedoch durch Rotation ihre räumliche Orientierung im Zeitraum zwischen Absorption und Emission. Dadurch reduziert sich der Beitrag I_{VV} während I_{VH} steigt. Die Anisotropie ist somit $r < 0,4$. Je größer die Beweglichkeit eines solchen Moleküls ist, desto geringer ist der zu erwartende Wert für die Anisotropie. Die zeitaufgelöste Messung der Fluoreszenz $I_{VV}(t)$ und $I_{VH}(t)$ erlaubt die Bestimmung der zeitaufgelösten Anisotropie

$$r(t) = \frac{I_{VV}(t) - I_{VH}(t)}{I_{VV}(t) + 2I_{VH}(t)} \quad (2)$$

Der zeitliche Verlauf von $r(t)$ lässt sich im Allgemeinen beschreiben durch:

$$r(t) = \sum_{i=1}^n r_i \exp(-t / \theta_i) \quad (3)$$

Aus dem Verlauf der Anisotropie $r(t)$ kann somit die Rotationskorrelationszeit $\theta(t)$ berechnet werden, wobei die Parameter θ_i als Rotationskorrelationszeiten und r_i als Anisotropien bezeichnet werden. Im einfachsten Fall ist $r(t)$ somit mono-exponentiell mit einer

Rotationskorrelationszeit. Diese Zeit θ ist die Zeitkonstante mit der die Anisotropie zerfällt, d. h. bis $r = 0$ erreicht ist. Die Rotationskorrelationszeit θ ist demnach ein Maß für die Geschwindigkeit der Rotationsbewegung eines Moleküls/Fluorophoren.

Die Messung der zeitabhängigen Anisotropie $r(t)$ erlaubt es somit mehrere voneinander unabhängige Bewegungen (mit unterschiedlichen Zeitkonstanten) eines Fluorophoren zu bestimmen. Solche Bewegungen lassen sich z. B. an Tryptophan-Resten in einer Vielzahl verschiedener Proteine feststellen (Beechem & Brand, 1985).

Der Wert $r_0 = r(t=0) = \sum r_i$ wird als fundamentale Anisotropie bezeichnet und ist gleichzusetzen mit dem Wert für r aus Gleichung (1) für den Fall, dass der Fluorophor komplett unbeweglich ist. Die fundamentale Anisotropie r_0 ist demnach ein Maß für den Winkel zwischen Absorptions- und Emissionsdipol eines Fluorophoren/Moleküls.

Für Tryptophan, wie für die meisten Fluorophore, ist der Wert für r_0 stark von der Anregungswellenlänge abhängig. Der gesamte Verlauf von r_0 in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge ist in Abb. 12 gezeigt.

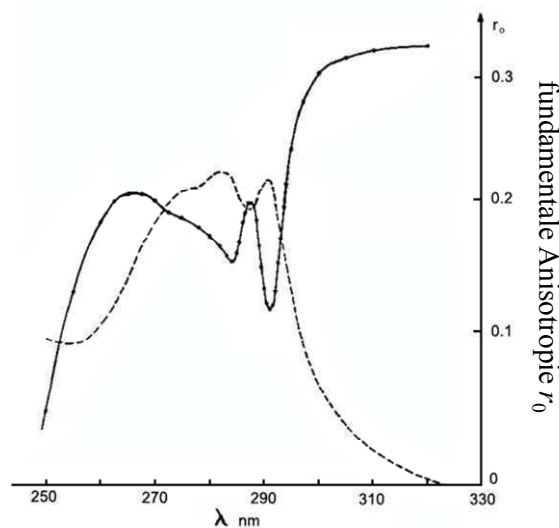


Abb. 12: Verlauf der fundamentalen Anisotropie r_0 von Tryptophan. Der Verlauf der fundamentalen Anisotropie von Tryptophan in Propylenglykol bei einer Temperatur von -58°C ist in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge dargestellt. Die Absorptionsbande ist anhand der unterbrochenen Linie, die fundamentale Anisotropie anhand der durchgezogenen Linie gezeigt (verändert nach Valeur & Weber, 1977).

Der ungewöhnliche Verlauf von $r(\lambda)$ ist eine Folge der Existenz von zwei absorbierenden Zuständen 1L_a und 1L_b des Indolrings des Tryptophans, deren Dipolmomente annähernd

senkrecht zueinander stehen. Die Emission hingegen erfolgt nur aus dem 1L_a -Zustand heraus. Die räumliche Lage der beiden Übergänge/Dipolmomente in Bezug auf den Heterozyklus des Indols/Tryptophans ist in Abb. 13 dargestellt.

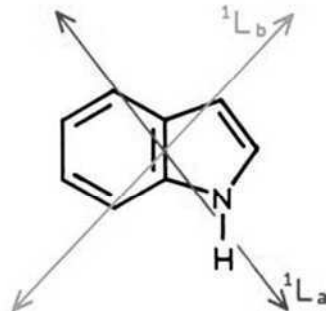


Abb. 13: Darstellung der angeregten Zustände von Tryptophan. Die räumliche Lage der zwei nahezu senkrecht zueinander stehenden, absorbierenden Zustände 1L_a und 1L_b von Tryptophan sind dargestellt (Lakowicz, 2006).

2.17.4 Messung des Fluoreszenz-Intensitätszerfalls

Die Messungen des Fluoreszenz-Intensitätszerfalls zur Berechnung der Fluoreszenz-Lebensdauer (Kap. 2.17.7.3), sowie der Anisotropie und der Rotationskorrelationszeit (Kap. 2.17.7.4) wurden mit dem Fluoreszenz-Lebensdauer-Spektrometer FluoTime 100 (PicoQuant GmbH, Berlin, D) durchgeführt, dessen Küvettenkammer auf 25°C temperiert wurde (F3, Haake GmbH). Ein schematischer Aufbau ist in Abb. 14 gezeigt.

Die Proben wurden durch eine gepulste LED (light emitting diode) PLS 290 (PicoQuant GmbH, Berlin, D) bei 290 nm mit einer Repetitionsrate von 10 MHz angeregt (Treiber PDL 800-B, PicoQuant GmbH, Berlin, D). Ein Bandpassfilter (FF01-310/25, Semrock, Inc., Rochester, USA) wurde zusätzlich vor die gepulste LED eingebaut um mögliche Fremdemission auszuschließen. Ein Quarz-Polarisator (Linos Photonics AG, Göttingen, D) wurde verwendet, um vertikal polarisierte LED-Pulse zu erzeugen. Dieser Polarisator wurde in den Strahlengang der Anregung eingebaut. Um die Fluoreszenz der Probe zu analysieren wurde ein Dünnschicht-Polarisator (Linos Photonics AG, Göttingen, D) mit Transmissionswellenlängen von 330 - 450 nm eingesetzt. Als Detektor wurde ein Photomultiplier verwendet, der die Messung geringster Lichtintensitäten bis hin zu einzelnen Photonen ermöglichte. Die Erfassung der Daten erfolgte mit dem TCSPC-Modul PicoHarp 300 (PicoQuant GmbH, Berlin, D). Das Prinzip des TCSPC wird in Kap. 2.17.5 näher erklärt.

2. Material und Methoden

Der Fluoreszenz-Intensitätszerfall zur Ermittlung der Fluoreszenz-Lebensdauer wurde mit einem Polarisator unter „magic angle“-Bedingungen gemessen. Dabei ist der Anregungspolarisator vertikal orientiert und das emittierte Licht wird in einem Winkel von $54,7^\circ$ relativ zur Polarisation des Anregungslichtes gemessen. Dies dient dazu Effekte, die durch molekulare Rotation entstehen, auszublenden.

Die Raman-Streuung des Wassers, welche bei einer Anregung von 290 nm ein Emissionsmaximum bei 322 nm aufwies und in ihrer Fluoreszenz-Intensität nahezu der des Tryptophans glich, wurde mittels eines Bandpassfilters (HC 357/44, AHF Analysetechnik, Tübingen, D), der nur Emissionen zwischen 335 - 379 nm transmittierte, ausgeschlossen.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem FluoFit Software-Paket (PicoQuant GmbH, Berlin, D).

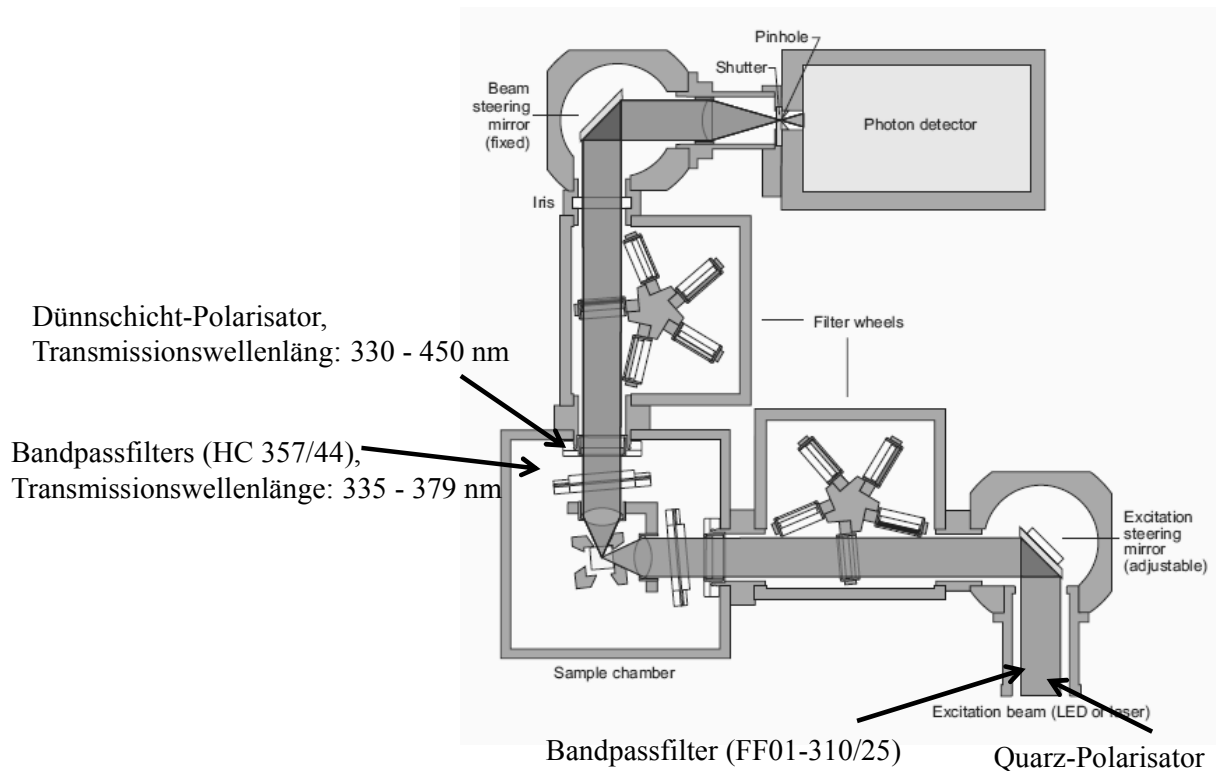


Abb. 14: Skizze des Fluoreszenz-Lebensdauer-Spektrometers FluoTime 100 (PicoQuant GmbH, Berlin, D). Das Fluoreszenz-Lebensdauer-Spektrometer FluoTime 100 ist schematisch dargestellt. Die Positionen der eingebauten Filter bzw. Polarisatoren sind angezeigt.

2.17.5 Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung

Es existieren mehrere Methoden, zeitaufgelöste Messungen durchzuführen. Eine davon ist das zeitkorrelierte Einzelphotonenzählen (= time-correlated single photon counting, TCSPC). Hierbei werden einzelne Photonen, die nach Anregung eines Moleküls durch Fluoreszenz abgegeben werden, gezählt und deren zeitliches Auftreten gemessen. So kann die Dauer des Abklingens der Fluoreszenz eines Fluorophors, der sogenannte Fluoreszenz-Intensitätszerfall, gemessen werden. Anhand dieses Fluoreszenz-Intensitätszerfalls wurden anschließend die Fluoreszenz-Lebensdauer (Kap. 2.17.7.3) und die Anisotropie, sowie die Rotationskorrelationszeit berechnet (Kap. 2.17.7.4).

Die Probe wurde dabei mit einer gepulsten Lichtquelle angeregt. Daraufhin wurde die Zeit zwischen dem Anregungspuls (Zeitpunkt t_0) und dem Detektieren des ersten am Detektor eintreffenden Photons (Zeitpunkt t_{Ende}) gemessen. Die maximal messbare Zeit t_{max} wird durch die Anregungsrate bestimmt. Es gilt $|1/t - 1/t_{\text{max}}| = \text{Anregungsfrequenz der LED}$, in diesem Fall 10 MHz. Das heißt, die Pulse erfolgten in einem Abstand von 100 ns. Die kleinste mögliche messbare Zeit (hier 700 ps) wird durch die Apparatefunktion (IRF) bestimmt (Kap. 3.7.2.1). Abb. 15 zeigt das Detektionsschema des TCSPC. Bei vielen Messzyklen wurde ein Photon detektiert. Es gibt aber auch einzelne Zyklen, in denen kein Photon detektiert wurde. Die Antworteinheit ordnet das Ergebnis jedes Messzyklusses in ein Histogramm ein, bei dem die gemessene Ankunftszeit des Photons gegen die Anzahl gemessener Ereignisse (Photonen) aufgetragen ist. Die Zeitachse ist dabei in Kanäle einer bestimmten zeitlichen Breite unterteilt. Die gewählte Kanalbreite ist dabei abhängig von dem kürzesten zu messenden Zerfall sowie der IRF (Kap. 3.7.2.1). Die Aufnahme von Fluoreszenz-Intensitätszerfällen mittels TCSPC ist nur möglich, wenn die Anregungsleistung der LED so gewählt wird, dass die Zählrate am Detektor $\leq 1\%$ der Anregungsrate beträgt, d. h. wenn erst bei jedem hundertsten Anregungspuls ein Photon detektiert wird. Ansonsten würde es aufgrund der Totzeit des Detektors (hier im Nanosekunden-Bereich) zu einer falschen Statistik kommen. Wenn pro Anregungszyklus mehr als ein Photon auftreten würde, könnte der Detektor meist nur das erste Photon zählen. Durch die technisch bedingte Totzeit kann keine Detektion des zweiten Photons stattfinden, was zu einer Häufung an schnell auftretenden Photonen führen würde. Dieser Effekt wird „pile-up“ genannt (Becker & Bergmann, 2005; Lakowicz, 2006).

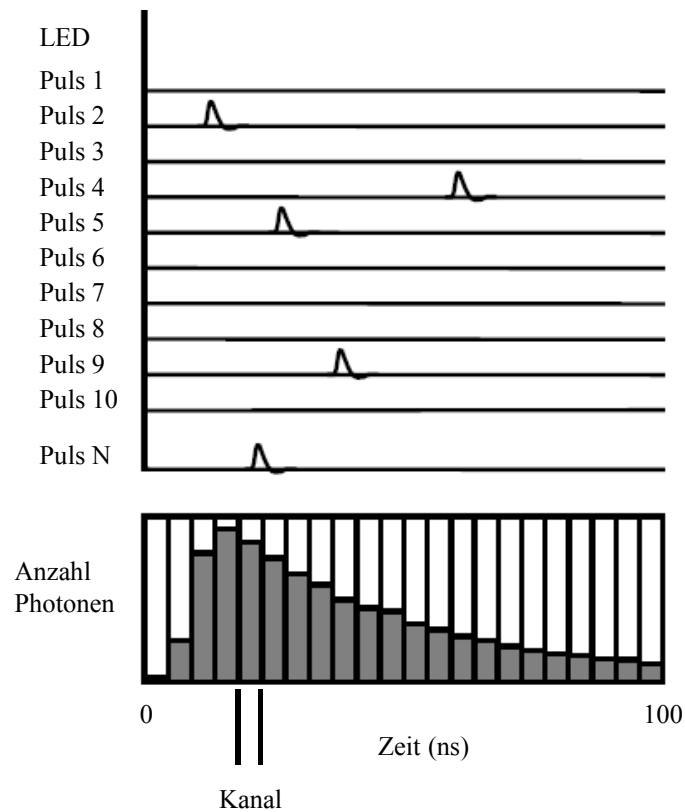


Abb. 15: Messprinzip des zeitkorrelierten Einzelphotonenzählens (TCSPC). Die nach Anregung (Puls bei $t = 0$) auftretenden Photonen (als Häkchen dargestellt) werden von der Auswerteeinheit in einem Histogramm dargestellt. Hierbei werden die gezählten Photonen in die verschiedenen Zeitkanäle (x-Achse) eingeordnet (verändert nach Becker & Bergmann, 2005).

Die Zeitauflösung der Fluoreszenz-Intensitätszerfälle zur Ermittlung der Fluoreszenz-Lebensdauer betrug 64 ps pro Kanal und die Messung erfolgte so lang, bis ein Peak von 1×10^4 Photonen erreicht wurde.

Die Fluoreszenz-Intensitätszerfälle zur Ermittlung der Anisotropie und der Rotationskorrelationszeit wurden bei einer Zeitauflösung von 128 ps pro Kanal durchgeführt und die Peak-Intensität des $I_{VV}(t)$ -Signals betrug mindestens 3×10^4 Photonen.

2.17.6 Fluoreszenz-Intensitätszerfall von Fluoreszenz-Lebensdauer-Standards

Bevor mit den eigentlichen Messungen des Fluoreszenz-Intensitätszerfalls begonnen wurde, wurden die Fluoreszenz-Lebensdauern von Fluoreszenz-Lebensdauer-Standards gemessen. Dies sind Moleküle, die einen mono-exponentiellen Zerfall aufweisen, dessen Fluoreszenz-

Lebensdauern bekannt sind. Abweichungen der Messergebnisse können somit auf systemabhängige Fehler hinweisen. Der gewählte Standard sollte bei der gleichen Wellenlänge wie die zu messende Probe absorbieren, damit dieselben Geräte-Einstellungen verwendet werden können.

Als Standards wurden 2,5-Diphenyloxazol (PPO) und das Tryptophanalogon N-Acetyl-L-tryptophanamid (NATA) verwendet. PPO wurde in Ethanol (entgast) und NATE in 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) aufgenommen. Die Standards wurden daraufhin in eine Quarzküvette überführt und der Fluoreszenz-Intensitätszerfall ohne Emissionspolarisator mit Anregung bei 290 nm gemessen. Der jeweilige Fluoreszenz-Intensitätszerfall sowie die errechnete Fluoreszenz-Lebensdauer sind in Abb. 16 (A, B) dargestellt. Tryptophan und dessen Analogon N-Acetyl-L-tryptophanethylester (NATE) werden für gewöhnlich nicht als Fluoreszenz-Lebensdauer-Standards verwendet, da diese jeweils zwei Fluoreszenz-Lebensdauern aufweisen. Diese hängen stark von der Anregungswellenlänge und dem pH-Wert des verwendeten Puffers ab (de Lauder & Wahl, 1970). Dennoch können die Fluoreszenz-Lebensdauern mit Werten aus der Literatur verglichen werden. NATE sowie Tryptophan wurden in 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) aufgenommen und jeweils in eine Quarzküvette überführt. Der Fluoreszenz-Intensitätszerfall von NATE wurde ohne Emissionspolarisator, der des Tryptophans unter „magic angle“-Bedingungen gemessen (Kap. 2.17.4). Die Anregung erfolgte bei 290 nm. Der jeweilige Fluoreszenz-Intensitätszerfall und die errechneten Fluoreszenz-Lebensdauern von Tryptophan und NATE sind in Abb. 16 (C, D) dargestellt.

Alle hier aufgeführten Fluoreszenz-Lebensdauern standen in Einklang mit den Literaturwerten (Szabo & Rayner, 1980; Petrich *et al.*, 1983; Lakowicz, 2006) und eine korrekte Funktion der Geräte war somit gewährleistet.

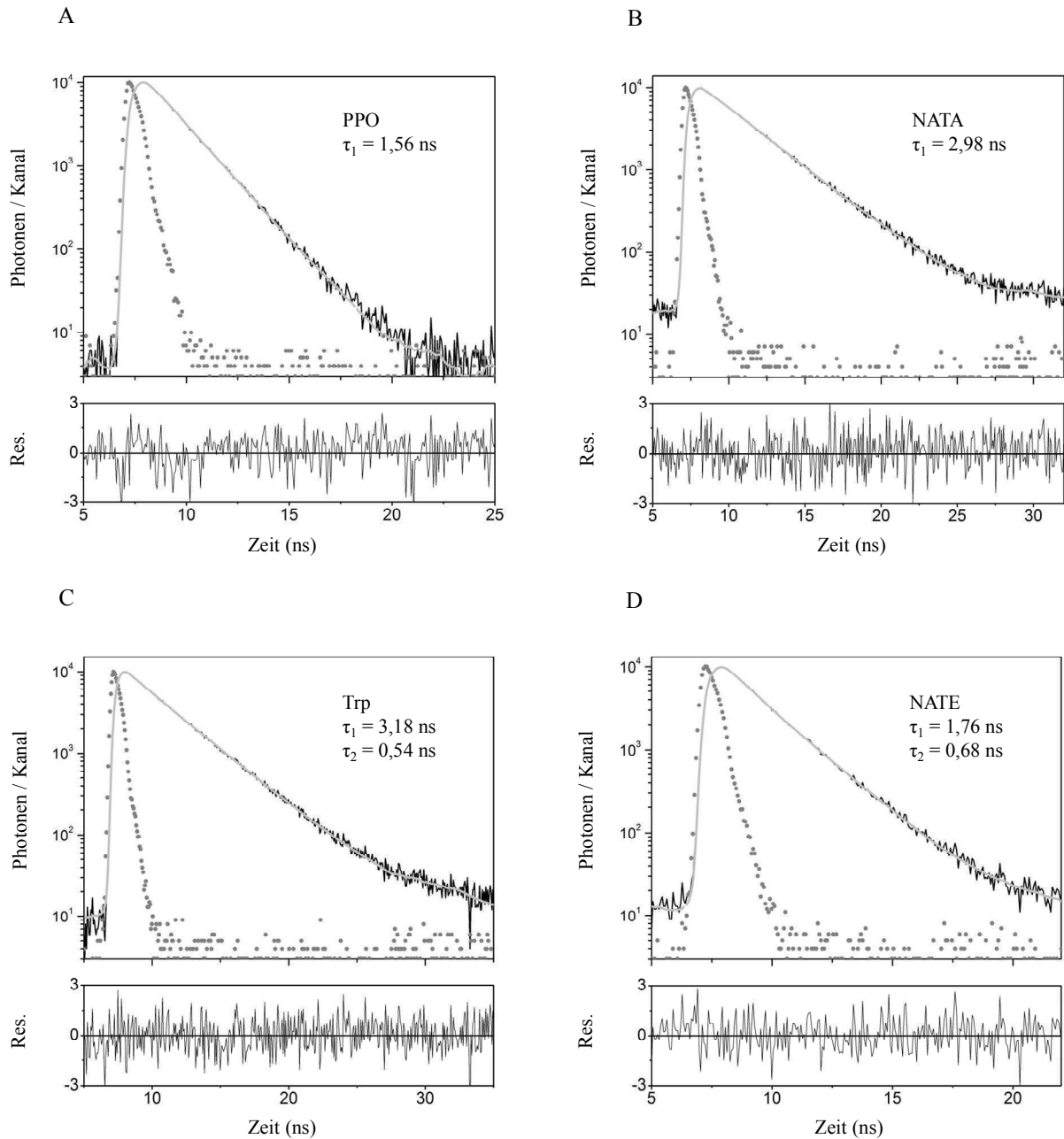


Abb. 16: Fluoreszenz-Intensitätszerfall der Fluoreszenz-Lebensdauer-Standards sowie von Tryptophan und N-Acetyl-L-tryptophanethylester. Der Fluoreszenz-Intensitätszerfall der Fluoreszenzlebensdauer-Standards (A) 2,5-Diphenyloxazol (PPO), (B) N-Acetyl-L-tryptophanamid (NATA) sowie von (C) Tryptophan (Trp) und (D) N-Acetyl-L-tryptophanethylester (NATE) sind dargestellt. Die Apparatefunktion (IRF) ist jeweils durch die gepunktete Linie gezeigt. Die jeweilige Fluoreszenz-Lebensdauer (τ_i) von PPO und NATA wurde anhand eines mono-exponentiellen Fluoreszenz-Intensitätszerfalls angepasst, die von Trp und NATE anhand eines doppel-exponentiellen Zerfalls (graue Linie). Das Residuum (jeweils untere Graphik) stellt die Abweichung zwischen Anpassung und Messung dar. PPO wurde in Ethanol (entgast) gelöst. Tryptophan, NATA und NATE wurden in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,0 aufgenommen. Die

Messungen des Fluoreszenz-Intensitätszerfalls von PPO sowie von NATA und NATE wurden ohne Emissionspolarisator, die von Tryptophan unter „magic angle“-Bedingungen (Kap. 2.17.4) durchgeführt. Alle Messungen erfolgten bei 25°C mit Anregung bei 290 nm.

2.17.7 Datenanalyse

2.17.7.1 Berechnung des Fluoreszenzmaximums und der Breite des Emissionsspektrums (FWHM)

Das Fluoreszenzspektrum des Puffers wurde gemessen um dessen Spektrum von dem der Probe zu subtrahieren. Dadurch wurde die Eigenfluoreszenz des Puffers berücksichtigt. Die korrigierten Emissionsspektren wurden anschließend mit Hilfe der logarithmischen-Normalverteilung

$$F(\lambda)_{\log\text{-normal}} = F_0 \exp \left[-\frac{\ln 2}{\ln^2 \rho} \ln^2 \left(1 + \frac{(\lambda - \lambda_{\max})(\rho^2 - 1)}{\rho \Gamma} \right) \right] \quad (4)$$

analysiert (Ladokhin *et al.*, 1991). F_0 ist der Wert der maximalen Fluoreszenzintensität bei dem Fluoreszenzmaximum λ_{\max} , ρ ist der Parameter der Asymmetrie des Spektrums und Γ ist die Breite des Spektrums auf halber Höhe der maximalen Fluoreszenz-Intensität (= full width at half maximum, FWHM).

2.17.7.2 Erstellen der Bindungskurve und Berechnung der Dissoziationskonstante (K_D)

Die Bindungskurven wurden anhand der Emissionsspektren durch Auftragen von $\Delta F_i = |F_i(1 + V_i/V_0) - F_0|$ gegen die molare Konzentration von Pf3W0 coat erhalten. Dabei ist F_i der Fluoreszenzwert beim i-ten Titrationsschritt und F_0 das Ausgangsmaximum der Fluoreszenz der Probe ohne Substrat. Die Bindungskurven wurden unter Verwendung der Fluoreszenzintensität bei 344 nm, die ungefähr dem Fluoreszenzmaximum entsprach, erstellt. Um die Volumenzunahme im Verlauf der Titration in der Auswertung zu berücksichtigen, wurde F_i mit $(1 + V_i/V_0)$ multipliziert, wobei V_i das gesamte zugegebene Volumen beim i-ten Titrationsschritt und V_0 das Ausgangsvolumen ist.

Die Dissoziationskonstante K_D kann dann durch Anpassung der Bindungskurve in der hyperbolischen Gleichung

$$\Delta F = \Delta F_{\max} \frac{[\text{Pf3}]}{[\text{Pf3}] + K_D} \quad (5)$$

berechnet werden. Dies gilt nur streng wenn $[\text{Pf3}] \gg \gg [\text{YidC}]$. Dabei ist ΔF_{\max} die maximale Fluoreszenzänderung bei Sättigung.

Die Daten wurden mittels Origin 6.1 Software (Originlab Corp., Northampton, MA, USA) ausgewertet.

2.17.7.3 Berechnung der Fluoreszenz-Lebensdauer

Der Intensitätszerfall der Fluoreszenz wird im einfachsten Fall für einen monoexponentiellen Zerfall durch

$$I(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (6)$$

beschrieben, wobei I_0 die Fluoreszenzintensität bei Zeit $t = 0$ ist und τ die Fluoreszenz-Lebensdauer (Lakowicz, 2006). Bei komplexen Biomolekülen treten dagegen häufig multiexponentielle Fluoreszenz-Intensitätszerfälle $I(t)$ auf:

$$I(t) = I_0 \sum \alpha_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) \quad (7)$$

Wenn die IRF-Breite (Kap. 3.7.2.1) im Bereich der kürzesten zu messenden Fluoreszenz-Lebensdauer liegt (hier $\text{IRF} \approx 0,7 \text{ ns}$, $\tau_1 = 1,0 \text{ ns}$) sollte diese Art der Auswertung benutzt werden:

$$I(t) = \int_{-\infty}^t \text{IRF}(t') \sum_{i=1}^3 I_0 \alpha_i \exp\left(-\frac{t-t'}{\tau_i}\right) dt' \quad (8)$$

wobei τ_i die Fluoreszenz-Lebensdauer und α_i der Anteil der Zerfallskomponenten der i -ten Lebenszeitkomponente des gesamten Fluoreszenz-Intensitätszerfalls I_0 ($\sum \alpha_i = 1$) ist. Der

anteilige Beitrag f_i jeder Fluoreszenz-Lebensdauer-Komponente τ_i zur Gesamtintensität der Fluoreszenz wird durch

$$f_i = \frac{\alpha_i \tau_i}{\sum_i \alpha_i \tau_i} \quad (9)$$

bestimmt.

2.17.7.4 Berechnung der Anisotropie und Rotationskorrelationszeit

Die zeitaufgelöste Anisotropie wird unter Berücksichtigung des Gerätefaktors nach folgender Gleichung berechnet:

$$r(t) = \frac{I_{VV}(t) - G I_{VH}(t)}{I_{VV}(t) + 2 G I_{VH}(t)} \quad (10)$$

wobei I_{VV} und I_{VH} dem Fluoreszenz-Intensitätszerfall entsprechen, der mit vertikal polarisierter Anregung und vertikal bzw. horizontal polarisierter Emission gemessen wird. Durch Einbeziehen des Geräte-Faktors G wird die Empfindlichkeit des Detektionssystems für polarisierte Strahlung berücksichtigt. Im Idealfall ist $G = 1$.

Die Anisotropie wurde dann mit der Gleichung

$$r(t) = r_\infty + \sum_{i=1}^2 r_i \exp(-t/\theta_i) \quad (11)$$

angepasst, wodurch die Rotationskorrelationszeit θ berechnet werden konnte. Dabei ist r_i die Anisotropie zu der Rotationskorrelationszeit θ_i . r_∞ steht für einen von Null verschiedenen Wert bei der Zeit $t \rightarrow \infty$.

Die fundamentale Anisotropie ist die Summe

$$r_0 = r_\infty + r_1 + r_2 \quad (12)$$

Der Grund für das Einbeziehen von r_∞ ist, dass für die Versuche Liposomen verwendet wurden, die einen Durchmesser von ≈ 150 nm hatten und deshalb sehr langsam rotierten. Mittels Stokes-Einstein Gleichung

$$\theta = \frac{4\pi\eta R^3}{3kT} \quad (13)$$

die für kugelförmige Partikel gilt, kann die Rotationskorrelationszeit mit der absoluten Temperatur $T = 298 \text{ K}$ ($\approx 25^\circ\text{C}$) und einer Viskosität von $\eta = 1 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ berechnet werden. R bezeichnet den Partikelradius und k ist die Boltzmann-Konstante. Ein kugelförmiges Partikel mit einem Durchmesser von 150 nm hatte demnach eine Rotationskorrelationszeit von $0,44 \text{ ms}$. Die Korrelationszeiten in diesem Bereich hatten keinen Einfluss auf die Anisotropie-Zerfälle im $1 - 100 \text{ ns}$ -Bereich und wurden durch den Konstanten Term r_∞ berücksichtigt.

3. Ergebnisse

Der YidC-Wildtyp enthält 11 Tryptophan-Reste, die alle auf der dem Periplasma zugewandten Seite von YidC lokalisiert sind (Kiefer & Kuhn, 2007). Die in dieser Arbeit verwendeten YidC-Tryptophanmutanten enthielten jeweils nur einen Tryptophan-Rest an Position 354, 454 oder 508 bzw. zwei Tryptophan-Reste an den Positionen 332/334 (2W). Die restlichen Tryptophane wurden mittels ortsgerichteter Mutagenese jeweils durch Phenylalanin ersetzt. Dies ist ebenfalls eine aromatische Aminosäure, deren Struktur der des Tryptophans ähnelt, sodass die Funktion von YidC trotz des Austauschs aufrechterhalten sein sollte. Zusätzlich wurde jede Mutante sowie der YidC-Wildtyp am C-Terminus durch PCR mit einem sogenannten His-Tag, bestehend aus 10 Histidin-Resten, versehen, der die Reinigung der YidC-Konstrukte ermöglichen sollte. Diese Mutanten sowie der YidC-Wildtyp – jeweils mit einem His-Tag fusioniert – werden im Folgenden benannt als: YidC_{2W}, YidC_{W354}, YidC_{W454}, YidC_{W508} bzw. YidC_{wt}. Um zu zeigen, dass diese Veränderungen von YidC keinen Einfluss auf die Funktionalität des Proteins haben, wurde untersucht, ob die YidC-Tryptophanmutanten sowie der YidC-Wildtyp, in *E. coli* funktionell sind. Dies wurde auf zwei verschiedene Arten getestet. Zum einen durch Komplementation eines YidC-Depletionsstammes und zum anderen durch Untersuchung der Insertion eines strikt von YidC abhängigen Proteins in die Cytoplasmamembran des YidC-Depletionsstammes.

3.1 Funktionalität der YidC-Tryptophanmutanten und des YidC-Wildtyps

YidC ist essentiell für *E. coli*, deshalb konnte Wachstum nur stattfinden, wenn funktionsfähiges YidC in der Zelle vorhanden war. Um zu untersuchen, ob die YidC-Tryptophanmutanten YidC_{2W}, YidC_{W354}, YidC_{W454} und YidC_{W508} sowie der YidC-Wildtyp in *E. coli* funktionell sind, wurde getestet, ob diese YidC-Konstrukte den YidC-Depletionsstamm JS7131 komplementieren können. In diesem Stamm wurde das genomische *yidC*-Gen von Basenpaar 745 - 1566 deletiert. Diese Deletion führte dazu, dass das Gen kein funktionsfähiges YidC-Protein codierte. Ein alternatives, funktionelles *yidC*-Gen war in den *attB* Lokus inseriert. Zusätzlich wurde dieses *yidC*-Gen unter Kontrolle eines *araBAD*-Promotors und Operators gestellt (Abb. 17). Dadurch konnten die Transkription und somit auch die Expression von genomischem YidC mit Arabinose induziert und mit Glukose reprimiert werden (Samuelson *et al.*, 2000).

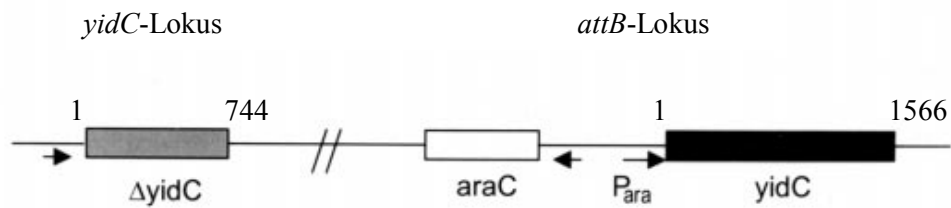


Abb. 17: Darstellung des *yidC*- und *attB*-Lokus des *E. coli* YidC-Depletionsstammes JS7131. Der YidC-Depletionsstamm JS7131 enthält genomisches *yidC*, das deletiert ($\Delta yidC$) ist und ein alternatives *yidC*-Gen unter Kontrolle eines *araBAD* Promotors (P_{ara}) und Operators (*araC*), das in den *attB* Locus inseriert ist (verändert nach Samuelson *et al.*, 2000).

3.1.1 Komplementation des YidC-Depletionsstammes JS7131

Das Gen des auf seine Funktionalität zu untersuchenden YidC-Konstrukts wurde unter Kontrolle eines Tac-Promotors in das Plasmid pGZ119EH kloniert. Dadurch war die Induzierbarkeit der jeweiligen plasmidcodierten YidC-Tryptophanmutante bzw. des YidC-Wildtyps mit IPTG gegeben.

Es hatte sich herausgestellt, dass auch ohne ersichtliche Shine-Dalgarno-Sequenz plasmidcodiertes YidC exprimiert werden konnte (Abb. 22). Trotzdem wurde vor jedes *yidC*-Gen entweder eine Nukleotidsequenz kloniert, die eine Shine-Dalgarno-Sequenz auf mRNA-Ebene darstellt, oder es wurden keine Nukleotide eingebracht, die eine ersichtliche Shine-Dalgarno-Sequenz darstellen. Diese Nukleotide (auf DNA-Ebene) werden im Folgenden als „mit Shine-Dalgarno-Motiv“ bzw. „ohne ersichtliches Shine-Dalgarno-Motiv“ bezeichnet. Wie gezeigt werden konnte, wurde das Wachstum der Zellen, die ein plasmidcodiertes YidC (Tryptophanmutante bzw. Wildtyp) mit und ohne ersichtliches Shine-Dalgarno-Motiv enthielten, auf verschiedene Art beeinflusst. Als Negativkontrolle wurde das leere Plasmid pGZ119EH mitgeführt. Die Konstrukte wurden in den *E. coli* YidC-Depletionsstamm JS7131 transformiert, der daraufhin auf sein Wachstum untersucht werden konnte.

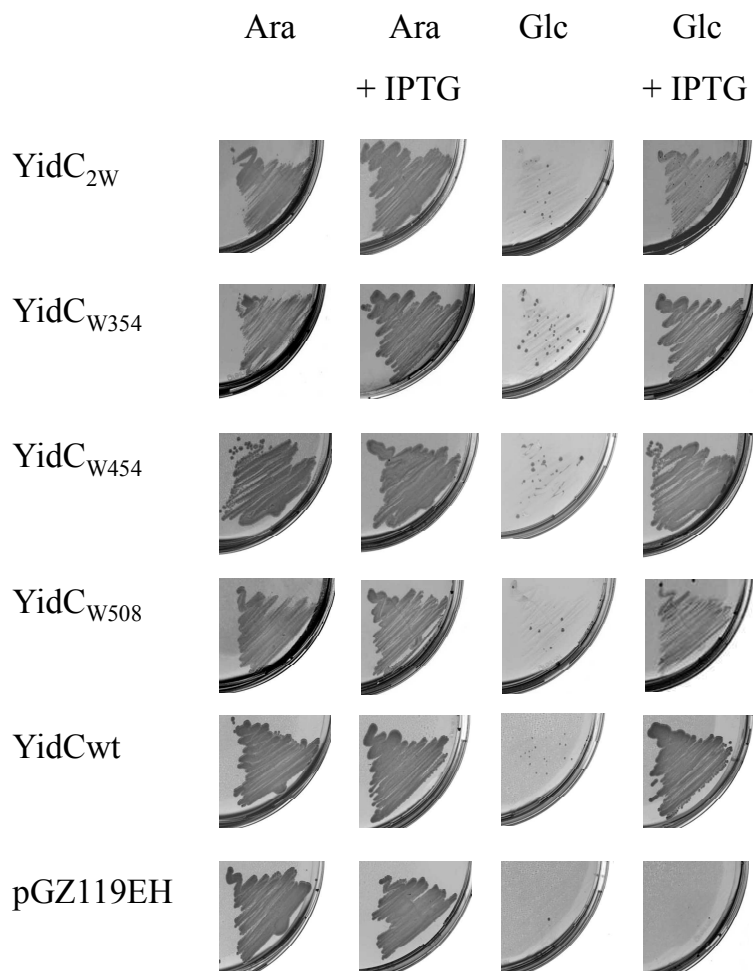
Die Ergebnisse der Komplementation mit den YidC-Konstrukten, die kein ersichtliches Shine-Dalgarno-Motiv enthielten, sind in Abb. 18 A dargestellt. Alle YidC-Tryptophanmutanten verhielten sich wie der YidC-Wildtyp. Auf LB-Agar-Platten mit Arabinose (Expression des genomischen YidC) und Arabinose/IPTG (Expression des genomischen YidC und des plasmidcodierten Proteins) fand Wachstum statt. Auf den Platten

mit Glukose (Repression des genomischen YidC) kam es zu keinem Wachstum. Die wenigen zu erkennenden Einzelkolonien sind wahrscheinlich Rekombinanten, die durch natürliche Rekombination mit dem noch verbliebenen, ursprünglichen *yidC*-Gen entstanden waren. Diese Zellen enthielten dadurch wahrscheinlich wieder ein genomisches *yidC*-Gen bzw. *yidC*-Gen-Fragment, welches funktionell war und unter Kontrolle des YidC-eigenen Promotors stand. War jedoch Glukose/IPTG in den LB-Agar-Platten vorhanden (Repression des genomischen YidC und Expression des plasmidcodierten Proteins), konnten die Zellen wachsen. Die Zellen, die das leere Plasmid pGZ119EH enthielten wuchsen lediglich auf Arabinose und Arabinose/IPTG, weil nur auf diesen Platten YidC exprimiert wurde. Unter Glukose- bzw. Glukose/IPTG-Bedingungen fand kein Wachstum statt, da das genomische YidC reprimiert wurde und kein plasmidcodiertes YidC vorhanden war. Dies zeigt, dass sowohl die YidC-Tryptophanmutanten als auch der YidC-Wildtyp den YidC-Depletionsstamm JS7131 komplementieren konnten und somit funktionell waren.

Die Ergebnisse der Komplementation mit den YidC-Tryptophanmutanten, die ein Shine-Dalgarno-Motiv enthielten, sind in Abb. 18B gezeigt. Die Mutanten verhielten sich wie der YidC-Wildtyp. Auf LB-Agar-Platten mit Arabinose/IPTG und Glukose/IPTG fand kein Wachstum statt. Auf Platten, die lediglich Glukose bzw. Arabinose enthielten kam es zu Wachstum. Die Zellen, die das leere Plasmid pGZ119EH enthielten wuchsen nur auf Platten mit Arabinose und Arabinose/IPTG. Unter diesen Bedingungen wurde genomisches YidC exprimiert. Dies zeigt, dass durch die Überexpression (IPTG-Zugabe) der plasmidcodierten YidC-Konstrukte, die ein Shine-Dalgarno-Motiv enthielten eine Hemmung des Wachstums des Depletionsstammes verursacht wurde. Diese Überexpression an YidC scheint extrem toxisch auf die Zellen zu wirken, da es nicht einmal zum Wachstum von Rekombinanten auf den Platten mit Glukose/IPTG kam. Es ist anzunehmen, dass ohne ersichtliches Shine-Dalgarno-Motiv weniger Protein exprimiert wird als mit Shine-Dalgarno-Motiv. Diese Annahme wurde anhand eines weiteren Versuchs verifiziert (Kap. 3.2).

A

Konstrukte ohne ersichtliches Shine-Dalgarno-Motiv

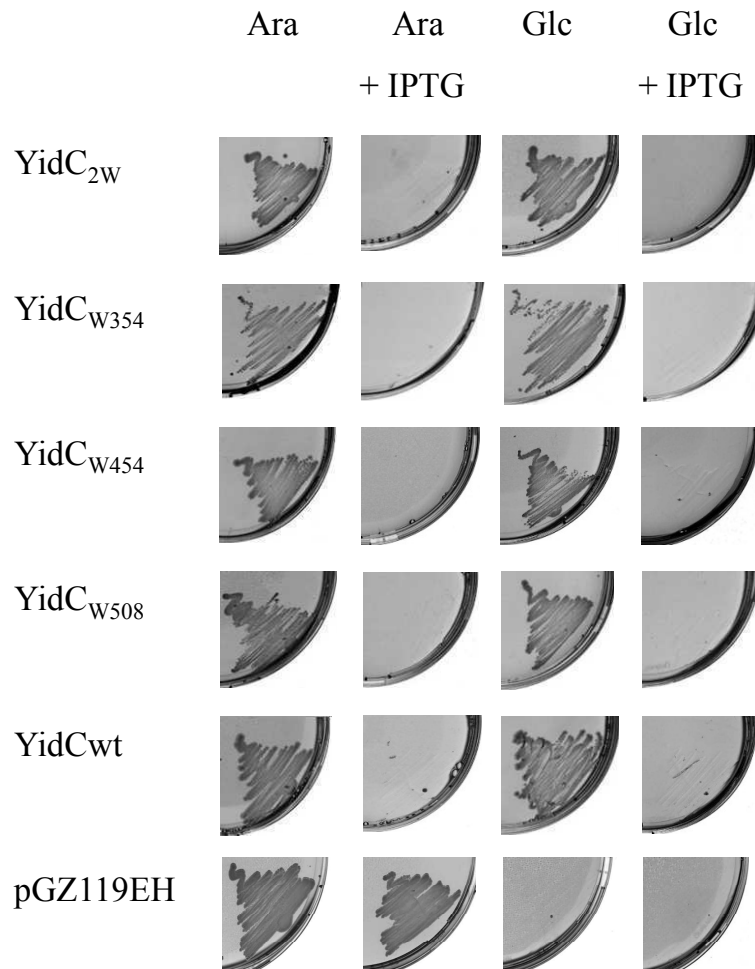


Multiple Klonierungsstelle:

... GAATTCGAGCTCGGTACCCAATTCATATG ... *yidC* ... TGAAGCTT ...

B

Konstrukte mit Shine-Dalgarno-Motiv



Multiple Klonierungsstelle:

... GAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAAATAATTTTGT
 TTAAC TTAAAG **AAGGAG** ATATACATATG ... *yidC* ... TGAAGCTT ...

Abb. 18: Komplementation des *E. coli* YidC-Depletionsstammes JS7131 durch die YidC-Tryptophanmutanten. Es wurde getestet, ob der YidC-Depletionsstamm JS7131 durch die plasmidcodierten YidC-Tryptophanmutanten YidC_{2W}, YidC_{W354}, YidC_{W454} und YidC_{W508} sowie durch den plasmidcodierten YidCwt ohne ersichtliches Shine-Dalgarno-Motiv (A) und mit Shine-Dalgarno-Motiv (B) komplementiert werden konnte. Als Negativ-Kontrolle wurden Zellen, die das leere Plasmid pGZ119EH enthielten, mitgeführt. Der mit dem jeweiligen Plasmid transformierte YidC-Depletionsstamm wurde für 16 h bei 37°C in LB-Flüssigmedium, das mit Chloramphenicol und Arabinose versetzt war, inkubiert. Diese Kultur wurde 1:10 mit LB-Medium verdünnt und 5 µl der Verdünnung wurden auf LB-Agar-Platten, die Arabinose (Ara), Arabinose/IPTG (Ara + IPTG),

Glukose (Glc) bzw. Glukose/IPTG (Glc + IPTG) enthielten, ausgestrichen und für 16 h bei 37°C inkubiert. Die jeweilige multiple Klonierungsstelle des Vektors pGZ119EH mit ligiertem *yidC*-Gen ist dargestellt. Die Nukleotidsequenz, welche auf mRNA-Ebene das Start- (ATG) bzw. Stop-Codon (TGA) bildet sowie das Shine-Dalgarno-Motiv (AAGGAG), sind markiert.

3.1.2 Insertion von PClep in die Cytoplasmamembran von *E. coli*

Als weiterer Nachweis der Funktionalität wurde untersucht, ob die YidC-Tryptophanmutanten YidC_{2W}, YidC_{W354}, YidC_{W454} und YidC_{W508} sowie der YidC-Wildtyp in der Lage waren, das strikt von YidC abhängige Protein PClep in die Cytoplasmamembran (= innere Membran) von *E. coli* zu inserieren. Dies ist ein Fusionsprotein aus M13 procoat und der P2-Domäne der Leader Peptidase. Die P2-Domäne besteht aus 103 Aminosäure-Reste der periplasmatischen Domäne der Leader Peptidase und ist an den C-Terminus von M13 procoat fusioniert (Kuhn *et al.*, 1986). Wird PClep mittels YidC in die Cytoplasmamembran inseriert, kann es von der Leader Peptidase auf der periplasmatischen Seite prozessiert und in das mature Protein Clep konvertiert werden (Abb. 19). Die Vorläufer-Form, das PClep, wird durch die Prozessierung mittels Leader Peptidase vom N-Terminus aus um 23 Aminosäuren gekürzt. Da nur das inserierte Protein prozessiert werden kann setzen diese Vorgänge ein funktionsfähiges YidC-Konstrukt voraus.

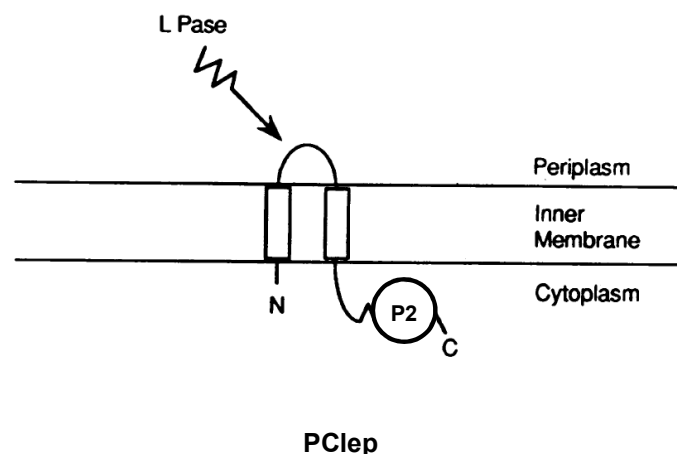


Abb. 19: Membrantopologie des Proteins PClep. Das Protein M13 procoat, dessen hydrophobe Transmembrandomänen als Rechtecke dargestellt sind, ist mit der P2-Domäne, bestehend aus 103 Aminosäuren der periplasmatischen Domäne der Leader Peptidase, fusioniert. Dieses Fusionsprotein wird PClep genannt und ist in der inneren Membran von *E. coli* lokalisiert. Die Prozessierung des PClep durch die Leader Peptidase (L Pase) auf der periplasmatischen Seite ist durch einen Pfeil gekennzeichnet (verändert nach Cao *et al.*, 1995).

Für diese Versuche wurde, wie auch für die Komplementations-Tests, der YidC-Depletionsstamm JS7131 verwendet. Das jeweilige *yidC*-Gen auf dem Plasmid pGZ119EH und das Gen *pclep* auf dem Plasmid pMS119EH wurden zusammen in den Depletionsstamm transformiert. Als Negativkontrolle wurden Zellen, in die das leere Plasmid pGZ119EH und das Plasmid pMS119EH mit dem Gen *pclep* transformiert wurden, mitgeführt. Die Zellen wurden für 4 h bei 37°C unter Glukose- (Repression des genomischen YidC) bzw. Arabinose-Bedingungen (Expression des genomischen YidC) kultiviert und anschließend durch Zentrifugation sedimentiert. Nach dieser Zeit sollte das genomische YidC in den Ansätzen mit Glukose depletiert sein. Die Zellen konnten dann in Minimalmedium, welches alle Aminosäuren außer Methionin enthielt, resuspendiert werden. Nach 30 min Inkubation wurde die Expression der plasmidcodierten Konstrukte durch 1 mM IPTG induziert. Nach 5 min erfolgte die Zugabe von [³⁵S]-Methionin, sodass eine radioaktive Markierung aller neusynthetisierten Proteine stattfand. Nach 30 s wurde für 2 min Methionin im Überschuss zugegeben, damit die vollständige Translation aller radioaktiv markierten Proteine beendet werden konnte. Die Proben wurden direkt danach für mindestens 1 h mit TCA gefällt und daraufhin mit Aceton gewaschen. Nach fünfminütigem Erhitzen bei 70°C in SDS-Probenpuffer konnten die Proben durch SDS-PAGE auf ihren Gehalt an in diesem Zeitfenster exprimiertem, membraninsertertem und prozessiertem Clep untersucht werden. Das von der Leader Peptidase prozessierte Clep war um ca. 2,5 kDa kleiner als die unprozessierte Form PClep und konnte deshalb anhand seiner Größe von diesem auf einem SDS-Gel unterschieden werden. Die Ergebnisse der radioaktiven Markierung sind in Abb. 20 dargestellt. Durch Quantifizierung mittels Aida Development-Software konnte der Anteil an prozessiertem Protein ermittelt werden, indem die gemeinsame Menge von PClep und Clep auf 100% gesetzt wurde. Unter Arabinose-Bedingungen wurde in den Zellen unabhängig von dem enthaltenen plasmidcodierten Konstrukt 100% des PClep prozessiert. Unter Glukose-Bedingungen unterschied sich der Anteil an prozessiertem PClep. Die Quantifizierung ergab, dass in Zellen, welche die plasmidcodierten Mutanten YidC_{W508} und YidC_{2W} enthielten, ca. 70% des PClep in die Membran inseriert wurden und von der Leader Peptidase prozessiert werden konnten. In Zellen, die die plasmidcodierten Mutanten YidC_{W354} und YidC_{W454} enthielten, wurden 76% bzw. 81% des PClep prozessiert. 100% des PClep wurden in Zellen, die den plasmidcodierten YidC-Wildtyp enthielten, prozessiert. Auch in den Zellen, welche anstelle eines YidC-Konstruktes das leere Plasmid enthielten, fand eine Insertion und Prozessierung des PClep statt, jedoch weniger effektiv (59%) als in den Zellen, welche die plasmidcodierten YidC-Konstrukte enthielten.

3. Ergebnisse

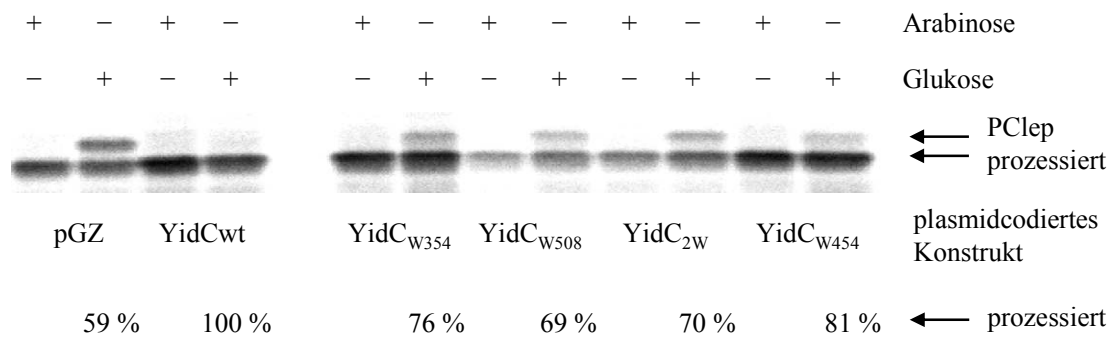


Abb. 20: Radioaktive Markierung von neusynthetisiertem PClep im YidC-Depletionsstamm

JS7131. Die jeweilige plasmidcodierte YidC-Tryptophanmutante (YidC_{2W}, YidC_{W354}, YidC_{W454}, YidC_{W508}) sowie der YidC-Wildtyp (YidCwt) und die Negativkontrolle, das leere Plasmid pGZ110EH (pGZ), wurden zusammen mit dem plasmidcodierten PClep in den YidC-Depletionsstamm JS7131 transformiert. Die jeweiligen Zellen wurden für 4 h unter Arabinose- bzw. Glukose-Bedingungen bei 37°C im Wasserbadschüttler kultiviert. Daraufhin wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert, in Minimalmedium, welches alle Aminosäuren außer Methionin enthielt resuspendiert und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Proteinexpression wurde dann für 5 min mit 1 mM IPTG induziert. Direkt im Anschluss wurde radioaktives [³⁵S]-Methionin zugegeben, damit alle neu synthetisierten Proteine durch Einbau dieses Methionins radioaktiv markiert wurden. Nach 30 s wurde ein Überschuss an Methionin zugegeben, sodass die Translation aller radioaktiv markierten Proteine vollständig abgeschlossen werden konnte. Die Zellen wurden nach 2 min für mindestens 1 h mit TCA versetzt. Nach Waschen mit Aceton wurden die Ansätze für 5 min bei 70°C in SDS-Probenpuffer erhitzt. Anschließend wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Dargestellt sind das neusynthetisierte PClep sowie dessen durch YidC in die Cytoplasmamembran inserierte und mittels Leader Peptidase prozessierte Form Clep. Der jeweilige Anteil an prozessiertem Protein in den Ansätzen unter Glukose-Bedingungen wurde durch Quantifizierung mittels Aida Development-Software ermittelt und in % angegeben.

Ein Teil der Zellen (500 µl) wurde vor der radioaktiven Markierung der neusynthetisierten Proteine entnommen und mit TCA gefällt um zu kontrollieren, ob YidC unter Glukose-Bedingungen tatsächlich depletiert war. Die Proben wurden anschließend mit Aceton gewaschen, für 5 min bei 70°C in SDS-Probenpuffer erhitzt und dann durch SDS-PAGE, Western blot und Immundetektion mit dem YidC-Antikörper analysiert. Das Ergebnis ist in Abb. 21 zu sehen. Die Zellen unter Arabinose-Bedingungen exprimierten YidC (genomisch und plasmidcodiert) und die Zellen unter Glukose-Bedingungen wiesen keine detektierbaren Mengen an YidC auf.

3. Ergebnisse

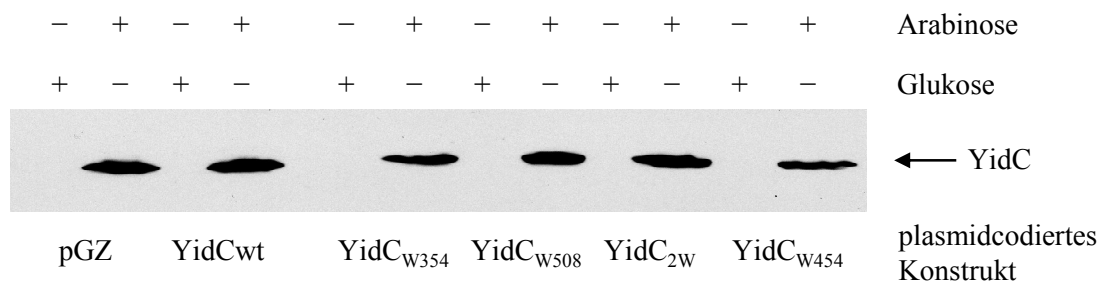


Abb. 21: Depletion des *E. coli* YidC-Depletionsstammes JS7131. Um zu testen, ob der YidC-Depletionsstamm JS7131 unter Glukose-Bedingungen YidC depletiert war, wurde eine Probe vor der radioaktiven Markierung der neusynthetisierten Proteine entnommen. Als Positivkontrolle diente jeweils eine Probe der Kulturen, die unter Arabinose-Bedingungen behandelt wurden. Die Proben wurden für mindestens 1 h mit TCA gefällt und anschließend mit Aceton gewaschen und in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Nach fünfminütigem Erhitzen bei 70°C wurden die Proben durch SDS-PAGE, Western blot und Immundetektion mit dem YidC-Antikörper analysiert sowie auf einem Röntgenfilm visualisiert.

Da die Negativ-Kontrolle (pGZ) in den radioaktiven Versuchen prozessiertes PClep aufwies, obwohl mittels YidC-Antikörper kein YidC detektiert werden konnte, wird davon ausgegangen, dass geringste nicht zu detektierende Mengen an YidC trotz Glukose-Bedingungen noch in den Zellen vorhanden waren.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die YidC-Tryptophanmutanten YidC_{2W}, YidC_{W354}, YidC_{W454} und YidC_{W508} sowie der YidC-Wildtyp in der Lage waren das strikt von YidC abhängige Protein PClep in die Cytoplasmamembran von *E. coli* zu inserieren, sodass es auf der periplasmatischen Seite von der Leader Peptidase in das mature Protein Clep prozessiert werden konnte. Die Insertion erfolgte weniger effizient als durch den YidC-Wildtyp, sie ist aber dennoch möglich.

3.2 Expressionstest von YidC_{W454} in pGZ119EH mit und ohne ersichtliches Shine-Dalgarno-Motiv im YidC-Depletionsstamm JS7131

Um zu zeigen, dass die Menge an exprimiertem YidC_{W454} im Plasmid pGZ119EH mit Shine-Dalgarno-Motiv höher war als ohne ersichtliches Shine-Dalgarno-Motiv und somit durchaus toxisch auf den YidC-Depletionsstamm JS7131 wirken könnte, wurde ein Expressionstest der in den Depletionsstamm transformierten Mutante YidC_{W454} in LB-Flüssigmedium unter

3. Ergebnisse

Arabinose-Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden bei einer $OD_{605} = 0,5$ durch IPTG-Zugabe induziert. Die Induktion erfolgte für 16 h bei 37°C. Nach 1, 2, 3, 4 und 16 h wurde jeweils eine Probe entnommen und mit TCA gefällt. Nach Waschen mit Aceton wurden die Proben für 5 min bei 70°C in SDS-Probenpuffer erhitzt und auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Nach Western blot und Immundetektion mit dem His-Antikörper konnte $YidC_{W454}$ spezifisch visualisiert werden. In Abb. 22 sind die zu den unterschiedlichen Zeitpunkten exprimierten Mengen an $YidC_{W454}$ (mit und ohne ersichtliches Shine-Dalgarno-Motiv) im Vergleich gezeigt. Nach 1 - 4 h Induktion mit IPTG war eine deutliche Expression der Mutante $YidC_{W454}$ im Plasmid pGZ119EH mit Shine-Dalgarno-Motiv zu erkennen. Zusätzlich zu dem überexprimierten Protein wurde in jedem Ansatz eine Abbaubande detektiert. Nach Induktion für 16 h wurde das Protein größtenteils abgebaut, was die schwächere Bande nach dieser Induktionszeit erklärt. Der Abbau erfolgte vom N-Terminus des Proteins aus, da der am C-Terminus fusionierte His-Tag mittels His-Antikörper detektiert werden konnte. Die Expression der Mutante $YidC_{W454}$ in pGZ119EH ohne ersichtliches Shine-Dalgarno-Motiv war nach allen Induktionszeiten deutlich schwächer als die mit Shine-Dalgarno-Motiv. Die Proben, die vor Induktion entnommen wurden zeigen, dass die Mutante $YidC_{W454}$ im Plasmid pGZ119EH mit Shine-Dalgarno-Motiv schon vor Induktion exprimiert wurde. Im Gegensatz dazu fand bei der Mutante ohne ersichtliches Shine-Dalgarno-Motiv keine Expression vor Induktion statt.

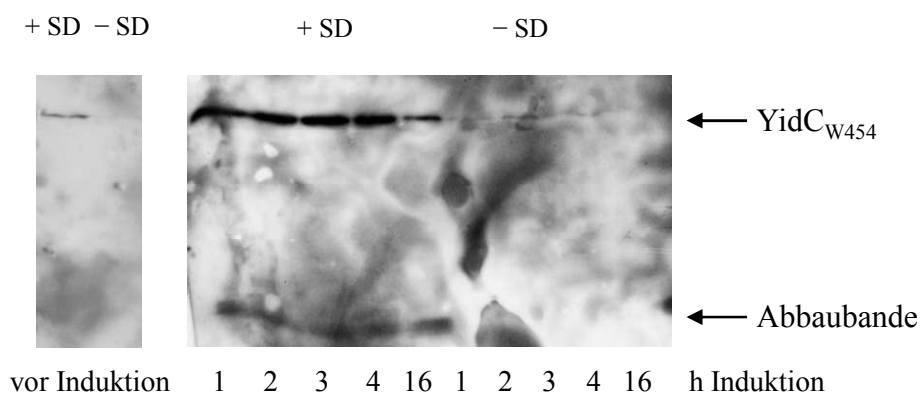


Abb. 22: Expression der YidC-Tryptophanmutante $YidC_{W454}$. Die Mutante $YidC_{W454}$ im Plasmid pGZ110EH mit Shine-Dalgarno-Motiv (+ SD) bzw. ohne ersichtliches Shine-Dalgarno-Motiv (- SD) wurde im *E. coli* YidC-Depletionsstamm JS7131 unter Arabinose-Bedingungen überexprimiert. Der mit dem jeweiligen Plasmid transformierte Stamm wurde dafür unter Arabinose-Bedingungen bis zu einer $OD_{605} = 0,5$ bei 37°C inkubiert und mit 1 mM IPTG induziert. Vor Induktion sowie nach Induktionszeiten von 1, 2, 3, 4 und 16 h wurde jeweils eine Probe

entnommen, für mindestens 1 h mit TCA gefällt und mit Aceton gewaschen. Nach Erhitzen für 5 min bei 70°C in SDS-Probenpuffer wurden die Proben mittels SDS-PAGE, Western blot und Immundetektion mit dem His-Antikörper analysiert und konnten auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden. Neben der intakten YidC_{W454}-Proteinbande kam eine Abbaubande zum Vorschein.

3.3 Stabilität der Tryptophanmutante YidC_{W454} und des YidC-Wildtyps jeweils in pGZ119EH mit Shine-Dalgarno-Motiv im *E. coli* YidC-Depletionsstamm JS7131

Dieser Versuch diente der Untersuchung der Stabilität des YidC-Wildtyps im Vergleich zur YidC-Tryptophanmutante YidC_{W454} – beide mit einem C-terminalen His₁₀-Tag fusioniert.

Bei der Analyse des im YidC-Depletionsstamm JS7131 unter Arabinose-Bedingungen exprimierten Proteins YidC_{W454} (mit Shine-Dalgarno-Motiv in pGZ119EH) wurde bereits festgestellt, dass neben der intakten Proteinbande eine Abbaubande zum Vorschein kam (Abb. 22). Nun wurde untersucht, ob der YidC-Wildtyp nach Induktion mit 1 mM IPTG unter Glukose-Bedingungen stabil war. Als Vergleich wurde die Tryptophanmutante YidC_{W454} unter denselben Bedingungen mitgeführt.

Die Plasmide pGZ YidCwt und pGZ YidC_{W454} jeweils mit Shine-Dalgarno-Motiv, wurden in den YidC-Depletionsstamm JS7131 transformiert. Je eine Vorkultur dieser Zellen wurde für 16 h bei 37°C unter Arabinose-Bedingungen im Wasserbadschüttler inkubiert und daraufhin mittels Zentrifugation sedimentiert und durch Resuspendieren in LB-Medium gewaschen. Je eine Hauptkultur wurde 1:50 mit der Vorkultur beimpft, bei 37°C unter Glukose-Bedingungen bis zu einer OD₆₀₅ = 0,5 inkubiert und anschließend mit 1 mM IPTG induziert. Die Induktion erfolgte für 16 h, wobei vor Induktion und nach 1, 2, 3, 4 und 16 h jeweils eine Probe entnommen wurde. Nach SDS-PAGE und Western blot konnte der His-Tag des jeweiligen YidC Proteins mit dem His-Antikörper detektiert werden. In Abb. 23 ist das Ergebnis der Expression des plasmidcodierten YidC_{W454} sowie des YidC-Wildtyps unter Glukose-Bedingungen zu sehen. Schon vor Induktion war eine geringe Expression der plasmidcodierten YidC-Konstrukte nachzuweisen. Die Mutante YidC_{W454} wurde jedoch vor Induktion in geringeren Mengen als der YidC-Wildtyp exprimiert. Bereits nach 1 h bis hin zu 16 h Induktion war neben der intakten Proteinbande von YidC_{W454} eine Abbaubande zu erkennen. Im Gegensatz dazu trat bei Expression des YidC-Wildtyps keine Abbaubande auf. Des Weiteren ist zu erkennen, dass die Menge an exprimiertem YidC-Wildtyp ungefähr

fünffmal so hoch war wie die Menge an YidC_{W454}. Dies begründet sich vermutlich im Abbau bzw. in der Instabilität der Mutante.

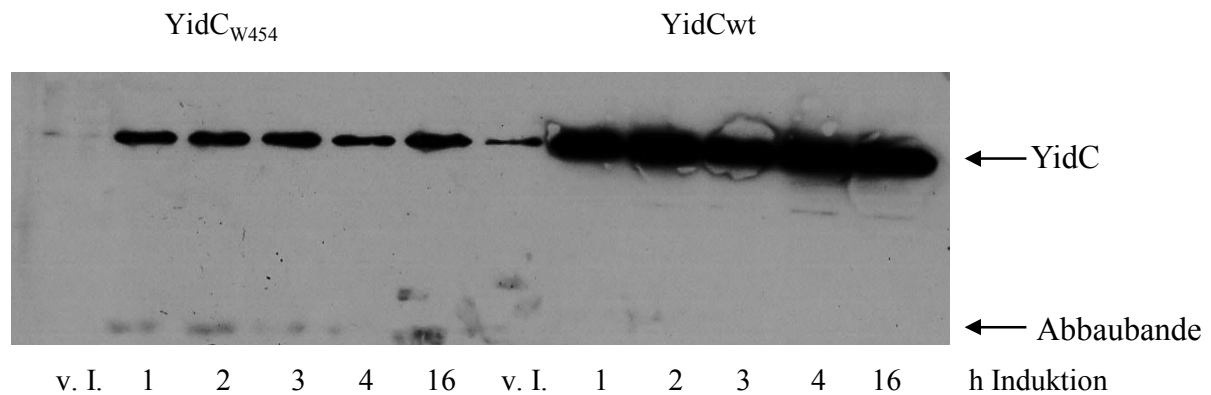


Abb. 23: Expression der YidC-Tryptophanmutante YidC_{W454} und des YidC-Wildtyps im YidC-Depletionsstamm JS7131. Die Mutante YidC_{W454} sowie der YidC-Wildtyp (YidCwt), jeweils im Plasmid pGZ110EH mit Shine-Dalgarno-Motiv, wurden in dem *E. coli* YidC-Depletionsstamm JS7131 unter Glukose-Bedingungen überexprimiert. Dafür wurde der mit dem jeweiligen Plasmid transformierte Depletionsstamm unter Glukose-Bedingungen bis zu einer OD₆₀₅ = 0,5 bei 37°C im Wasserbadschüttler inkubiert und die Proteinexpression anschließend mit 1 mM IPTG induziert. Vor Induktion (v. I.) und nach Induktionszeiten von 1, 2, 3, 4 und 16 h wurde jeweils eine Probe entnommen und für mindestens 1 h mit TCA gefällt und anschließend mit Aceton gewaschen. Die Proben wurden dann in SDS-Probenpuffer für 5 min bei 70°C erhitzt und mittels SDS-PAGE, Western blot und Immundetektion mit dem His-Antikörper analysiert und auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht. Neben der intakten YidC_{W454}-Proteinbande konnte eine Abbaubande detektiert werden.

Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Tryptophanmutante YidC_{W454} bei 37°C im YidC-Depletionsstamm JS7131 abgebaut wurde. Im Gegensatz dazu war der YidC-Wildtyp unter diesen Bedingungen stabil und wurde nicht abgebaut.

Da sich die Tryptophanmutante YidC_{W454} in den Komplementations-Experimenten (Abb. 18) und den Insertions-Experimenten (Abb. 20) wie die anderen Mutanten verhielt, wurde davon ausgegangen, dass alle Tryptophanmutanten (YidC_{2W}, YidC_{W354}, YidC_{W454} und YidC_{W508}) bei 37°C nicht völlig stabil waren aber trotzdem ihre Funktion erfüllen konnten.

3.4 Expression der YidC-Tryptophanmutanten in *E. coli*

Für die anschließenden Versuche war es von Nutzen, die größtmögliche Menge an gereinigten YidC-Tryptophanmutanten YidC_{2W}, YidC_{W354}, YidC_{W454} und YidC_{W508} zu erhalten. Deshalb wurde untersucht, in welchem Plasmid, bei welcher Wachstums-Temperatur und nach welcher Induktionszeit sich diese Mutanten am effektivsten überexprimieren ließen. Dies wurde anhand der Mutante YidC_{W454} und dem *E. coli* Stamm C43 getestet. Die Mutante wurde jeweils unter Kontrolle eines Tac-Promotors in den Plasmiden pGZ119EH und pMS119EH sowie unter Kontrolle eines T7-Promotors in dem Plasmid pET-16b untersucht. Dabei wurde jeweils ein Shine-Dalgarno-Motiv mitgeführt. Zusätzlich wurde die Mutante in dem Plasmid pGZ119EH ohne ersichtliches Shine-Dalgarno-Motiv untersucht. Die Plasmide wurden in den *E. coli* Stamm C43 transformiert. Es wurde jeweils eine Vorkultur in LB-Flüssigmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum angesetzt und für 16 h bei 37°C im Wasserbadschüttler inkubiert. Anschließend wurde mit dieser Vorkultur eine Hauptkultur angesetzt, die bei 37°C bis zu einer OD₆₀₅ = 0,5 kultiviert wurde. Daraufhin wurde die Expression des jeweiligen plasmidcodierten Proteins mit IPTG induziert. Da nicht sicher war, ob die Tryptophanmutanten nur im YidC-Depletionsstamm JS7131 bei 37°C instabil waren wurde die Expression nach Induktion bei 20°C und bei 37°C fortgeführt. Nach 1, 2, 3, 4 und 16 h wurden Proben entnommen und mit TCA gefällt. Anschließend wurden die Proben mit Aceton gewaschen und für 5 min bei 70 °C in SDS-Probenpuffer erhitzt. Nach SDS-PAGE, Western blot und Immundetektion mit dem His-Antikörper konnte die Mutante YidC_{W454} auf einem Röntgenfilm visualisiert werden. Die Expressions-Tests sind in Abb. 24 zu sehen.

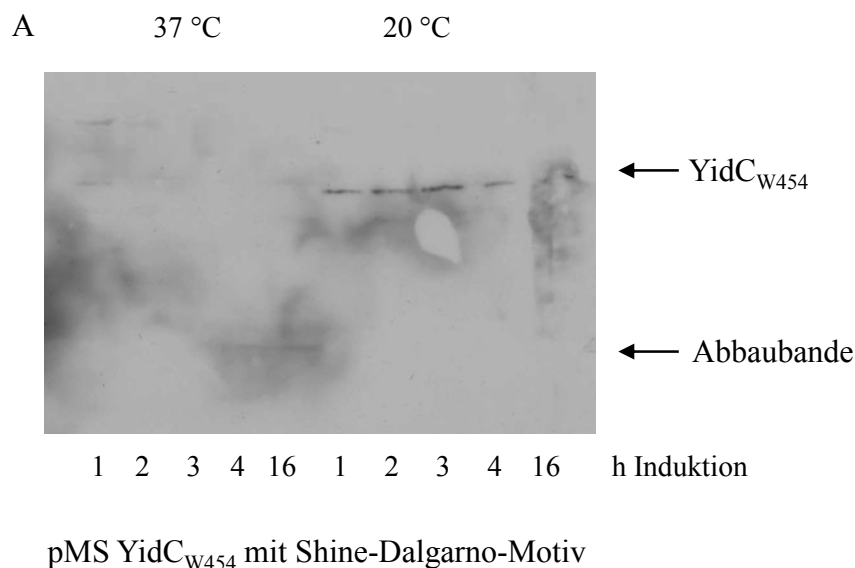
Die Tryptophanmutante YidC_{W454} in pMS119EH wurde durch Induktion bei 37°C nicht überexprimiert (Abb. 24 A). Es konnte weder nach 1, 2, 3 und 4 h, noch nach Induktion für 16 h YidC_{W454} detektiert werden. Bei 20°C fand in pMS119EH zwischen 1 - 4 h Induktion eine sehr schwache Expression statt. Nach 16 h Induktion war das Protein YidC_{W454} nicht mehr detektierbar und somit höchstwahrscheinlich abgebaut.

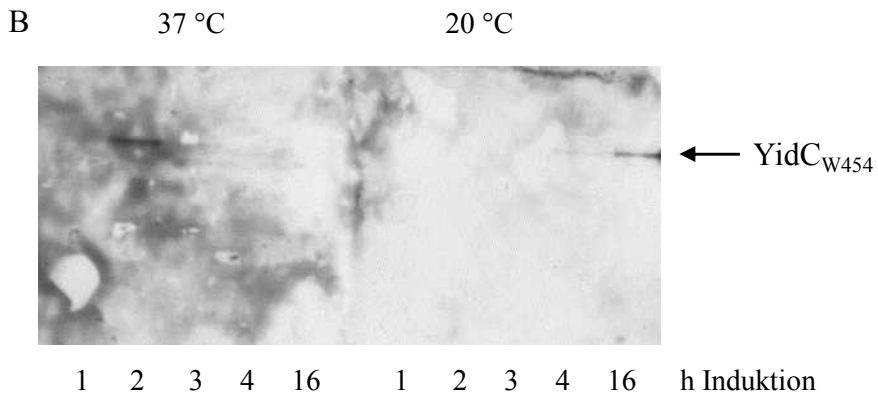
In pET-16b wurde bei 37°C lediglich nach 2 h Induktion eine schwache Proteinbande detektiert (Abb. 24 B). Nach Induktionszeiten länger als 2 h konnte kein Protein detektiert werden, da dieses vermutlich wieder abgebaut wurde. Bei 20°C fand während Induktionszeiten von 1 - 4 h keine Überexpression statt. Nach 16 h Induktion konnte eine schwache Proteinbande detektiert werden.

3. Ergebnisse

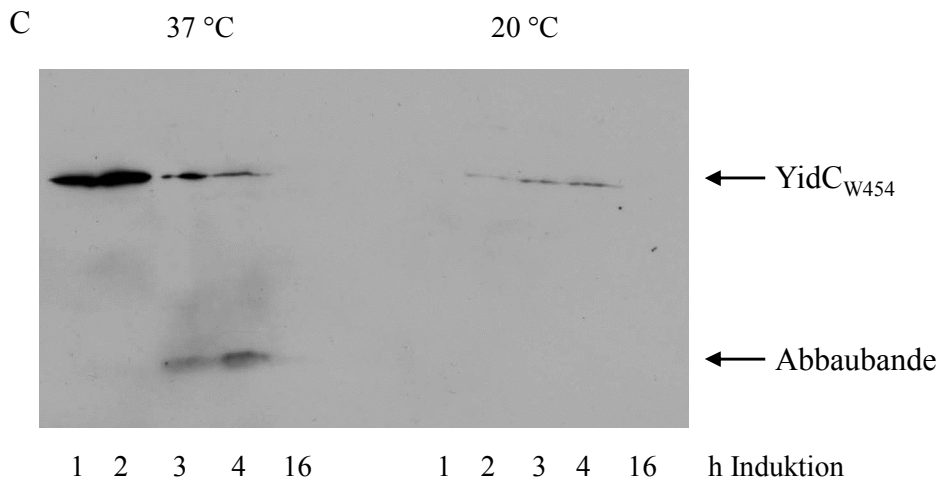
Die bei 37°C in pGZ119EH ohne ersichtliches Shine-Dalgarno-Motiv überexprimierte Mutante wies nach 1 und nach 2 h Induktion YidC_{W454} auf (Abb. 24 C). Nach Induktionszeiten von 3 und 4 h wurde das Protein abgebaut, was anhand der sinkenden Menge an Protein und dem Auftreten einer Abbaubande zu erkennen war. Nach Induktion für 16 h konnte kein Protein mehr detektiert werden. Vermutlich kam es zu einem vollständigen Abbau. Bei 20°C war nach 1 h die Menge an überexprimiertem Protein wahrscheinlich zu gering um detektiert zu werden. Nach 2, 3 und 4 h Induktion wurden sehr geringe Mengen der Mutante exprimiert und nach Induktion für 16 h war die Mutante vermutlich abgebaut. Diese nach 2, 3 und 4 h Induktion exprimierte Menge an Protein war jedoch geringer als die nach 1 und 2 h Induktion bei 37°C.

Durch Überexpression der Mutante in pGZ119EH mit Shine-Dalgarno-Motiv (Abb. 24 D) bei 37°C wurden nach 1 - 4 h Induktion deutliche Mengen an YidC_{W454} exprimiert, jedoch trat zusätzlich eine starke Abbaubande auf. Nach 16 h Induktion war das Protein größtenteils abgebaut. Durch Überexpression bei 20°C konnte sowohl nach 1 - 4 h Induktion, als auch nach Induktion für 16 h eine im Vergleich zu der Expression in den anderen Plasmiden große Menge an YidC_{W454} detektiert werden.

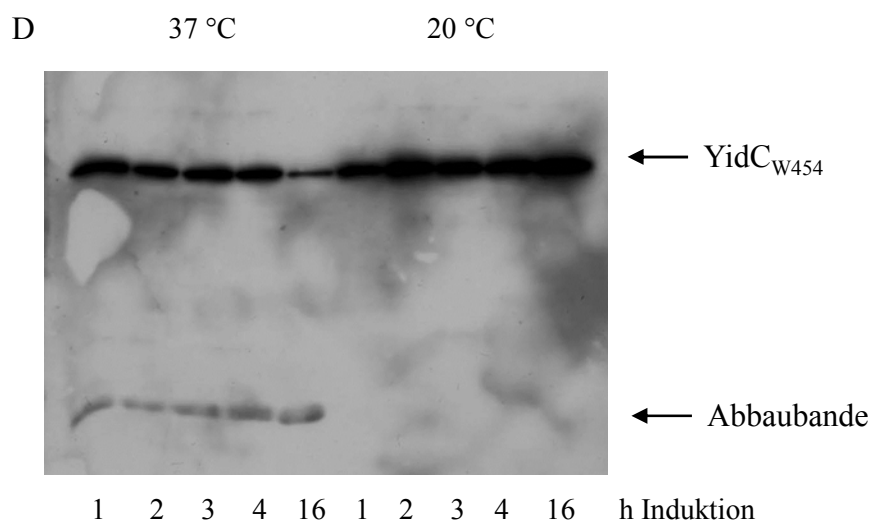




pET YidC_{W454} mit Shine-Dalgarno-Motiv



pGZ YidC_{W454} ohne ersichtliches Shine-Dalgarno-Motiv



pGZ YidC_{W454} mit Shine-Dalgarno-Motiv

Abb. 24: Überexpression der YidC-Tryptophanmutante YidC_{W454} bei 37°C und bei 20°C in verschiedenen Plasmiden. Die Mutante YidC_{W454} in den Plasmiden pMS119EH (A), pET-16b (B) und pGZ119EH (D) jeweils mit Shine-Dalgarno-Motiv sowie in dem Plasmid pGZ119EH ohne ersichtliches Shine-Dalgarno-Motiv (C) wurde jeweils in den *E. coli* Stamm C43 transformiert. Die Zellen wurden bei 37°C im Wasserbadschüttler bis zu einer OD₆₀₅ = 0,5 inkubiert. Daraufhin wurde die Proteinexpression mit 1 mM IPTG induziert. Die Induktion wurde bei 37°C und 20°C fortgeführt. Nach Induktionszeiten von 1, 2, 3, 4 und 16 h wurde jeweils eine Probe entnommen und durch SDS-PAGE, Western blot sowie Immundetektion mit dem His-Antikörper analysiert und auf einem Röntgenfilm visualisiert. Durch Expression bei 37°C in den Plasmiden pMS119EH, und pGZ119EH kam es teilweise zum Abbau der Tryptophanmutante. Die Abbaubande ist jeweils markiert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Überexpression von YidC_{W454} im Plasmid pGZ119EH mit Shine-Dalgarno-Motiv nach Induktion für 2 - 16 h bei 20°C am effizientesten war. Darum wurden alle YidC-Tryptophanmutanten für 16 h bei 20°C im *E. coli* Stamm C43 überexprimiert.

3.5 Reinigung der YidC-Tryptophanmutanten und des YidC-Wildtyps

Die in den Expressionsvektor pGZ119EH klonierten YidC-Tryptophanmutanten YidC_{2W}, YidC_{W354}, YidC_{W454} und YidC_{W508} wurden jeweils in den *E. coli* Stamm C43 transformiert. Dieser wurde in 6 l LB-Medium, das mit Chloramphenicol versetzt war bis zu einer OD₆₀₅ = 0,5 kultiviert. Daraufhin wurden die Tryptophanmutanten durch Zugabe von 1 mM IPTG für 16 h bei 20°C überexprimiert.

Der YidC-Wildtyp wurde in den Expressionsvektor pMS119EH kloniert und in den Stamm C43 transformiert. Dieser wurde in 3 l LB-Medium, das mit Ampicillin versetzt war, bis zu einer OD₆₀₅ = 0,5 kultiviert. Dann wurde der YidC-Wildtyp durch Zugabe von 1 mM IPTG für 3 h bei 37°C überexprimiert.

Anschließend wurden die Zellen, welche die jeweilige YidC-Tryptophanmutante bzw. den YidC-Wildtyp überexprimierten, jeweils durch Zentrifugation geerntet und mittels French Pressure Cell aufgeschlossen. Die jeweils mit einem His-Tag fusionierten YidC-Proteine konnten dann durch das Detergenz n-Dodecyl-β-D-Maltosid (DDM; 1% (w/v)) aus der Cytoplasmamembran gelöst und durch Zentrifugation für 20 min bei 240000 g von Zellwandbestandteilen getrennt werden. Die Proteine wurden daraufhin mittels Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt. Dafür wurde die Proteinlösung für 1 h mit dem

3. Ergebnisse

Säulenmaterial Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose inkubiert. Der His-Tag wurde dabei an die Nickel-Ionen gebunden. Ungebundene Proteine wurden verworfen. Die an die Säule angehefteten Proteine wurden mit 25 ml Puffer, der mit wenig Imidazol (60 mM) versetzt wurde, gewaschen und anschließend mit Puffer, der mit 280 mM Imidazol versetzt wurde, eluiert. Der erste Elutionsschritt (E1) erfolgte mit 1 ml Elutionspuffer, der zweite und dritte (E2 und E3) mit jeweils 2 ml und der vierte Elutionsschritt (E4) mit 1,5 ml Elutionspuffer. Ein Teil der eluierten Proteine wurde in SDS-Probenpuffer aufgenommen, für 5 min bei 70°C erhitzt und nach SDS-PAGE mittels Coomassie Blau-Färbung sichtbar gemacht. Die gefärbten SDS-Gele sind in Abb. 25 zu sehen.

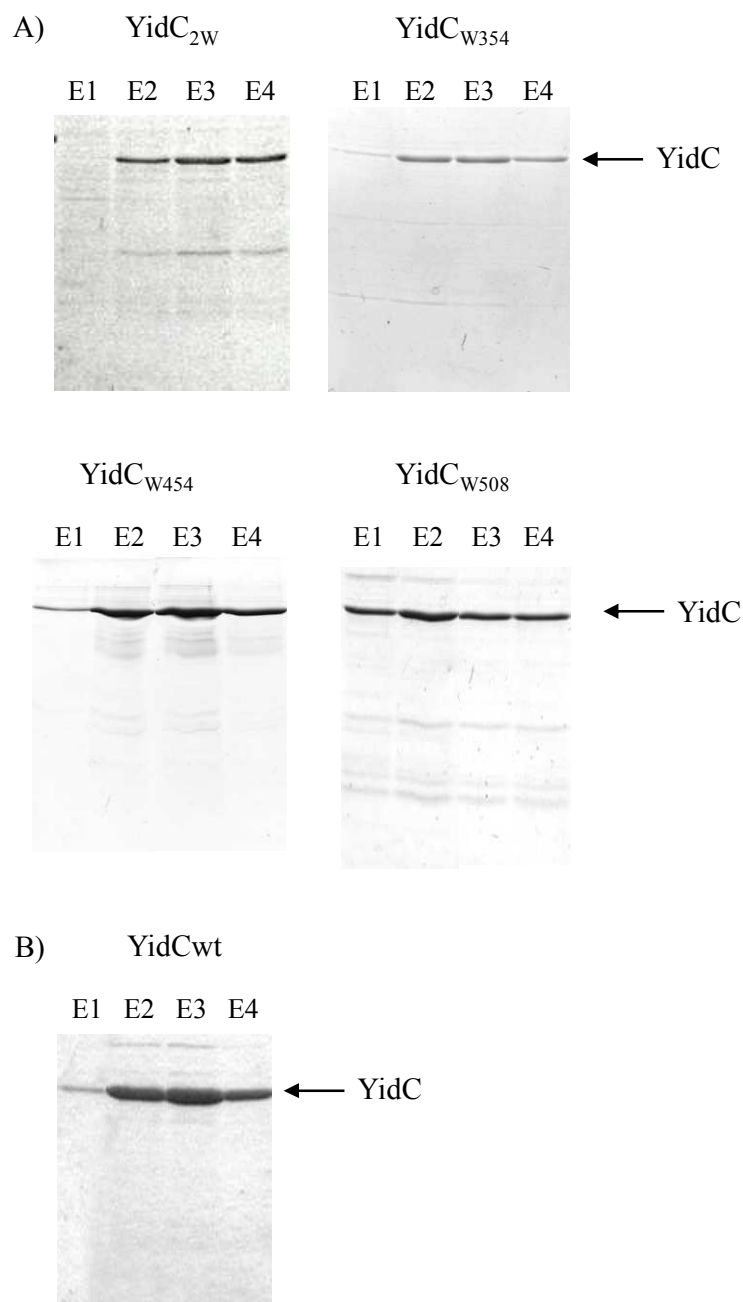


Abb. 25: Gereinigte, Detergenz-solubilisierete YidC-Tryptophanmutanten sowie der YidC-Wildtyp. Die jeweilige Mutante YidC_{2W}, YidC_{W354}, YidC_{W454} und YidC_{W508} (**A**) wurde nach Überexpression für 16 h bei 20°C aus 6 l Kultur, der YidC-Wildtyp (**B**) nach 3 h Überexpression bei 37°C aus 3 l Kultur des *E. coli* Stammes C43 gereinigt. Alle YidC-Konstrukte wurden durch Aufschluss der Zellen mittels French Press und Solubilisieren der Cytoplasmamembran isoliert. Die Reinigung wurde mittels Nickel-Affinitätschromatographie durchgeführt. Die Elution erfolgte in 4 Schritten durch Puffer, der mit 280 mM Imidazol versetzt wurde: E1 = 1 ml, E2 = 2 ml, E3 = 2 ml und E4 = 1,5 ml Elutionspuffer. Jeder Elutionsfraktion wurden 8 µl des eluierten Proteins entnommen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt sowie durch Coomassie Blau-Färbung sichtbar gemacht.

Die größten Mengen an Protein befanden sich jeweils in Elutionsfraktion 2 und 3. Eine Konzentrationsbestimmung wurde nach Lowry (Lowry *et al.*, 1951) durchgeführt und ergab, dass pro Mutante ca. 120 - 140 µg/ml Protein enthalten waren. Die Konzentration des gereinigten YidC-Wildtyps betrug ca. 400 µg/ml.

3.6 Membran-Topologie der rekonstituierten YidC-Tryptophanmutanten

Die Membran-Topologie der in DOPC/DOPG-Liposomen rekonstituierten YidC-Tryptophanmutanten YidC_{2W}, YidC_{W354}, YidC_{W454} und YidC_{W508} wurde durch Trypsinverdau untersucht. Um die jeweilige YidC-Tryptophanmutante in Liposomen zu rekonstituieren, wurden DOPC/DOPG-Liposomen (1:1) zuerst für 3 Tage bei 4°C in n-Dodecyl-β-D-Maltosid (DDM)-haltigem Puffer inkubiert. Anschließend wurden diese Detergenz-behandelten Liposomen mit der jeweiligen in DDM-haltigem Puffer gereinigten YidC-Tryptophanmutante für 2 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Danach wurden Bio-Beads SM-2 zugegeben, um das Detergenz über 3 h bei 4°C zu entziehen, sodass die jeweilige Mutante in die Liposomen rekonstituiert wurde. Nach Sedimentation durch Zentrifugation für 10 min bei 120000 g wurden diese sogenannten Proteoliposomen in Puffer (20 mM Tris (HCl pH 7,0), 300 mM NaCl) aufgenommen. Je ein Ansatz in DOPC/DOPG-Liposomen rekonstituierter YidC-Tryptophanmutanten wurde für 20 min mit Trypsin inkubiert. Wenn die jeweilige YidC Mutante mit der P1-Domäne im Inneren der Liposomen rekonstituiert wurde, entstand durch den Verdau mit Trypsin ein geschütztes Fragment, das ein Molekulargewicht von 42 kDa hatte. Dieses Fragment bestand aus der ersten Transmembrandomäne, der P1-Domäne und der zweiten Transmembrandomäne von YidC. Die P1-Domäne dieses Fragments konnte mittels P1-Antikörper detektiert werden. Wurde die Mutanten in der invertierten Richtung

3. Ergebnisse

rekonstituiert, konnte kein 42 kDa-Fragment detektiert werden. Ein weiterer Ansatz diente als Vergleich und wurde nicht mit Trypsin inkubiert. Dieser Ansatz enthielt das gesamte rekonstituierte Protein. Als Negativkontrolle wurde gereinigtes, nicht rekonstituiertes Protein mit Trypsin verdaut. Alle Ansätze wurden anschließend mit TCA gefällt, mit Aceton gewaschen und für 5 min bei 70°C in SDS-Probenpuffer erhitzt. Die Proben wurden dann nach SDS-PAGE, Western blot und Immundetektion mit dem P1-Antikörper auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht. Die Ergebnisse der Verdau-Ansätze der in DOPC/DOPG-Liposomen rekonstituierten YidC-Tryptophanmutanten mit Trypsin sind in Abb. 26 gezeigt.

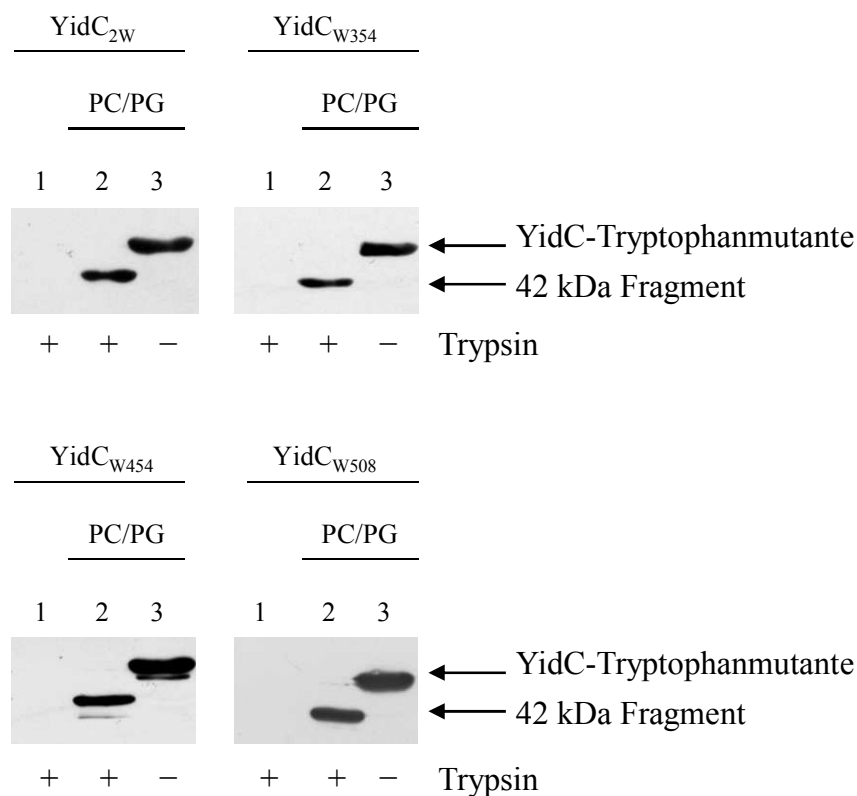


Abb. 26: Topologie der rekonstituierten YidC-Tryptophanmutanten. Die in DOPC/DOPG-Liposomen (PC/PG) rekonstituierten Mutanten YidC_{2W}, YidC_{W354}, YidC_{W454} und YidC_{W508} wurden für 20 min mit Trypsin verdaut (Spuren 2) und nach SDS-PAGE, Western blot und Immundetektion mit dem P1-Antikörper analysiert sowie auf einem Röntgenfilm visualisiert. Jeweils ein Ansatz, der das gereinigte, nicht rekonstituierte Protein enthielt wurde ebenso mit Trypsin behandelt und diente als Negativkontrolle (Spuren 1). Ein weiterer Ansatz mit der jeweiligen in DOPC/DOPG-Liposomen rekonstituierten Mutante wurde ohne Zugabe von Trypsin mitgeführt und enthielt das gesamte rekonstituierte Protein (Spuren 3).

Bei allen Mutanten konnte ein 42 kDa-Fragment detektiert werden (Spuren 2). Verglichen mit der Gesamtmenge an rekonstituiertem Protein (Spuren 3) war demzufolge ein Großteil jeder Mutante so eingebaut, dass sich die P1-Domäne im Lumen der Liposomen befand. Die Quantifizierung ergab, dass mindestens 65% des YidC_{2W}, 61% des YidC_{W354}, 66% des YidC_{W454} und 65% des YidC_{W508} in dieser Orientierung vorlagen. Als Negativkontrolle wurde die jeweilige gereinigte, nicht rekonstituierte Tryptophanmutante mit Trypsin verdaut (Spuren 1). Durch diesen Verdau entstand kein 42 kDa-Fragment.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die YidC-Tryptophanmutanten größtenteils in der Orientierung mit der P1-Domäne innerhalb der DOPC/DOPG-Liposomen rekonstituiert waren.

3.7 Fluoreszenzspektroskopie

Der YidC-Wildtyp enthält 11 Tryptophan-Reste, die alle auf der dem Periplasma zugewandten Seite von YidC liegen (Sääf *et al.*, 1998; Kiefer & Kuhn, 2007). Die in dieser Arbeit verwendeten Tryptophanmutanten enthielten jeweils einen C-terminalen His₁₀-Tag und jeweils nur einen Tryptophan-Rest an Position 354, 454 oder 508 bzw. zwei Tryptophan-Reste an Position 332/334 und werden als YidC_{W354}, YidC_{W454}, YidC_{W508} bzw. YidC_{2W} bezeichnet. Die Tryptophan-Reste dienen als intrinsische Fluorophore und befinden sich laut bisher bekannter und angenommener Struktur von YidC in der P1-Domäne (Mutante YidC_{2W}, YidC_{W354}), im zweiten periplasmatischen Bereich P2 (Mutante YidC_{W454}) und nahe des dritten periplasmatischen Bereichs P3 (Mutante YidC_{W508}). Eine Übersicht ist in Abb. 27 dargestellt. Die übrigen Tryptophan-Reste wurden mittels ortsgerechter Mutagenese jeweils durch Phenylalanin ersetzt. Phenylalanin gehört ebenso wie Tryptophan zu den aromatischen Aminosäuren, besitzt jedoch eine wesentlich geringere Fluoreszenz (Kap. 1.9.4).

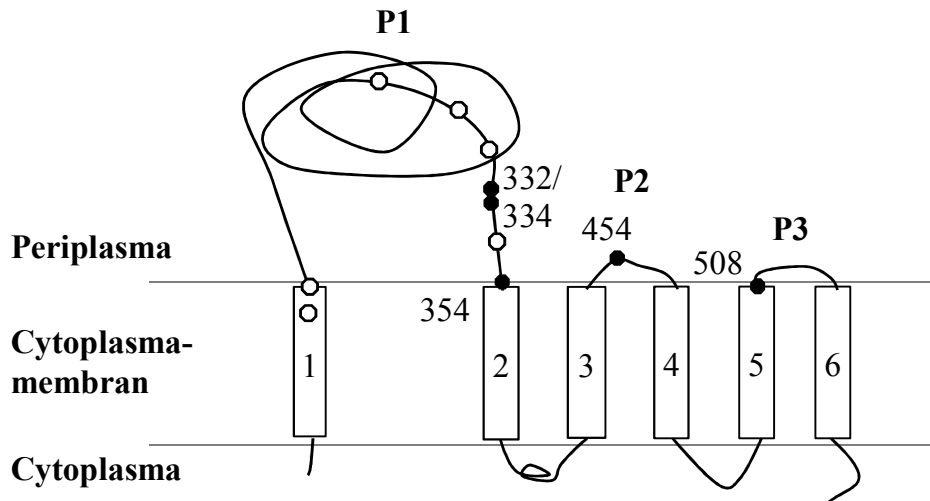


Abb. 27: Positionen der Tryptophan-Reste innerhalb der Membran-Topologie von YidC. Die Rechtecke stellen die 6 Transmembrandomänen dar, die auf der periplasmatischen Seite durch die Bereiche P1, P2 und P3 verbunden sind. Die 11 im YidC-Wildtyp vorkommenden Tryptophan-Reste sind anhand von Punkten eingezeichnet, wobei die unter diesen Resten enthaltenen Tryptophane der YidC-Tryptophanmutanten durch ausgefüllte Punkte dargestellt sind und deren jeweilige Position benannt ist (nach Kiefer & Kuhn, 2007).

In dieser Arbeit wurden „steady-state“ und zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen eingesetzt um die Bindung der YidC-abhängigen, Tryptophan-freien Mutante von Pf3 coat (genannt Pf3W0 coat) an die YidC-Tryptophanmutanten, welche in Liposomen rekonstituiert waren, zu untersuchen.

Die Messungen der „steady-state“ Fluoreszenz und der zeitaufgelösten Fluoreszenz wurden beide mit denselben Proben nacheinander aufgenommen. Um YidC in Liposomen zu rekonstituieren, wurde die jeweilige mit n-Dodecyl- β -D-Maltosid (DDM)-haltigem Puffer gereinigte YidC-Tryptophanmutante bzw. der YidC-Wildtyp für 2 h bei 4°C mit DDM-behandelten DOPC/DOPG-Liposomen (1:1) auf dem Drehrad inkubiert. Danach wurden Bio-Beads SM-2 zugegeben um das Detergenz über 3 h bei 4°C zu entziehen, sodass das jeweilige YidC-Konstrukt in die Liposomen rekonstituiert wurde. Nach Sedimentation durch Zentrifugation für 10 min bei 120000 g wurden die sogenannten Proteoliposomen in Puffer (20 mM Tris (HCl pH 7,0), 300 mM NaCl, 5% Isopropanol) aufgenommen und für die im Folgenden beschriebenen Fluoreszenzmessungen verwendet.

3.7.1 „Steady-state“ Fluoreszenzspektroskopie

Durch „steady-state“ Fluoreszenzmessungen wurden die jeweiligen Emissionsspektren der YidC-Konstrukte bei 25°C ermittelt. Anhand dieser Daten konnten Aussagen über die Umgebung der in den YidC-Mutanten enthaltenen Tryptophan-Reste vor und nach Titration mit Pf3W0 coat getroffen werden. Die Anregung erfolgte bei 295 nm. Alle Emissionsspektren wurden daraufhin zwischen 305 und 450 nm aufgenommen. Die Aufnahmegeschwindigkeit betrug 1 nm/s und die Spaltbreite für die Anregung wurde auf 2 nm sowie die Spaltbreite für die Emission auf 3 nm eingestellt. Das jeweilige Fluoreszenzmaximum λ_{\max} sowie die Breite der Spektren auf halber Höhe der maximalen Fluoreszenzintensität (FWHM, full width at half maximum) wurden mit Hilfe der logarithmischen-Normalverteilung (Gleichung 4) analysiert.

3.7.1.1 Bindung von Pf3W0 coat Protein an rekonstituierte YidC-Tryptophanmutanten

Die Membraninsertion von Pf3 coat ist YidC-abhängig. D. h. Pf3 coat Protein bindet an YidC und wird daraufhin in die Cytoplasmamembran von *E. coli* inseriert (Chen *et al.*, 2002). Der Pf3 coat Wildtyp enthält einen Tryptophan-Rest, der mittels ortsgerichteter Mutagenese durch Phenylalanin ersetzt wurde. Die somit kreierte Tryptophan-freie Mutante Pf3W0 coat sollte keine Fluoreszenz aufweisen und wurde verwendet um das Bindungsverhalten von Pf3 coat an YidC zu untersuchen.

In DOPC/DOPG-Liposomen rekonstituierte YidC-Tryptophanmutanten (YidC_{2W}, YidC_{W354}, YidC_{W454}, YidC_{W508}) wurden mit steigenden Mengen an Pf3W0 coat Protein (0 - 2,1 μ M) titriert, wobei nach jeder Zugabe ein fünfminütiges Äquilibrieren mit anschließender Aufnahme des Emissionsspektrums erfolgte.

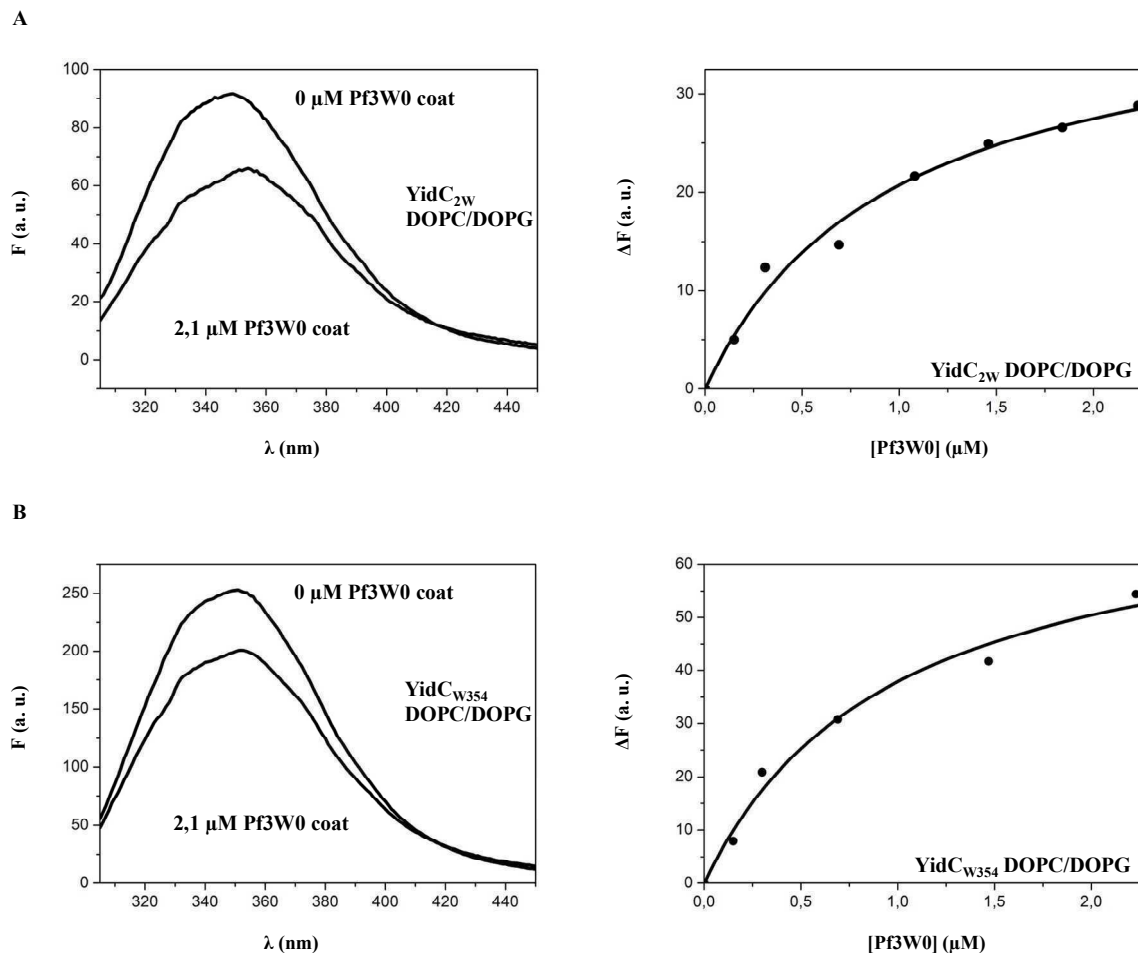
Die Fluoreszenzspektren der in DOPC/DOPG-Liposomen rekonstituierten YidC-Tryptophanmutanten vor und nach Titration mit Pf3W0 coat sind in Abb. 28 dargestellt. Das jeweilige Fluoreszenzmaximum und die jeweilige Breite des Spektrums auf halber Höhe der maximalen Fluoreszenzintensität (FWHM) sowie deren Standardabweichung sind in Tabelle 7 aufgelistet.

3.7.1.2 Fluoreszenzspektren der rekonstituierten YidC-Tryptophanmutanten vor Titration mit Pf3W0 coat Protein

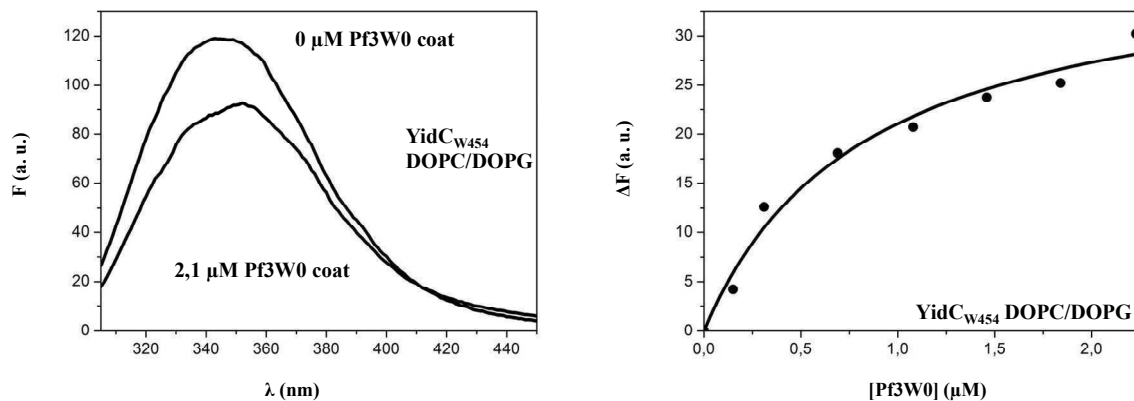
Die Einzel-Tryptophanmutanten (YidC_{W354}, YidC_{W454}, YidC_{W508}) wiesen vor Titration (0 μM Pf3W0 coat) jeweils ein Fluoreszenzmaximum λ_{max} , das zwischen 343 - 347 nm lag auf und eine Breite (FWHM) zwischen 66 und 69 nm. Die Doppel-Tryptophanmutante (YidC_{2W}) zeigte ein Fluoreszenzmaximum bei 345 nm und eine Breite von 67 nm. Diese Werte entsprechen denen der Einzel-Tryptophanmutanten.

3.7.1.3 Fluoreszenzspektren der rekonstituierten YidC-Tryptophanmutanten nach Titration mit Pf3W0 coat Protein

Anhand von Abb. 28 und Tabelle 7 können die Fluoreszenzspektren der YidC-Tryptophanmutanten vor und nach Titration mit Pf3W0 coat verglichen werden.



C



D

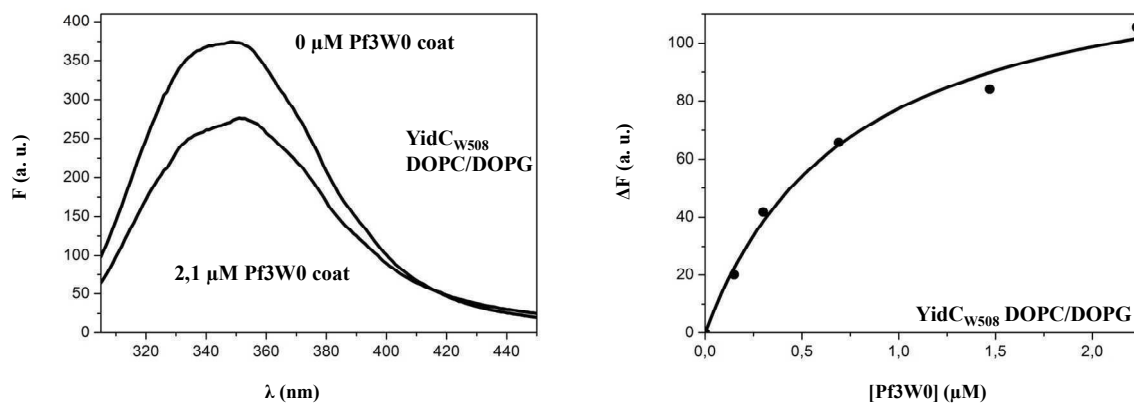


Abb. 28: Emissionsspektren der rekonstituierten YidC-Tryptophanmutanten vor und nach Titration mit Pf3W0 coat sowie die zugehörige Bindungskurve. Dargestellt ist das jeweilige Emissionsspektrum der in DOPC/DOPG-Liposomen rekonstituierten Tryptophanmutanten YidC_W (A), YidC_{W354} (B), YidC_{W454} (C), YidC_{W508} (D) vor (0 μM Pf3W0 coat) und nach Titration mit Pf3W0 coat (2,1 μM). Die jeweilige Bindungskurve wurde anhand der Fluoreszenzintensität nach jedem Titrationsschritt bei 344 nm erstellt. Die Anregung erfolgte bei 295 nm und die Emission wurde zwischen 305 nm und 450 nm gemessen.

Bei allen Mutanten fand eine teilweise Löschung der Fluoreszenz durch Titration mit Pf3W0 coat statt, d. h. die Intensität der Fluoreszenz nahm im Laufe der Titration ab. Weiter war zu beobachten, dass eine leichte Rot-Verschiebung um 2 - 4 nm sowie eine Verbreiterung der Emissionsspektren um 3 - 5 nm auftrat.

Anhand der Fluoreszenzspektren, die nach jedem einzelnen Titrationsschritt aufgenommen wurden, konnte eine Bindungskurve unter Verwendung der jeweiligen Fluoreszenzintensität bei 344 nm erstellt werden (Abb. 28). Die entsprechende Dissoziationskonstante K_D wurde anhand der Bindungskurve mit der Gleichung 5 berechnet. Diese Werte sowie deren Standardabweichung des Mittelwerts sind ebenfalls in Tabelle 7 ersichtlich. Die K_D -Werte

lagen zwischen 0,6 - 1,0 μM . Das bedeutet, dass bei dieser Konzentration an Pf3W0 coat die Hälfte der Bindungsstellen der jeweiligen YidC-Tryptophanmutante bezüglich Pf3W0 coat besetzt war. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Pf3W0 coat Protein an alle YidC-Tryptophanmutanten nahezu gleichstark gebunden wurde.

Tabelle 7: Daten der „steady-state“ Fluoreszenzspektroskopie der rekonstituierten YidC-Tryptophanmutanten.

Probe	λ_{max} (nm)	FWHM (nm)	K_{D} (μM)
YidC _{2W} : DOPC/DOPG	345,27 \pm 0,10	67,32 \pm 0,17	–
YidC _{2W} : DOPC/DOPG + Pf3W0	349,06 \pm 0,29	72,23 \pm 0,20	0,83 \pm 0,15
YidC _{W354} : DOPC/DOPG	346,67 \pm 0,03	68,84 \pm 0,43	–
YidC _{W354} : DOPC/DOPG + Pf3W0	348,10 \pm 0,75	73,1 \pm 0,72	0,67 \pm 0,32
YidC _{W454} : DOPC/DOPG	343,86 \pm 0,43	66,13 \pm 0,26	–
YidC _{W454} : DOPC/DOPG + Pf3W0	346,3 \pm 1,3	69,31 \pm 0,31	0,80 \pm 0,10
YidC _{W508} : DOPC/DOPG	344,30 \pm 0,18	68,16 \pm 0,78	–
YidC _{W508} : DOPC/DOPG + Pf3W0	347,43 \pm 0,95	72,65 \pm 0,04	0,87 \pm 0,11

Das Fluoreszenzmaximum (λ_{max}) und die Breite der Emissionsspektren auf halber Höhe der maximalen Fluoreszenzintensität (FWHM) der jeweiligen in DOPC/DOPG-Liposomen rekonstituierten YidC-Tryptophanmutante (YidC_{2W}, YidC_{W354}, YidC_{W454}, YidC_{W508}) vor Titration mit Pf3W0 coat und nach Titration (+ Pf3W0) sowie die jeweilige Dissoziationskonstante (K_{D}) und die Standardabweichung von den jeweiligen Mittelwerten sind aufgelistet. Die Anregung erfolgte bei 295 nm.

3.7.1.4 Spektrale Eigenschaften des Pf3W0 coat Proteins

Um zu zeigen, dass das Pf3W0 coat Protein keine signifikante Fluoreszenz besitzt, die die Fluoreszenzmessungen beeinflussen könnte, wurde das Emissionsspektrum von 2,1 μM Pf3W0 coat in Puffer (20 mM Tris (HCl pH 7,0), 300 mM NaCl, 5% Isopropanol) aufgenommen. Die Anregung erfolgte bei 295 nm. Abb. 29 zeigt dieses Spektrum im Vergleich mit den Emissionsspektren der in DOPC/DOPG-Liposomen rekonstituierten Tryptophanmutante YidC_{2W} vor und nach Titration mit Pf3W0 coat.

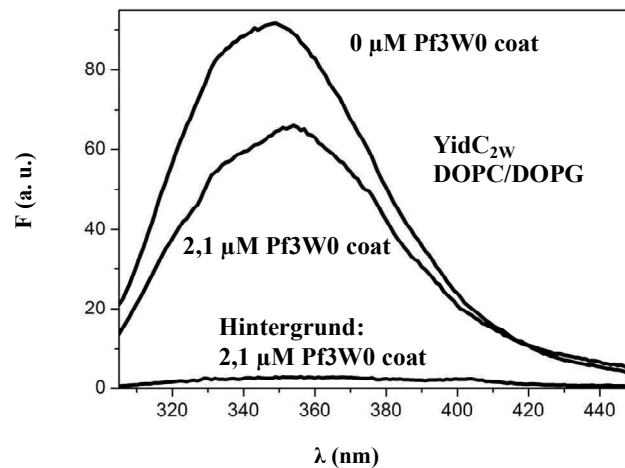


Abb. 29: Einfluss der Fluoreszenz des Pf3W0 coat Proteins auf die Emissionsspektren der rekonstituierten YidC-Tryptophanmutante YidC_{2W}. Die Emissionsspektren der in DOPC/DOPG-Liposomen rekonstituierten Tryptophanmutante YidC_{2W} vor (0 μM Pf3W0 coat) und nach Titration (2,1 μM Pf3W0 coat) mit Pf3W0 coat sowie das Emissionsspektrum von 2,1 μM Pf3W0 coat (Hintergrund) sind im Vergleich dargestellt. Die Anregung erfolgte bei 295 nm und die Emission wurde zwischen 305 nm und 450 nm gemessen.

Die Fluoreszenz von Pf3W0 coat (Hintergrund) wies kein spezifisches Fluoreszenzmaximum auf und betrug ca. 4% der Fluoreszenzintensität der rekonstituierten Tryptophanmutante YidC_{2W}.

3.7.1.5 Fluoreszenzspektren von rekonstituiertem YidC_{2W}, YidC-Wildtyp sowie der YidC P1-Domäne

Um zu zeigen, welchen Einfluss die Umgebung von Tryptophan auf dessen Emission hat wurden die Emissionsspektren von YidC_{2W} und dem YidC-Wildtyp, beide in DOPC/DOPG-Liposomen rekonstituiert, sowie das Spektrum der gereinigten YidC P1-Domäne (Aminosäure 56 - 329), welche drei natürlich in YidC vorkommende Tryptophan-Reste enthielt, bei Anregung von 295 nm miteinander verglichen. Alle Konstrukte mit Ausnahme der P1-Domäne wurden im gleichen Puffer (20 mM Tris (HCl pH 7,0), 300 mM NaCl, 5% Isopropanol) aufgenommen. Die P1-Domäne wurde in PBS (phosphate buffered saline; pH 6,0) aufgenommen. Die Fluoreszenzspektren sind in Abb. 30 dargestellt.

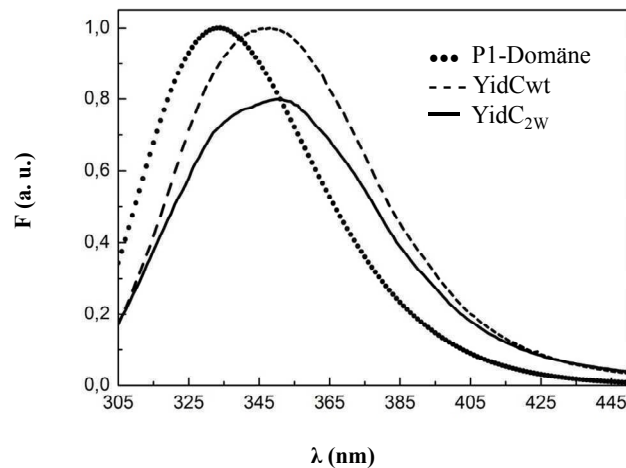


Abb. 30: Fluoreszenzspektren der rekonstituierten Tryptophanmutante YidC_{2W}, des rekonstituierten YidC-Wildtyps und der YidC P1-Domäne. Die Fluoreszenzspektren der Tryptophanmutante YidC_{2W} und des YidC-Wildtyps (YidCwt), beide in DOPC/DOPG-Liposomen rekonstituiert, sowie das Fluoreszenzspektrum der YidC P1-Domäne (Aminosäure 56 - 329) sind im Vergleich dargestellt. Alle YidC-Konstrukte befanden sich im gleichen Puffer (20 mM Tris (HCl pH 7,0), 300 mM NaCl, 5% Isopropanol), die P1 Domäne wurde in PBS (phosphate buffered saline, pH 6,0) aufgenommen. Die Anregung erfolgte bei 295 nm und die Emission wurde zwischen 305 und 450 nm aufgenommen.

Das Fluoreszenzmaximum des rekonstituierten YidC-Wildtyps lag bei 346 nm und die Breite betrug 64 nm. Das Fluoreszenzmaximum der P1-Domäne ist deutlich in den kurzwelligeren Bereich verschoben („blue shift“) und liegt bei 334 nm. Durch die Kristallisation der P1-Domäne wurde herausgefunden, dass sich deren Tryptophan-Reste innerhalb einer β -Struktur befinden (Oliver & Paetzel, 2008). Darum waren diese Tryptophan-Reste schlecht zugänglich und das Fluoreszenzmaximum vergleichsweise blau-verschoben. Das jeweilige Fluoreszenzmaximum der YidC-Tryptophanmutanten ($\lambda_{\max} \approx 345$ nm), hier am Beispiel von YidC_{2W} gezeigt, weist auf eine Lokalisation der Tryptophan-Reste an der Grenzschicht von Membran und Wasser hin (Burstein *et al.*, 1973).

3.7.1.6 Fluoreszenzspektren der Detergenz-solubilisierten YidC-Tryptophanmutanten

Die Emissionsspektren der gereinigten, Detergenz-solubilisierten YidC-Tryptophanmutanten wurden aufgenommen um diese mit den Spektren der jeweiligen in DOPC/DOPG-Liposomen

3. Ergebnisse

rekonstituierten Mutante zu vergleichen. Für die Messungen wurde die jeweilige gereinigte YidC-Tryptophanmutante in Puffer (20 mM Tris (HCl pH 7,0), 300 mM NaCl, 5% Isopropanol) mit 0,01% DDM überführt. Diese Konzentration lag über der kritischen Mizellbildungs-Konzentration (cmc, critical micelle concentration) von $\approx 0,008\%$ (w/v), sodass Detergenzmizellen gebildet wurden (Garavito *et al.*, 1986), in die sich die jeweilige YidC-Tryptophanmutante einlagern konnte. Die Emissionsspektren der gereinigten Mutanten sind in Abb. 31 dargestellt und die dazugehörigen Daten sind in Tabelle 8 aufgelistet.

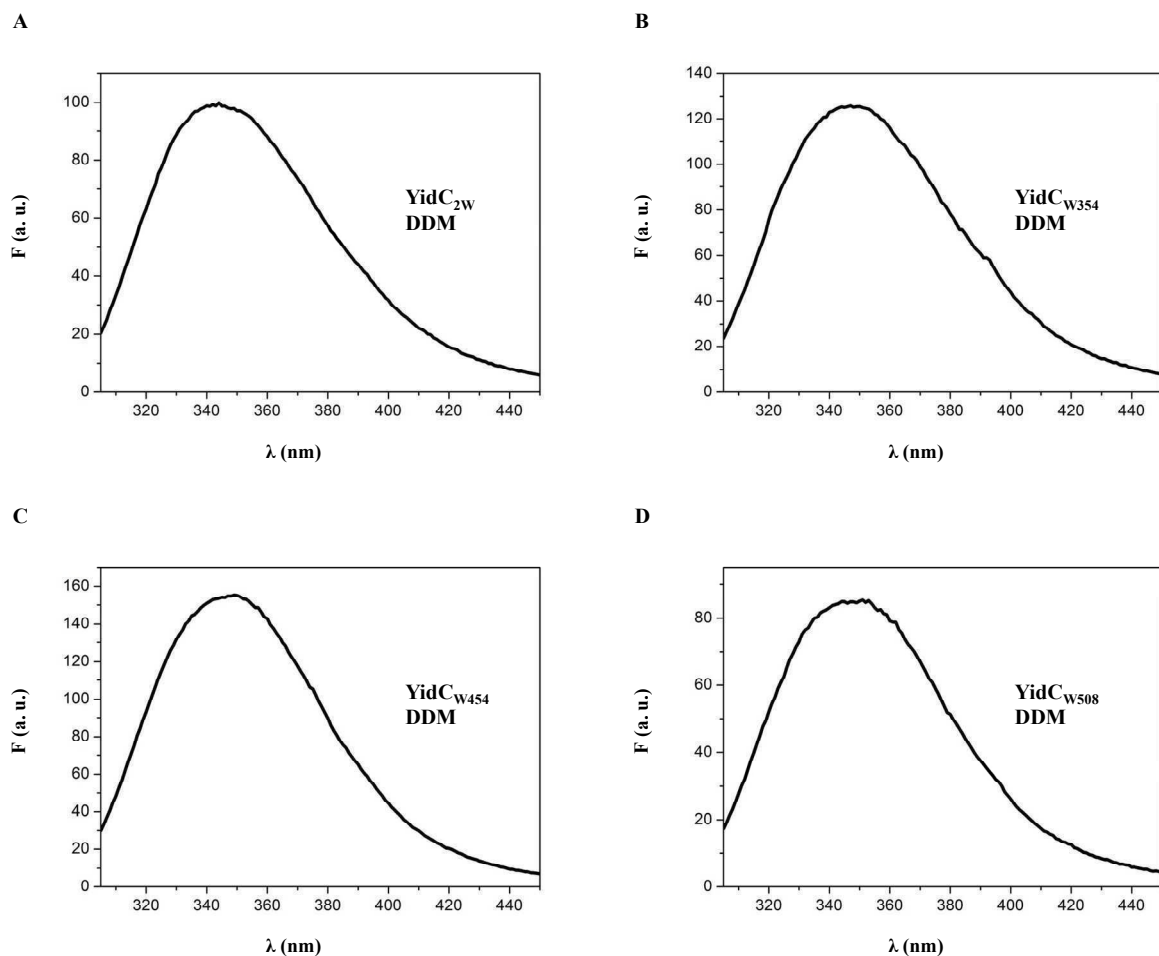


Abb. 31: Emissionsspektren der gereinigten, Detergenz-solubilisierten YidC-Tryptophanmutanten. Die Emissionsspektren der gereinigten, Detergenz-solubilisierten Mutanten YidC_{2W} (A), YidC_{W354} (B), YidC_{W454} (C), YidC_{W508} (D) in Puffer (20 mM Tris (HCl pH 7,0), 300 mM NaCl, 5% Isopropanol, 0,01% n-Dodecyl- β -D-Maltosid (w/v)) wurden zwischen 305 und 450 nm gemessen. Die Anregung erfolgte bei 295 nm.

Tabelle 8: Daten der „steady-state“ Fluoreszenzspektroskopie der gereinigten, Detergenz-solubilisierten YidC-Tryptophanmutanten.

Probe	λ_{\max} (nm)	FWHM (nm)
YidC _{2W}	345,24 ± 1,52	69,83 ± 0,43
YidC _{W354}	346,31 ± 0,22	70,18 ± 0,74
YidC _{W454}	346,15 ± 0,27	68,49 ± 0,89
YidC _{W508}	346,59 ± 0,24	70,57 ± 1,36

Das Fluoreszenzmaximum (λ_{\max}) der Emissionsspektren der jeweiligen gereinigten, Detergenz-solubilisierten Mutante YidC_{2W}, YidC_{W354}, YidC_{W454} sowie YidC_{W508} und die Breite des jeweiligen Spektrums auf halber Höhe der maximalen Fluoreszenzintensität (FWHM) sind angegeben. Die Anregung erfolgte bei 295 nm und die Werte wurden anhand der Gleichung 4 berechnet.

Die gereinigten, Detergenz-solubilisierten YidC-Tryptophanmutanten wiesen jeweils ein Fluoreszenzmaximum zwischen 344 - 347 nm auf und die Breite der Spektren (FWHM) lag zwischen 68 und 71 nm. Diese Werte entsprechen denen der in DOPC/DOPG-Liposomen rekonstituierten YidC-Tryptophanmutanten und führen zur Schlussfolgerung, dass sich die Tryptophan-Reste der rekonstituierten YidC-Tryptophanmutanten und die Tryptophan-Reste der in Detergenz vorliegenden Mutanten in ähnlicher Umgebung befanden.

Die Ergebnisse der „steady-state“ Fluoreszenzspektroskopie stehen in Einklang mit vorherigen Untersuchungen des YidC-Wildtyps (Gerken *et al.*, 2008; Winterfeld *et al.*, 2009) wonach das Fluoreszenzmaximum des YidC-Wildtyps rekonstituiert in DDM bzw. in DOPC-Liposomen bei 345 nm lag. Die Fluoreszenz der Tryptophan-Reste des rekonstituierten YidC-Wildtyps wurde durch Titration mit Pf3W0 coat ebenfalls teilweise gelöscht und die Emissionsspektren leicht verbreitert (≈ 1 nm). Die Bindungskonstante des YidC-Wildtyps rekonstituiert in DOPC-Liposomen konnte durch Titration mit Pf3W0 coat mit 0,61 μ M bestimmt werden.

3.7.2 Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie

Mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie wurde der Fluoreszenz-Intensitätszerfall der rekonstituierten YidC-Tryptophanmutanten vor und nach Bindung von Pf3W0 coat gemessen. Die Fluoreszenz-Lebensdauer (Kap. 2.17.7.3), die Anisotropie (Kap. 2.17.7.4) und die

Rotationskorrelationszeit (Kap. 2.17.7.4) konnten daraufhin berechnet werden. Die Intensitätszerfälle wurden alle bei einer Anregung von 290 nm aufgenommen.

3.7.2.1 Apparatefunktion (IRF)

Vor jeder Messung wurde die Apparatefunktion (instrument response function, IRF) gemessen um zu überprüfen in wie fern der gemessene Fluoreszenz-Intensitätszerfall durch das Detektionssystem des Spektrometers beeinflusst wurde. Für die Aufnahme der Apparateantwortfunktion wurde das Streulichtsignal einer kolloidalen Kieselgel-Lösung (LUDOX[®]) ohne Emissionsfilter bei einer Anregungswellenlänge von 290 nm gemessen. Die IRF ist ein Maß für die Güte des Detektionssystems. In diesem Fall besteht die IRF nur aus einem Puls, dessen Breite (FWHM) von der Anregungs-LED bestimmt ist. Die maximale, messbare Zerfallszeit liegt daher bei $\approx 0,7$ ns.

3.7.2.2 Einfluss von Tyrosin-Resten durch Anregung bei 290 nm

Für die zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen stand als Anregungslichtquelle eine gepulste LED (light emitting diode) zur Verfügung, die eine Anregungswellenlänge von 290 nm erzeugte. Bei dieser Wellenlänge könnten zusätzlich zu Tryptophan-Resten auch Tyrosin-Reste innerhalb von YidC angeregt werden.

Die YidC-Tryptophanmutanten enthielten, wie auch der YidC-Wildtyp, 24 Tyrosin-Reste (Kiefer & Kuhn, 2007). Um auszuschließen, dass diese Tyrosin-Reste die Fluoreszenzspektren eines einzelnen Tryptophans beeinflussen, wurde die Emission der Tryptophanmutante YidC_{W508} bei einer Anregungswellenlänge von 290 nm und 295 nm gemessen. Die Spektren wurden nach Normalisierung zu gleichen Fluoreszenzintensitäten bei 420 nm miteinander verglichen und addiert. Das dadurch erstellte Differenzspektrum stellt die Emission der Tyrosin-Reste bei Anregung von 290 nm dar (Abb. 32 oben). Als Vergleich wurde die Emission von YidC_{W508} bei 280 nm und 295 nm gemessen und die Spektren nach Normalisierung bei 420 nm addiert. Das Differenzspektrum stellt die Emission der Tyrosin-Reste bei Anregung von 280 nm dar (Abb. 32 unten).

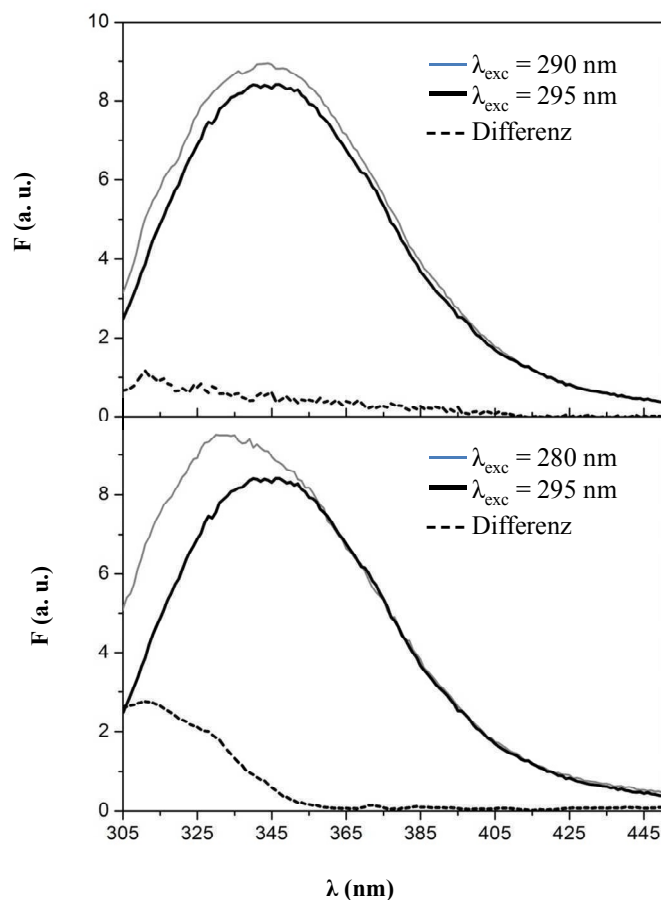


Abb. 32: Fluoreszenz der Tyrosin-Reste innerhalb der Tryptophanmutante YidC_{W508} durch Anregung bei 290 nm bzw. 280 nm. Die Fluoreszenzspektren der in DOPC/DOPG-Liposomen rekonstituierten Tryptophanmutante YidC_{W508} angeregt bei 290 nm und 295 nm (**oben**) bzw. bei 280 nm und 295 nm (**unten**) mit zugehörigem Differenzspektrum, welches den Einfluss der 24 Tyrosin-Reste von YidC auf die Fluoreszenz durch Anregung bei 290 nm bzw. bei 280 nm widerspiegelt sind dargestellt. Die Emission wurde jeweils zwischen 305 und 450 nm gemessen und die Spektren wurden bei 420 nm normalisiert.

Durch Anregung bei 290 nm konnte kein eindeutiges Signal bezüglich der Tyrosin-Fluoreszenz detektiert werden (Abb. 32 oben). Erst bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm (Abb. 32 unten) wurde ein eindeutiges Tyrosin-Spektrum detektiert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Fluoreszenz der 24 Tyrosin-Reste durch Anregung bei 280 nm die Emissionsspektren eines einzelnen Tryptophan-Restes beeinflussen. Bei einer Anregung von 290 nm ist die Fluoreszenz der Tyrosin-Reste im Vergleich zur Fluoreszenz des einzelnen Tryptophan-Restes jedoch zu gering, um Einfluss auf die Emissionsspektren zu nehmen. Da alle folgenden Fluoreszenzmessungen mit Anregung bei 290 nm durchgeführt wurden, hatten die 24 Tyrosin-Reste keinen Einfluss auf die Messungen.

3.7.2.3 Fluoreszenz-Intensitätszerfall der rekonstituierten YidC-Tryptophanmutanten vor und nach Bindung von Pf3W0 coat Protein

Die Messungen des Fluoreszenz-Intensitätszerfalls der in DOPC/DOPG-Liposomen rekonstituierten YidC-Tryptophanmutanten wurden vor und nach Bindung von Pf3W0 coat Protein durchgeführt. Zusätzlich wurde der Intensitätszerfall der gereinigten YidC P1-Domäne in PBS (pH 6,0) gemessen. Die Anregung erfolgte bei 290 nm unter „magic angle“-Einstellungen (Kap. 2.17.4). Pro Mutante wurde eine Messung ohne Pf3W0 coat (vor Titration) und mit gebundenem Pf3W0 coat (nach Titration) durchgeführt. Die Fluoreszenz-Lebensdauern wurden anhand der Gleichung (8) berechnet. Der gemessene Fluoreszenz-Intensitätszerfall der YidC-Tryptophanmutante YidC_{2W} mit angepasstem Zerfall ist beispielhaft in Abb. 33 dargestellt. Die Werte der Fluoreszenz-Lebensdauern (τ_i) sowie deren Anteil am Fluoreszenz-Intensitätszerfall (α_i) aller YidC-Tryptophanmutanten und der P1-Domäne (Aminosäure 56 - 329) sind in Tabelle 9 aufgelistet.

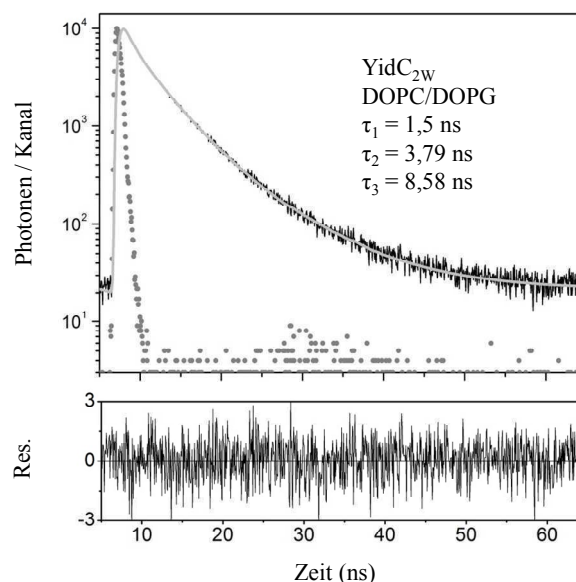


Abb. 33: Fluoreszenz-Intensitätszerfall der rekonstituierten Tryptophanmutante YidC_{2W}. Der Fluoreszenz-Intensitätszerfall der in DOPC/DOPG-Liposomen rekonstituierten Tryptophanmutante YidC_{2W} ist dargestellt. Die Fluoreszenz-Lebensdauern (τ_i) wurden anhand eines dreifach-exponentiellen Zerfalls (graue Linie) angepasst. Das Residuum (untere Graphik) zeigt die Abweichung von der Anpassung. Die Apparatefunktion ist anhand der gepunkteten Linie dargestellt und die Anregung erfolgte bei 290 nm.

3. Ergebnisse

Tabelle 9: Fluoreszenz-Lebensdauern, Anteil der Fluoreszenz-Lebensdauern und mittlere Fluoreszenz-Lebensdauer der rekonstituierten YidC-Tryptophanmutanten und der YidC P1-Domäne.

Probe	Lebensdauer (ns)			Anteil der Lebensdauer am Fluoreszenz-Intensitätszerfall			mittlere Lebensdauer (ns)
	τ_1	τ_2	τ_3	α_1	α_2	α_3	$\langle \tau \rangle$
YidC _{2W}	1,14 ± 0,01	3,74 ± 0,05	8,40 ± 0,2	0,38 ± 0,01	0,532 ± 0,004	0,091 ± 0,001	4,49 ± 0,03
YidC _{2W} +Pf3W0	1,06 ± 0,01	3,03 ± 0,02	9,60 ± 0,3	0,43 ± 0,01	0,51 ± 0,01	0,060 ± 0,002	4,42 ± 0,03
YidC _{W354}	1,10 ± 0,1	3,70 ± 0,2	9,60 ± 1,5	0,42 ± 0,04	0,50 ± 0,02	0,08 ± 0,03	4,70 ± 0,2
YidC _{W354} +Pf3W0	0,97 ± 0,02	3,50 ± 0,07	10,40 ± 0,9	0,46 ± 0,02	0,45 ± 0,02	0,06 ± 0,01	4,70 ± 0,1
YidC _{W454}	1,00 ± 0,05	3,59 ± 0,04	8,94 ± 0,18	0,41 ± 0,03	0,51 ± 0,02	0,080 ± 0,004	4,51 ± 0,01
YidC _{W454} +Pf3W0	1,00 ± 0,03	3,52 ± 0,09	10,0 ± 0,4	0,46 ± 0,01	0,480 ± 0,004	0,067 ± 0,01	4,60 ± 0,3
YidC _{W508}	1,20 ± 0,1	3,80 ± 0,2	8,98 ± 0,05	0,40 ± 0,01	0,522 ± 0,01	0,074 ± 0,007	4,50 ± 0,03
YidC _{W508} +Pf3W0	1,00 ± 0,04	3,50 ± 0,03	10,43 ± 0,01	0,47 ± 0,04	0,48 ± 0,03	0,06 ± 0,01	4,5 ± 0,1
YidC P1-Domäne	4,28	6,56	-	0,96	0,04	-	4,41

Die Fluoreszenz-Lebensdauern (τ_i) und deren Anteil am Fluoreszenz-Intensitätszerfall (α_i) sowie die mittlere Fluoreszenz-Lebensdauer ($\langle \tau \rangle$) der in DOPC/DOPG-Liposomen rekonstituierten YidC-Tryptophanmutanten YidC_{2W}, YidC_{W354}, YidC_{W454} sowie YidC_{W508} vor Titration mit Pf3W0 coat und nach Titration (+ Pf3W0) sowie die Messwerte der P1-Domäne (Aminosäure 56 - 329) sind angegeben. Die Standardabweichung von den jeweiligen Mittelwerten ist angegeben. Die mittlere Fluoreszenz-Lebensdauer wurde anhand der Gleichung $\langle \tau \rangle = \sum \alpha_i \tau_i^2 / \sum \alpha_i \tau_i$ berechnet. Die Anregung erfolgte bei 290 nm unter „magic-angle“-Bedingungen (Kap. 2.17.4).

Die drei Einzel-Tryptophanmutanten und die Doppel-Tryptophanmutante wiesen ohne gebundenes Pf3W0 coat Protein drei Fluoreszenz-Lebensdauern auf, die bei allen Mutanten nahezu identisch waren ($\tau_1 \approx 1$ ns, $\tau_2 \approx 4$ ns, $\tau_3 \approx 9$ ns). Nach Bindung von Pf3W0 coat trat keine deutliche Veränderung der Fluoreszenz-Lebensdauern τ_1 und τ_2 sowie deren Anteil am Fluoreszenz-Intensitätszerfall (α_1 und α_2) auf. Bei allen Mutanten verlängerte sich jedoch die dritte Fluoreszenz-Lebensdauer τ_3 um 1 - 2 ns und deren Anteil am Fluoreszenz-Intensitätszerfall (α_3) wurde geringer.

Die P1-Domäne von YidC, die wie zuvor erwähnt (Kap. 3.7.1.5) drei unzugängliche Tryptophan-Reste an Position 252, 264 und 308 enthält wies im Vergleich zu den exponierten

Tryptophan-Resten der YidC-Tryptophanmutanten nur zwei Fluoreszenz-Lebensdauern $\tau_1 = 4,28$ ns und $\tau_2 = 6,56$ ns auf. Der Anteil der kürzeren Fluoreszenz-Lebensdauer am Fluoreszenz-Intensitätszerfall (α_1) lag bei ≈ 1 .

3.7.2.4 Fluoreszenz-Intensitätszerfall der Detergenz-solubilisierten YidC-Tryptophanmutanten

Die Fluoreszenz-Lebensdauern der gereinigten, Detergenz-solubilisierten YidC-Tryptophanmutanten YidC_{2W}, YidC_{W354}, YidC_{W454} und YidC_{W508} wurden bestimmt und mit den Fluoreszenz-Lebensdauern der in DOPC/DOPG-Liposomen rekonstituierten YidC-Tryptophanmutanten verglichen.

Für die Messung wurde die jeweilige gereinigte, Detergenz-solubilierte YidC-Tryptophanmutante in Puffer (20 mM Tris (HCl pH 7,0), 300 mM NaCl, 5% Isopropanol), der mit 0,01% DDM versetzt wurde, aufgenommen. Die Anregung erfolgte bei 290 nm unter „magic angle“-Einstellungen (Kap. 2.17.4) und die Fluoreszenz-Intensitätszerfälle wurden mit der Gleichung (8) angepasst. Der Fluoreszenz-Intensitätszerfall der YidC-Tryptophanmutante YidC_{W354} mit zugehörigen Fluoreszenz-Lebensdauern ist beispielhaft in Abb. 34 dargestellt. Die Werte der Fluoreszenz-Lebensdauern (τ_i) sowie deren Anteil am Fluoreszenz-Intensitätszerfall (α_i) aller Detergenz-solubilisierten YidC-Tryptophanmutanten sind in Tabelle 10 aufgelistet.

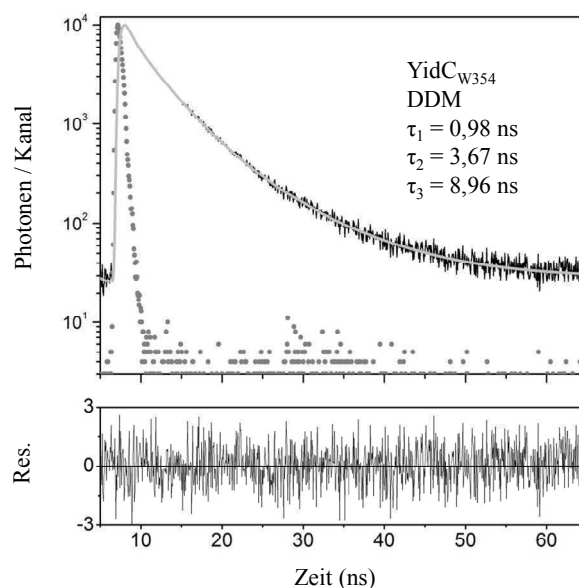


Abb. 34: Fluoreszenz-Intensitätszerfall der gereinigten, Detergenz-solubilisierten Tryptophanmutante YidC_{W354}. Der Fluoreszenz-Intensitätszerfall der gereinigten, Detergenz-solubilisierten Mutante YidC_{W354} in Puffer (20 mM Tris (HCl pH 7,0), 300 mM NaCl, 5% Isopropanol, 0,01% DDM (w/v)) ist dargestellt. Die Anregung erfolgte bei 290 nm und die Fluoreszenz-Lebensdauern (τ_i) wurden anhand der Gleichung 8 angepasst (graue Linie). Das Residuum (Res.) stellt die Abweichung der Anpassung dar.

Tabelle 10: Fluoreszenz-Lebensdauern, Anteil der Fluoreszenz-Lebensdauern und mittlere Fluoreszenz-Lebensdauer der jeweiligen gereinigten, Detergenz-solubilisierten YidC-Tryptophanmutante.

Probe	Lebensdauer (ns)			Anteil der Lebensdauer am Fluoreszenz-Intensitätszerfall			Mittlere Lebensdauer (ns)
	τ_1	τ_2	τ_3	α_1	α_2	α_3	$\langle\tau\rangle$
YidC _{2W}	1,01 ± 0,05	3,57 ± 0,08	7,83 ± 0,38	0,360 ± 0,003	0,515 ± 0,002	0,127 ± 0,007	4,61 ± 0,12
YidC _{W354}	0,95 ± 0,04	3,61 ± 0,07	8,71 ± 0,25	0,35 ± 0,01	0,540 ± 0,001	0,11 ± 0,01	4,92 ± 0,05
YidC _{W454}	1,05 ± 0,05	3,65 ± 0,06	8,02 ± 0,2	0,37 ± 0,02	0,512 ± 0,01	0,12 ± 0,01	4,60 ± 0,16
YidC _{W508}	0,98 ± 0,04	3,63 ± 0,03	9,37 ± 0,15	0,35 ± 0,02	0,54 ± 0,01	0,11 ± 0,01	4,98 ± 0,01

Die Fluoreszenz-Lebensdauern (τ_i) und deren Anteil am Fluoreszenz-Intensitätszerfall (α_i) sowie die mittlere Fluoreszenz-Lebensdauer ($\langle\tau\rangle$) der gereinigten, Detergenz-solubilisierten YidC-Tryptophanmutanten YidC_{2W}, YidC_{W354}, YidC_{W454} und YidC_{W508} in Puffer (20 mM Tris (HCl pH 7,0), 300 mM NaCl, 5% Isopropanol, 0,01% DDM (w/v)) sind zusammen mit der jeweiligen Standardabweichung der Mittelwerte angegeben. Die mittlere Fluoreszenz-Lebensdauer wurde anhand der Gleichung $\langle\tau\rangle = \sum\alpha_i\tau_i^2 / \sum\alpha_i\tau_i$ berechnet und die Anregung erfolgte bei 290 nm unter „magic-angle“-Bedingungen (Kap. 2.17.4).

Die gereinigten, Detergenz-solubilisierten YidC-Tryptophanmutanten wiesen jeweils drei nahezu identische Fluoreszenz-Lebensdauern $\tau_1 \approx 1$ ns, $\tau_2 \approx 4$ ns und $\tau_3 \approx 9$ ns auf, deren Gesamtanteil am Fluoreszenz-Intensitätszerfall ebenfalls für die 4 Mutanten gleich war ($\alpha_1 \approx 0,4$ und $\alpha_2 \approx 0,5$ bzw. $\alpha_3 \approx 0,1$). Die mittlere Fluoreszenz-Lebensdauer $\langle\tau\rangle$ aller YidC-Tryptophanmutanten lag bei ≈ 5 ns. Diese Werte entsprechen denen der in DOPC/DOPG-Liposomen rekonstituierten YidC-Tryptophanmutanten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die Tryptophan-Reste der in DOPC/DOPG-Liposomen rekonstituierten YidC-Tryptophanmutanten in ähnlicher Umgebung befanden wie die Tryptophan-Reste der in Detergenz vorliegenden gereinigten Mutanten.

3.7.2.5 Fluoreszenz-Anisotropie und Rotationskorrelationszeit der rekonstituierten YidC-Tryptophanmutanten vor und nach Bindung von Pf3W0 coat Protein

Für die Bestimmung der Fluoreszenz-Anisotropie wurden die Proben vor und nach Bindung von Pf3W0 coat verwendet. Der vertikal-vertikal (I_{VV}) polarisierte, sowie der vertikal-horizontal polarisierte Fluoreszenz-Intensitätszerfall (I_{VH}) der in DOPC/DOPG-Liposomen rekonstituierten Tryptophanmutanten YidC_{2W}, YidC_{W354}, YidC_{W454} und YidC_{W508} wurde gemessen und anhand dieser Daten wurde die Fluoreszenz-Anisotropie mittels Gleichung (10) sowie die Rotationskorrelationszeiten mittels Gleichung (11) bestimmt. Ein Beispiel für den vertikal-vertikal (I_{VV}) und den vertikal-horizontal (I_{VH}) polarisierten Fluoreszenz-Intensitätszerfall sowie die Anisotropie sind für die Mutante YidC_{W508} in Abb. 35 (A bzw. B) dargestellt. Eine Auflistung aller Daten ist in Tabelle 11 gezeigt.

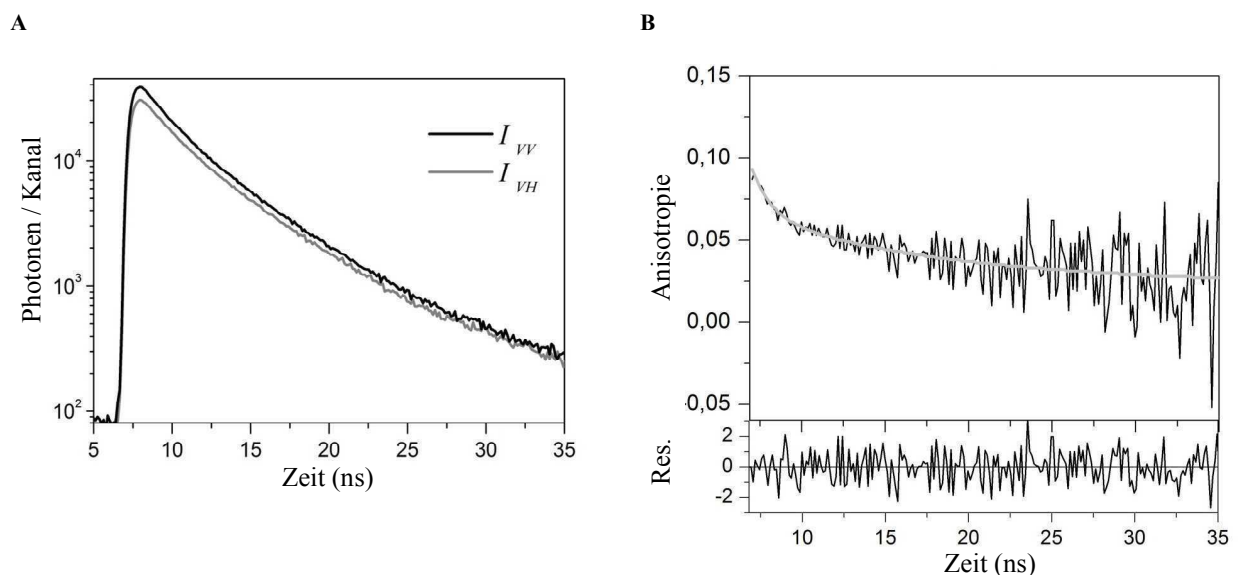


Abb. 35: Fluoreszenz-Intensitätszerfall und Anisotropie der rekonstituierten Tryptophanmutante YidC_{W508}. Der vertikal-vertikal (I_{VV}) sowie der vertikal-horizontal (I_{VH}) polarisierte Fluoreszenz-Intensitätszerfall der in DOPC/DOPG-Liposomen rekonstituierten Tryptophanmutante YidC_{W508} (A) und die Anpassung der Anisotropie (graue Linie) (B) mit

3. Ergebnisse

Abweichung zwischen Anpassung und Messung (Residuum, Res.) sind dargestellt. Die Anregung erfolgte bei 290 nm.

Vor Titration mit Pf3W0 coat konnten zwei Rotationskorrelationszeiten für alle Mutanten bestimmt werden. Für die Mutanten YidC_{2W}, YidC_{W354} und YidC_{W508} betragen diese $\theta_1 \approx 1$ und $\theta_2 \approx 12$ ns und für die Mutante YidC_{W454} $\theta_1 \approx 1$ und $\theta_2 \approx 17$ ns. Nach Zugabe von 2,1 μ M Pf3W0 coat Protein blieb die kurze Rotationskorrelationszeit θ_1 bei allen Mutanten nahezu unverändert. Die zweite Rotationskorrelationszeit θ_2 ändert sich jedoch bei allen Mutanten merklich. Am größten war diese Änderung bei den Mutanten YidC_{2W} und YidC_{W508}. Die zweite Rotationskorrelationszeit θ_2 verlängerte sich bei YidC_{2W} von ≈ 11 ns auf ≈ 20 ns und bei YidC_{W508} von ≈ 12 ns auf ≈ 22 ns.

Die fundamentale Anisotropie r_0 , welche sich durch die Anisotropie r_i ergab ($r_0 = r_\infty + r_1 + r_2$), betrug bei allen Mutanten im Durchschnitt $r_0 = 0,11 \pm 0,01$.

Es zeigte sich, dass bei allen Messungen die Anisotropie für $t \rightarrow \infty$ nie auf null abfiel. Daher wurde in allen Anpassungen ein endlicher Wert für r_∞ angenommen. Die Herkunft dieses r_∞ -Wertes liegt in der Rotation der Proteoliposomen (Kap. 2.17.7.4). Mit einem Durchmesser von 150 nm liegt ihre Rotationskorrelationszeit bei ≈ 400 μ s. Diese Zeit ist zu groß, um Einfluss auf die Rotationskorrelationszeiten im Nanosekunden-Bereich zu nehmen. Daher wurde die Rotation der Proteoliposomen durch $r_\infty = \text{konstant}$ berücksichtigt.

Die fundamentale Anisotropie ist abhängig von der Anregungswellenlänge. In der Literatur wird bei einer Anregungswellenlänge von 290 nm eine fundamentale Anisotropie von $r_0 = 0,13$ erwartet (Valeur & Weber, 1977; Ruggiero *et al.*, 1990). Die leichte Abweichung der hier ermittelten fundamentalen Anisotropie ($r_0 = 0,11 \pm 0,01$) rührt wahrscheinlich daher, dass eine weitere, kürzere Rotationskorrelationszeit $\theta_3 < 700$ ps (IRF 700 ps) existieren könnte, welche mit diesem Messaufbau nicht detektiert werden konnte.

Eine graphische Übersicht über die Rotationskorrelationszeiten und die fundamentale Anisotropie aller YidC-Tryptophanmutanten ist in Abb. 36 dargestellt.

Tabelle 11: Rotationskorrelationszeiten, Anisotropien und jeweilige fundamentale Anisotropie der rekonstituierten YidC-Tryptophanmutanten.

Probe	Korrelationszeit (ns)		Anisotropie		fundamentale
	θ_1	θ_2	r_1	r_2	r_0
YidC _{2W} : DOPC/DOPG	1,4 ± 0,4	11,1 ± 1,9	0,045 ± 0,005	0,024 ± 0,007	0,11 ± 0,01
YidC _{2W} : DOPC/DOPG + Pf3W0	1,13 ± 0,01	19,6 ± 0,9	0,046 ± 0,001	0,061 ± 0,002	0,12 ± 0,02
YidC _{W354} : DOPC/DOPG	1,00 ± 0,03	11,6 ± 1,4	0,041 ± 0,006	0,044 ± 0,009	0,11 ± 0,01
YidC _{W354} : DOPC/DOPG + Pf3W0	1,17 ± 0,03	14,0 ± 0,7	0,036 ± 0,007	0,041 ± 0,008	0,11 ± 0,01
YidC _{W454} : DOPC/DOPG	1,32	17,25	0,036	0,030	0,11
YidC _{W454} : DOPC/DOPG + Pf3W0	1,3	19,94	0,045	0,043	0,10
YidC _{W508} : DOPC/DOPG	1,08 ± 0,09	12,1 ± 0,4	0,05 ± 0,02	0,037 ± 0,006	0,11 ± 0,03
YidC _{W508} : DOPC/DOPG + Pf3W0	1,12 ± 0,08	21,9 ± 3,8	0,041 ± 0,005	0,05 ± 0,01	0,12 ± 0,01

Die Daten der Rotationkorrelationszeiten (θ_i) und Anisotropien (r_i) der jeweiligen in DOPC/DOPG-Liposomen rekonstituierten Tryptophanmutanten YidC_{2W}, YidC_{W354}, YidC_{W454} sowie YidC_{W508} vor und nach Titration mit Pf3W0 coat (+ Pf3W0) sind aufgelistet. Die Anregung erfolgte bei 290 nm. Die Standardabweichung von den Mittelwerten wurde berechnet. Für die fundamentale Anisotropie gilt: $r_0 = r_\infty + r_1 + r_2$.

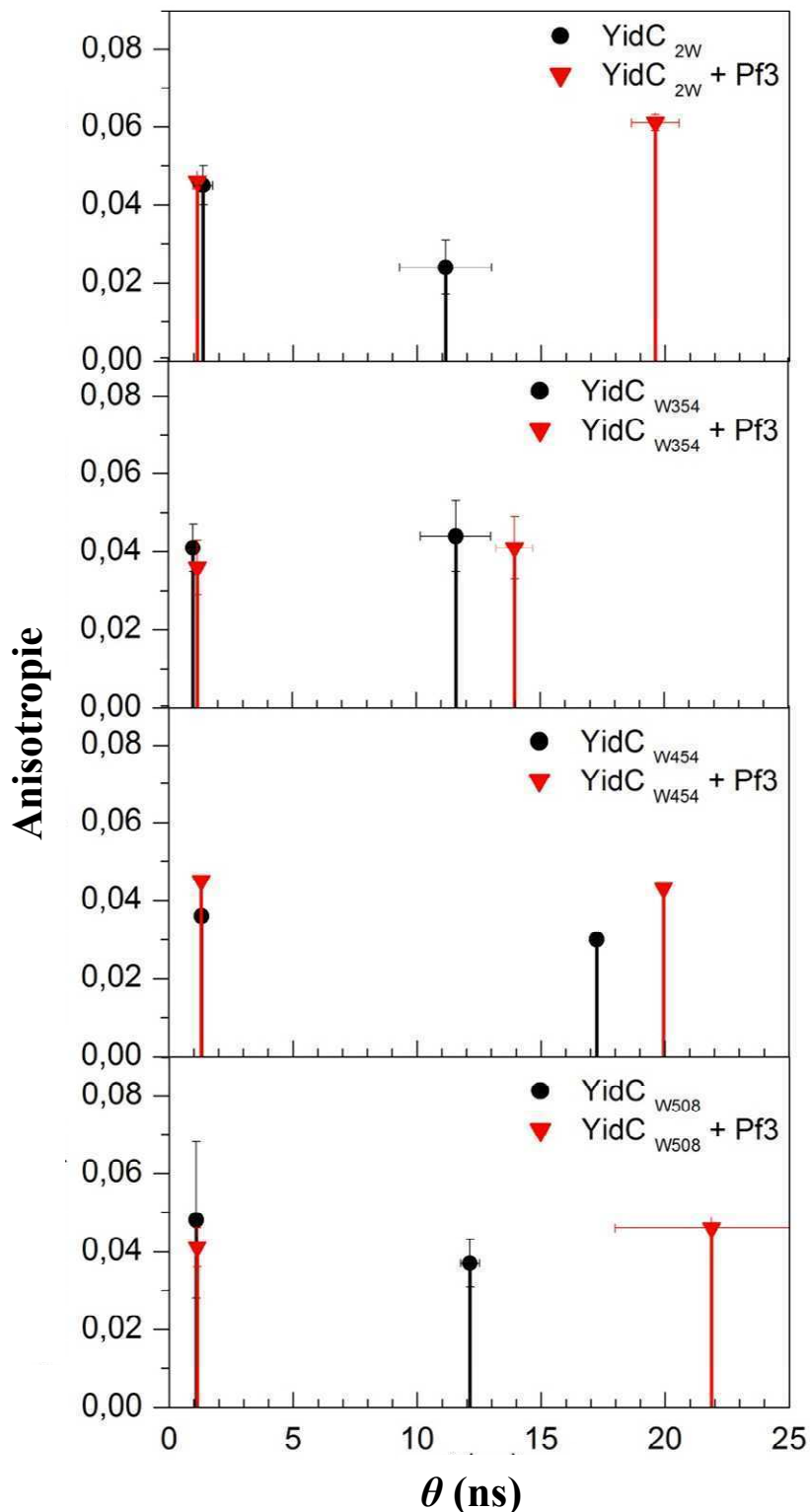


Abb. 36: Übersicht der Rotationskorrelationszeiten und Anisotropien der rekonstituierten YidC-Tryptophanmutanten. Die berechneten Rotationskorrelationszeiten (θ_i) mit entsprechender Anisotropie der YidC-Tryptophanmutanten YidC_{2W}, YidC_{W354}, YidC_{W454} sowie YidC_{W508} vor (●) und nach (▼) Bindung von Pf3W0 coat Protein sind graphisch dargestellt. Für die Darstellung wurden die Mittelwerte aus zwei Experimenten verwendet, mit Ausnahme der Tryptophanmutante YidC_{W454}, hier lag nur ein gutes Experiment vor.

Die Ergebnisse der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie zeigen, dass die Bindung von Pf3W0 coat zu einer veränderten Tryptophan-Emission der YidC-Mutanten führte. Die Fluoreszenz-Lebensdauer τ_3 und die Rotationskorrelationszeit θ_2 aller YidC-Tryptophanmutanten änderte sich durch Zugabe von Pf3W0 coat. Diese Veränderung war bei den Tryptophanmutanten YidC_{2W} und YidC_{W508} am deutlichsten.

4. Diskussion

E. coli ist ein Gram-negatives Bakterium, dessen Cytoplasma von einer Cytoplasmamembran, dem Periplasma und der äußeren Membran umgeben ist. Alle Proteine werden im Cytoplasma an Ribosomen synthetisiert. Ungefähr 25% dieser Proteine sind Membranproteine, die in der Cytoplasmamembran lokalisiert sind (Krogh *et al.*, 2001). Eines der Insertionssysteme, das Membranproteine in die Cytoplasmamembran inserieren kann, ist die YidC-Insertase (Abb. 27). YidC ist ein sechs-spänniges Membranprotein, dessen N- und C-Terminus im Cytoplasma lokalisiert sind. Die sechs Transmembrandomänen werden durch drei periplasmatische Bereiche (P1, P2 und P3) und zwei im Cytoplasma lokalisierte Bereiche (C1 und C2) verbunden (Sääf *et al.*, 1998; Kiefer & Kuhn, 2007). YidC unterstützt die Translokation der N-terminalen Region des einspännigen Haupthüllproteins Pf3 coat des Bakteriophagen Pf3 und integriert dessen hydrophobe Domäne in die Cytoplasmamembran (Chen *et al.*, 2002). Dieser Vorgang führt zu einer Dynamik innerhalb des YidC-Proteins. In einer vor kurzem publizierten Studie wurde anhand von „steady-state“ Fluoreszenzspektroskopie gezeigt, dass die Bindung von Pf3 coat zu einer Konformationsänderung von YidC führt (Winterfeld *et al.*, 2009). Diese Konformationsänderung wurde in dieser Arbeit mit Hilfe von „steady-state“ und zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie näher untersucht. Dafür wurden drei Einzel-Tryptophanmutanten und eine Doppel-Tryptophanmutante von YidC generiert. Der jeweilige Tryptophan-Rest diente als intrinsischer Fluorophor, anhand dessen alle periplasmatischen Domänen auf Konformationsänderung durch Bindung von Tryptophan-freiem Pf3 coat (genannt Pf3W0 coat) untersucht werden konnten. Der jeweilige Tryptophan-Rest innerhalb von YidC befand sich in der ersten periplasmatischen Domäne P1 an Position 354 (YidC_{W354}), im zweiten periplasmatischen Bereich P2 an Position 454 (Mutante YidC_{W454}) bzw. nahe des dritten periplasmatischen Bereichs P3 an Position 508 (Mutante YidC_{W508}). Eine weitere Mutante enthielt in der P1-Domäne zwei Tryptophan-Reste an Position 332/334 (Mutante YidC_{2W}). Alle weiteren neun bzw. zehn ursprünglich in YidC vorhandenen Tryptophan-Reste wurden durch Phenylalanine ersetzt. Zusätzlich wurde jede YidC-Tryptophanmutante sowie der YidC-Wildtyp am C-Terminus mit 10 Histidin-Resten, einem sogenannten His-Tag, fusioniert, der die Protein-Reinigung über Affinitätschromatographie ermöglichen sollte.

4.1 Komplementation des YidC-Depletionsstammes JS7131 durch die YidC-Tryptophanmutanten

Die mit einem His-Tag fusionierten YidC-Tryptophanmutanten YidC_{2W}, YidC_{W354}, YidC_{W454} und YidC_{W508} sowie der mit einem His-Tag fusionierte YidC-Wildtyp konnten den Wachstumsdefekt des YidC-Depletionsstammes JS7131 komplementieren und waren somit funktionell.

In dem Depletionsstamm JS7131 wurde das genomische *yidC*-Gen von Basenpaar 745 bis 1566 deletiert, wodurch das Gen für kein funktionsfähiges YidC-Protein codierte. Ein alternatives, funktionelles *yidC*-Gen war in den *attB* Locus inseriert und wurde zusätzlich unter Kontrolle eines *araBAD*-Promotors und Operators gestellt (Abb. 17). Dadurch konnte die Transkription des Gens und somit auch die Expression von genomischem YidC mit Arabinose induziert und mit Glukose reprimiert werden (Samuelson *et al.*, 2000).

4.1.1 Interpretation der Ergebnisse des Komplementations-Tests der YidC-Tryptophanmutanten mit Shine-Dalgarno-Motiv

Wie in Abb. 18 B gezeigt, konnten Zellen des YidC-Depletionsstammes JS7131, die das jeweilige plasmidcodierte Gen der YidC-Tryptophanmutanten bzw. des YidC-Wildtyps jeweils unter Kontrolle eines Tac-Promotors und mit Shine-Dalgarno-Motiv enthielten, nicht auf LB-Agar-Platten wachsen, auf denen die Überexpression des plasmidcodierten Proteins durch IPTG-Zugabe stimuliert wurde. Die Zellen konnten jedoch auf LB-Agar-Platten wachsen, die lediglich Glukose (Repression des genomischen YidC) enthielten.

Anhand eines Expressionstests (Abb. 22) mit der Mutante YidC_{W454} konnte dieses Wachstumsverhalten geklärt werden. Die plasmidcodierte Tryptophanmutante wurde mit und ohne ersichtliches Shine-Dalgarno-Motiv in den Depletionsstamm transformiert. Der Expressionstest zeigte, dass plasmidcodiertes YidC_{W454} auch ohne das Mitführen eines ersichtlichen Shine-Dalgarno-Motivs nach IPTG-Zugabe exprimiert wurde. Außerdem konnte gezeigt werden, dass viel größere Mengen an plasmidcodiertem YidC_{W454} mit Shine-Dalgarno-Motiv exprimiert wurden als ohne ersichtliches Shine-Dalgarno-Motiv.

Da das Wachstumsverhalten des YidC-Depletionsstammes (Abb. 18 B) unabhängig davon war, mit welchem plasmidcodierten YidC-Konstrukt dieser transformiert wurde, wird davon ausgegangen, dass die exprimierte Proteinmenge aller Tryptophanmutanten sowie des YidC-

Wildtyps mit Shine-Dalgarno-Motiv stärker war als ohne ersichtliches Shine-Dalgarno-Motiv. In dem Depletionsstamm war diese stärkere Expression der jeweils mit einem His-Tag fusionierten YidC-Tryptophanmutanten bzw. des YidC-Wildtyps mit Shine-Dalgarno-Motiv auf LB-Agar-Platten, die IPTG enthielten vermutlich letal, unabhängig davon, ob die Expression des genomischen YidC mittels Arabinose induziert oder mittels Glukose reprimiert wurde. Es ist bekannt, dass die Überexpression von Membranproteinen aus bisher ungeklärten Gründen toxisch auf manche *E. coli*-Stämme wie BL21 (DE3) wirken kann. Die Überexpression von Membranproteinen in den *E. coli*-Stämmen C41 (DE3) und C43 (DE3) ist hingegen selten toxisch (Miroux & Walker, 1996). Darum ist anzunehmen, dass die Überexpression der YidC-Tryptophanmutanten sowie des YidC-Wildtyps im YidC-Depletionsstamm JS7131 toxisch für diesen Stamm war.

Das Wachstum der Zellen auf LB-Agar-Platten, die lediglich Glukose (Repression des genomischen YidC) enthielten, war möglich, da, wie anhand des Expressionstests (Abb. 22) gezeigt werden konnte, schon vor Induktion mit IPTG plasmidcodiertes Protein exprimiert wurde. Diese Mengen waren jedoch deutlich geringer als nach Induktion und wirkten deshalb wahrscheinlich nicht toxisch und führten somit zum Wachstum der Zellen. In diesem Fall beweist das Wachstum des YidC-Depletionsstammes JS7131 auf LB-Agar-Platten mit Glukose, dass die YidC-Tryptophanmutanten sowie der YidC-Wildtyp, jeweils mit His-Tag fusioniert, diesen Stamm komplementieren konnten. Auch in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass die basale Transkription (ohne Induktion) über den Tac-Promotor zur Proteinexpression führt (Brosius *et al.*, 1985; Otto *et al.*, 1995).

4.1.2 Interpretation der Ergebnisse des Komplementations-Tests der YidC-Tryptophanmutanten ohne ersichtliches Shine-Dalgarno-Motiv

Zellen des YidC-Depletionsstammes JS7131, die das plasmidcodierte Gen der YidC-Tryptophanmutanten bzw. des YidC-Wildtyps jeweils unter Kontrolle eines Tac-Promotors und ohne ersichtliches Shine-Dalgarno-Motiv enthielten (Abb. 18 A), konnten auf LB-Agar-Platten mit Arabinose (Expression des genomischen YidC) und Arabinose/IPTG (Expression des genomischen YidC und des plasmidcodierten Proteins) sowie Glukose/IPTG (Repression des genomischen YidC und des Expression des plasmidcodierten Proteins) wachsen. Auf Platten mit Glukose (Repression des genomischen YidC) kam es zu keinem Wachstum. Anhand eines Expressionstests (Abb. 22) konnte gezeigt werden, dass Zellen, welche die plasmidcodierte YidC-Tryptophanmutante YidC_{W454} ohne ersichtliches Shine-Dalgarno-

Motiv enthielten, diese Mutante nach Überexpression (IPTG-Zugabe) im Vergleich zu Zellen, welche die Mutante mit Shine-Dalgarno-Motiv enthielten, in deutlich geringeren Mengen exprimierten. Diese Mengen wirkten nicht toxisch auf den Depletionsstamm, ansonsten hätte dieser auf Platten, welche IPTG enthielten (Expression des plasmidcodierten Proteins) nicht wachsen können. Vor IPTG-Zugabe fand im Gegensatz zu den Zellen, die das plasmidcodierte YidC_{W454} mit Shine-Dalgarno-Motiv enthielten, keine Expression der plasmidcodierten Mutante statt. Die Zellen konnten somit auf Platten, die nur Glukose als C-Quelle enthielten nicht wachsen, da vor Induktion kein plasmidcodiertes YidC exprimiert wurde und das genomische YidC reprimiert war. Das Wachstum der Zellen auf Platten mit Glukose/IPTG (Repression des genomischen YidC und Expression des plasmidcodierten Proteins) war folglich dadurch bedingt, dass der YidC-Depletionsstamm durch die jeweilige YidC-Tryptophanmutante komplementiert werden konnte.

Wie anhand des Expressionstests (Abb. 22) bzw. der Komplementations-Tests (Abb. 18 A) gezeigt wurde, konnten die Tryptophanmutanten YidC_{2W}, YidC_{W354}, YidC_{W454} und YidC_{W508} sowie der YidC-Wildtyp ohne ersichtliche Shine-Dalgarno-Sequenz exprimiert werden. Der Abstand zwischen Shine-Dalgarno-Sequenz und Start-Codon kann bei *E. coli* zwischen 5 - 13 Nukleotiden variieren, der optimale Abstand liegt jedoch bei 5 - 9 Nukleotiden. Kürzere oder längere Abstände können eine geringere Effizienz der Proteinexpression verursachen (Chen *et al.*, 1994). Zusätzlich hat die Länge der Shine-Dalgarno-Sequenz einen Einfluss auf das Expressionslevel von Proteinen (Vimberg *et al.*, 2007). Meist beinhaltet die Shine-Dalgarno-Sequenz von *E. coli* die Konsensus-Sequenz aus den Nukleotiden 5`-AGGAGGU-3` (Shine & Dalgarno, 1974). Durch Variation dieser Sequenz (Abb. 37 A) kann die Proteinexpression beeinflusst werden. Bei einer Länge von beispielsweise 6 Nukleotiden (5`-AGGAGG-3`) im Abstand von 6 Nukleotiden zum Start-Codon wird ca. doppelt so viel Protein exprimiert wie bei einer Länge von 2 Nukleotiden (5`-GG-3`). Dies wird wahrscheinlich dadurch verursacht, dass die Bindung von 2 Nukleotiden an die 16S rRNA der Ribosomen weniger effizient ist als die Bindung von 6 Nukleotiden (Vimberg *et al.*, 2007).

In dem hier vorliegenden Fall befanden sich folgende Nukleotide vor dem Start-Codon AUG (Abb. 37 B): 5`- **GGU**ACCCAAUUCAUAUG -3`. Die 3 Nukleotide GGU, die 11 Nukleotide vom Start-Codon entfernt liegen, könnten auf mRNA-Ebene als Erkennungssequenz für die 16 S rRNA der Ribosomen dienen. Diese verkürzte Shine-Dalgarno-Sequenz sowie die Abweichung vom optimalen Abstand zum Start-Codon könnten

dazu führen, dass die Bindung der Ribosomen wahrscheinlich weniger effizient war. Dies verursachte wahrscheinlich die reduzierte Proteinexpression (Abb. 22).

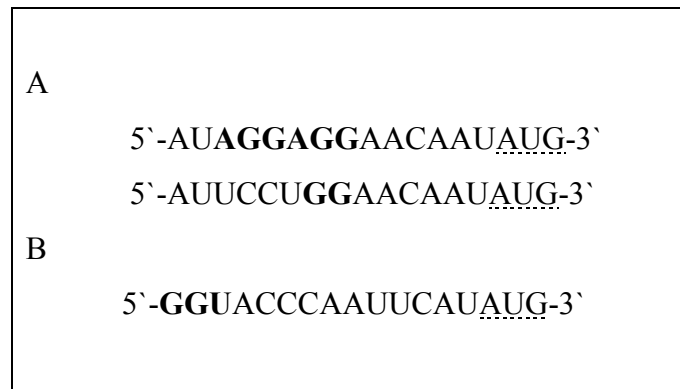


Abb. 37: Verschiedene Varianten der Shine-Dalgarno-Sequenz auf mRNA-Ebene. Mögliche Varianten der Shine-Dalgarno-Sequenz (fett gedruckt) im Abstand von 6 Nukleotiden vom Start-Codon AUG (A; nach Vimberg *et al.*, 2007). Shine-Dalgarno-Sequenz im Abstand von 11 Nukleotiden zum Start-Codon (B; diese Arbeit).

4.2 Interpretation der Ergebnisse der Insertions-Experimente von PClep

Ein weiterer Beweis der Funktionalität der YidC-Tryptophanmutanten YidC_{2W}, YidC_{W354}, YidC_{W454} und YidC_{W508} wurde erbracht, indem gezeigt wurde, dass die Insertion des strikt von YidC abhängigen Proteins PClep (Kuhn *et al.*, 1986; Samuelson *et al.*, 2001) durch die Mutanten möglich war (Abb. 20). Wenn PClep durch YidC in die Cytoplasmamembran inseriert wird, kann es mittels Leader Peptidase zu dem ca. 2,5 kDa kleineren Clep prozessiert werden. Um dies zu untersuchen wurde plasmidcodiertes PClep und die jeweilige plasmidcodierte YidC-Tryptophanmutante durch IPTG-Zugabe unter Glukose- (Repression des genomischen YidC) und unter Arabinose-Bedingungen (Expression des genomischen YidC) im YidC-Depletionsstamm JS7131 überexprimiert. Das innerhalb von 30 s neu synthetisierte Protein wurde daraufhin radioaktiv markiert. So war es möglich, den Anteil an PClep zu analysieren, der in diesem Zeitfenster durch YidC inseriert und mittels Leader Peptidase zu Clep prozessiert wurde. Dabei wurde für die Quantifizierung die gemeinsame Menge von PClep und Clep auf 100% gesetzt. Als Negativkontrolle wurden Zellen, die das Plasmid ohne *yidC*-Gen enthielten, mitgeführt. Es stellte sich heraus, dass in diesen Zellen unter Glukose-Bedingungen (Repression des genomischen YidC) und ohne plasmidcodiertes YidC 59% Clep vorlagen. Dies deutet darauf hin, dass das genomische YidC nicht vollständig

depletiert war, was zur teilweisen Insertion und somit zur Prozessierung von PClep führte. Aufgrund dieser Kontrolle wird angenommen, dass in allen Kulturen unter Glukose-Bedingungen noch geringe Mengen an genomischem YidC vorlagen. Diese Mengen waren jedoch zu gering um durch Immundetektion mit dem YidC-Antikörper detektiert und auf einem Röntgenfilm visualisiert zu werden (Abb. 21). Die Insertion von PClep wurde deshalb wahrscheinlich auch in den Zellen, mit plasmidcodierten YidC-Tryptophanmutanten bzw. mit plasmidcodiertem YidC-Wildtyp, teilweise durch genomisches YidC bewerkstelligt. In Zellen, welche die plasmidcodierten YidC-Tryptophanmutanten exprimierten, war im Vergleich zu Zellen, die den plasmidcodierten YidC-Wildtyp exprimierten, weniger PClep prozessiert. Ca. 70 - 80% des PClep wurden durch die YidC-Tryptophanmutanten in Zusammenarbeit mit dem genomischen YidC in die Membran inseriert und mittels Leader Peptidase prozessiert. Durch den YidC-Wildtyp und das genomische YidC konnten 100% des PClep inseriert und anschließend prozessiert werden. Zur Klärung dieser unterschiedlichen Mengen an inseriertem PClep trägt ein Expressionstest bei, der repräsentativ für alle YidC-Tryptophanmutanten mit der Tryptophanmutante YidC_{W454} durchgeführt wurde (Abb. 23). Dadurch konnte das Auftreten einer Abbaubande bei Expression von YidC_{W454} im YidC-Depletionsstamm JS7131 bei 37°C gezeigt werden. Der YidC-Wildtyp hingegen wurde unter diesen Bedingungen nicht abgebaut.

In einer Studie wurde gezeigt, dass manche von YidC abhängigen Proteine verschiedene Mengen an YidC für ihre Insertion in die Cytoplasmamembran benötigen (Yuan *et al.*, 2007). Wahrscheinlich hatten die Instabilität und der Abbau der YidC-Tryptophanmutanten einen Einfluss auf die Insertion von PClep. Da die YidC-Tryptophanmutanten im Gegensatz zum YidC-Wildtyp teilweise abgebaut wurden, sind folglich weniger Moleküle an YidC-Tryptophanmutanten pro Zelle enthalten als Moleküle des überexprimierten YidC-Wildtyps. Dies könnte zur Folge haben, dass PClep in unterschiedlichem Ausmaß mit Hilfe der YidC-Tryptophanmutanten bzw. des YidC-Wildtyps in die Membran inseriert wurde. Es ist aber auch möglich, dass die Tryptophanmutanten aktiv genug waren um das Wachstum des *E. coli* YidC-Depletionsstammes JS7131 zu ermöglichen (Abb. 18 B). Die Aktivität reichte aber nicht aus, um das nicht natürlich in *E. coli* vorkommende PClep im selben Ausmaß wie mittels YidC-Wildtyp in die Membran zu inserieren. In einer anderen Studie wurde ebenfalls festgestellt, dass YidC-Mutanten den Wachstumsdefekt des YidC-Depletionsstammes JS7131 komplementieren können, jedoch PClep nur in vermindertem Ausmaß inserieren können (Jiang *et al.*, 2003).

Der Abbau der YidC-Tryptophanmutanten (Abb. 22 und Abb. 23) ist wahrscheinlich auf das Fehlen eines Großteils der ursprünglich 11 Tryptophan-Reste zurückzuführen. Tryptophan-Reste befinden sich oft in der Grenzschicht von Wasser und Membran (Arkin & Brunger, 1998) und werden wahrscheinlich für die Verankerung von vor allem einspannigen Membranproteinen auf der trans-Seite der Cytoplasmamembran benötigt (Ridder *et al.*, 2000). Laut bisher bekannter und angenommener Struktur von YidC (Abb. 27) befinden sich die Tryptophan-Reste des YidC-Wildtyps ebenfalls bevorzugt an der trans-Seite der Membran (Sääf *et al.*, 1998; Kiefer & Kuhn, 2007). Da die YidC-Tryptophanmutanten teilweise abgebaut wurden und anstatt 11 Tryptophan-Resten lediglich einen bzw. zwei Tryptophan-Reste enthielten, ist anzunehmen, dass die Tryptophan-Reste auch zur Stabilität des sechsspännigen Membranproteins YidC beitragen. Die Instabilität der YidC-Tryptophanmutanten trug wahrscheinlich auch dazu bei, dass die Mutanten nach Reinigung niedriger konzentriert waren als der YidC-Wildtyp (Kap. 3.5). Die Mutanten wurden in *E. coli* Zellen, die bei 37°C kultiviert wurden, teilweise abgebaut (Abb. 24). Die Expression bei 20°C war im Vergleich dazu effizienter, konnte aber die des YidC-Wildtyp bei der für *E. coli* optimalen Wachstumstemperatur von 37°C nicht erreichen.

4.3 Umgebung der Tryptophan-Reste der in Liposomen rekonstituierten YidC-Tryptophanmutanten

Die jeweilige gereinigte, Detergenz-solubilisierete YidC-Tryptophanmutante wurde in DOPC/DOPG-Liposomen rekonstituiert. Wie in einer anderen Studie belegt, ist in Liposomen rekonstituiertes YidC funktionell (Serek *et al.*, 2004). Das Lumen dieser künstlichen Membran entspricht somit im *in vitro* Versuch dem Periplasma, die Umgebung dem Cytoplasma. Die Tryptophanmutanten konnten entweder mit der P1-Domäne innerhalb der Liposomen oder mit der P1-Domäne außerhalb der Liposomen eingebaut werden. Es stellte sich heraus, dass mehr als 60% der jeweiligen YidC-Tryptophanmutante mit der P1-Domäne innerhalb der Liposomen rekonstituiert wurde (Abb. 26). Die jeweilige rekonstituierte YidC-Tryptophanmutante wurde schrittweise mit Pf3W0 coat titriert (Abb. 28). Nach jedem Titrationsschritt wurde ein Emissionsspektrum aufgenommen. Die Spektren zeigten, dass durch Titration die Fluoreszenz des jeweiligen Tryptophan-Restes an Position 332/334, 354, 454 bzw. 508 teilweise gelöscht wurde, d. h. die Fluoreszenzintensität nahm im Laufe der Titration ab. Dies zeigt, dass durch die Bindung von Pf3W0 coat an die jeweilige YidC-Tryptophanmutante Konformationsänderungen in allen drei periplasmatischen Domänen von

YidC stattfanden. Die Substratbindungsstelle von YidC muss folglich mit den periplasmatischen Regionen von YidC gekoppelt sein. Des Weiteren verschoben sich die Spektren nach Titration im Vergleich zu den Spektren vor Titration von Pf3W0 coat bis zu 4 nm in den längerwelligen Bereich (Tab. 7). Diese sogenannte Rot-Verschiebung wurde auch in anderen Studien beobachtet (Gerken *et al.*, 2008; Winterfeld *et al.*, 2009) und deutet darauf hin, dass die Bindung von Pf3W0 coat die Umgebung des jeweiligen Tryptophan-Restes der YidC-Tryptophanmutanten beeinflusst.

Des Weiteren lassen die gleichartig gestalteten Emissionsspektren der rekonstituierten YidC-Tryptophanmutanten ohne zugegebenes Pf3W0 coat darauf schließen, dass sich die Tryptophan-Reste aller Mutanten in ähnlicher Umgebung befanden. Die Emissionsspektren wiesen vor Titration mit Pf3W0 coat jeweils ein Fluoreszenzmaximum λ_{\max} auf, das zwischen 343 - 347 nm lag und eine Breite auf halber Höhe der maximalen Intensität (FWHM) zwischen 66 - 69 nm.

Die anhand der Emissionsspektren erstellten Bindungskurven (Abb. 28) dienen der Ermittlung der jeweiligen Dissoziationskonstante K_D . Die K_D -Werte waren bei allen YidC-Tryptophanmutanten ähnlich. Dies zeigte, dass Pf3W0 coat nahezu gleichstark an alle Mutanten gebunden war. Die K_D -Werte lagen bei $K_D \approx 1 \mu\text{M}$ (Tab. 7). Dieses Ergebnis steht in Einklang mit Untersuchungen des rekonstituierten YidC-Wildtyps (Winterfeld *et al.*, 2009). Pf3W0 coat wird, wie auch Pf3 coat, nicht mit Detergenz solubilisiert, sondern mit Hilfe von 10% Isopropanol (Serek *et al.*, 2004). Dadurch war ausgeschlossen, dass das Pf3W0 coat Protein in einer Detergenzmizelle eingeschlossen vorlag, welche die Bindung an YidC beeinflussen könnte.

4.4 Umgebung der Tryptophan-Reste der gereinigten, Detergenz-solubilierten YidC-Tryptophanmutanten

Die Fluoreszenzspektren der gereinigten, Detergenz-solubilierten YidC-Tryptophanmutanten YidC_{2W}, YidC_{W354}, YidC_{W454} bzw. YidC_{W508} wurden in Tris-Puffer gemessen, der mit 0,1% DDM (w/v) versetzt wurde (Abb. 31). Die Konzentration an DDM lag über dem cmc-Wert von ca. 0,008% (w/v). Oberhalb der cmc bildet das Detergenz Mizellen, in welche sich Membranproteine, wie die YidC-Tryptophanmutanten, aufgrund ihrer Hydrophobizität einlagern können (Garavito *et al.*, 1986). Die Fluoreszenzeigenschaften der Detergenz-solubilierten YidC-Tryptophanmutanten (Tab. 8) entsprachen denen der in

Liposomen rekonstituierten YidC-Tryptophanmutanten. Sie wiesen jeweils ein Fluoreszenzmaximum zwischen 344 - 347 nm auf und eine Breite von 68 - 71 nm. Dies zeigt, dass sich die gereinigten, Detergenz-solubilisierten YidC-Tryptophanmutanten bzw. deren Tryptophan-Reste in ähnlicher Umgebung befanden wie die Tryptophan-Reste der in Liposomen rekonstituierten Mutanten.

Die Fluoreszenzmaxima ($\lambda_{\max} \approx 345$ nm) der rekonstituierten sowie der Detergenz-solubilisierten YidC-Tryptophanmutanten (Tab. 7 und Tab. 8) sind typisch für Tryptophan-Reste, die sich in einer amphiphilen Umgebung, d. h. in der Grenzschicht von Membran und Wasser befinden (Burstein *et al.*, 1973). Der Vergleich der Positionen der Tryptophan-Reste der Mutanten mit der vorhergesagten Topologie von YidC bestärkt dieses Ergebnis. Die Tryptophan-Reste W354, W454 und W508 sind demnach in der Grenzschicht von Membran und Wasser lokalisiert (Sääf *et al.*, 1998; Kuhn & Kiefer, 2007).

Die P1-Domäne von YidC wurde bereits von Aminosäure 54 - 340 kristallisiert und deren Struktur aufgeklärt (Oliver & Paetzel, 2008; Ravaud *et al.*, 2008). Dadurch wurde deutlich, dass die Tryptophan-Reste an Position 252, 264 und 308 in einer nur sehr schwach polaren, kompakten β -Struktur eingehüllt vorliegen, die für Wassermoleküle nur schwer zugänglich ist. Die Tryptophan-Reste W332 und W334 hingegen befinden sich in einem kurzen α -helikalen Bereich, in dem die Indolringe der Tryptophan-Reste teilweise in wässriger, polarer Umgebung lokalisiert sind. Diese Gegebenheiten wurden durch das Emissionsspektrum der hier verwendeten P1-Domäne (Aminosäure 56 - 329) bestätigt (Abb. 30). Das Fluoreszenzmaximum der P1-Domäne ($\lambda_{\max} = 334$ nm) ist im Vergleich zu dem der Doppel-Tryptophanmutante YidC_{2W} ($\lambda_{\max} = 345$ nm) um 11 nm in den kurzwelligeren Bereich verschoben. Diese sogenannte Blau-Verschiebung des Fluoreszenzmaximums begründet sich darin, dass die Tryptophan-Reste W252, W264 und W308 der P1-Domäne in einer deutlich schwächer polaren Umgebung vorliegen, als die Tryptophan-Reste W332/W334 der Mutante YidC_{2W}. Mehrere Studien zeigen, dass das Maximum der intrinsischen Fluoreszenz von Proteinen stark mit der Umgebung des Tryptophan-Restes variiert. Azurin beispielsweise enthält einen Tryptophan-Rest in stark apolarer Umgebung und hat ein Fluoreszenzmaximum bei ≈ 308 nm (Finazzi-Agrò *et al.*, 1970). Glukagon enthält einen Tryptophan-Rest, der vollständig exponiert in polarer Umgebung vorliegt. Das Fluoreszenzmaximum des Tryptophan-Restes liegt hier bei ≈ 352 nm (Eftink & Ghiron, 1976).

4.5 Änderung der Umgebung des Tryptophan-Restes der jeweiligen YidC-Tryptophanmutante durch Bindung von Pf3W0 coat Protein

Dieselben für die „steady-state“ Fluoreszenzspektroskopie verwendeten Proben wurden vor und nach Titration mit Pf3W0 coat, mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie analysiert.

Es ist schwierig komplexe Fluoreszenz-Intensitätszerfälle mit mehreren Fluoreszenz-Lebensdauern zu interpretieren, da bei Vorhandensein von mehreren Tryptophan-Resten die Umgebung jedes Einzelnen meist unterschiedlich ist. Bei Proteinen, die nur einen Tryptophan-Rest enthalten, ist es ebenfalls schwierig, zeitaufgelöste Fluoreszenz-Intensitätszerfälle zu interpretieren, denn selbst diese weisen mehrere Fluoreszenz-Lebensdauern auf (Beechem & Brand, 1985). Auch reines Tryptophan weist mehrere Fluoreszenz-Lebensdauern auf. Diese betragen in wässriger Umgebung (pH 7,0) $\approx 0,5$ ns und $\approx 3,1$ ns (Abb. 16 C). Eine Erklärung für das Auftreten von multiexponentiellen Fluoreszenz-Intensitätszerfällen ist, dass die Emission von verschiedenen Tryptophan-Rotameren (auch genannt Rotationsisomere) erzeugt wird. Es gibt drei Rotamere des Tryptophans, innerhalb derer drei verschiedenen Konfigurationen der Seitenketten hinsichtlich des Indolrings vorliegen können (Abb. 38). Rotamere A und C, deren Ammonium-Gruppen am nächsten am Indolring liegen, sind die kurzlebigen Komponenten ($\tau = 0,5$ ns). Rotamer B mit der Carboxylat-Gruppe am nächsten am Indolring ist die langlebige Komponente ($\tau = 3,1$ ns) (Szabo & Rayner 1980).

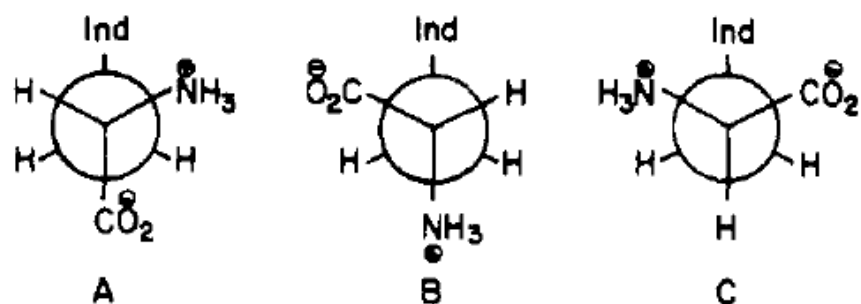


Abb. 38: Newman-Projektion der drei Rotamere (A, B, C) des Tryptophans. Die Seitenketten (Ammonium- und Carboxylat-Gruppe) des Tryptophans können durch Drehbarkeit entlang der C $_{\alpha}$ -C $_{\beta}$ -Bindung von Tryptophan in drei verschiedenen Konfigurationen bezüglich des Indolrings (Ind) vorliegen (Szabo & Rayner, 1980).

Multiexponentielle Fluoreszenz-Intensitätszerfälle mit mehreren Fluoreszenz-Lebensdauern der Tryptophan-Fluoreszenz können aber auch durch chemische Heterogenität der Umgebung des Tryptophans (beispielsweise verschiedene pH-Werte) bedingt sein (Burstein *et al.*, 1973). Aufgrund dieser Komplexität der Fluoreszenz-Lebensdauern werden in der hier vorliegenden Arbeit Änderungen der Fluoreszenz-Lebensdauern als Folge auf eine veränderte Umgebung des jeweiligen Tryptophan-Restes interpretiert.

Anhand des Fluoreszenz-Intensitätszerfalls der jeweiligen rekonstituierten YidC-Tryptophanmutante konnten vor und nach Bindung von Pf3W0 coat drei Fluoreszenz-Lebensdauern τ gemessen werden (Tab. 9). Die Fluoreszenz-Lebensdauern aller rekonstituierten YidC-Tryptophanmutanten waren vor Bindung von Pf3W0 coat Protein nahezu identisch. Dies spricht dafür, dass die Tryptophan-Reste W332/W334, W354, W454 und W508 in gleichartiger Umgebung vorlagen. Nach Bindung von Pf3W0 coat verlängerte sich jedoch bei allen Mutanten die dritte Fluoreszenz-Lebensdauer τ_3 . Dies zeigt, dass sich die Umgebung der Tryptophan-Reste durch die Bindung von Pf3W0 coat änderte. Auch die Emissionsspektren der „steady-state“ Fluoreszenzspektroskopie der Mutanten wiesen nach Bindung von Pf3W0 coat veränderte Fluoreszenzeigenschaften auf (Tab. 7). Vor Bindung lag die maximale Fluoreszenz aller Mutanten zwischen 343 und 347 nm und die Breite der Spektren (FWHM) zwischen 66 und 69 nm. Durch Bindung von Pf3W0 coat Protein wurden die Fluoreszenzmaxima aller YidC-Tryptophanmutanten um 2 - 4 nm in den länger welligen Bereich verschoben (Rot-Verschiebung) und die Spektren wurden um 3 - 5 nm breiter. Diese Ergebnisse sowie die Ergebnisse der Fluoreszenz-Lebensdauer deuten auf eine Änderung der Umgebung der Tryptophan-Reste durch die Bindung des Pf3W0 coat Proteins hin. Ebenso wie die Fluoreszenzeigenschaften bei den „steady-state“ Fluoreszenzmessungen entsprachen die Fluoreszenz-Lebensdauern der gereinigten, Detergenz-solubilisierten YidC-Tryptophanmutanten (Tab. 10) denen der rekonstituierten Mutanten (Tab. 9). Dies zeigt erneut, dass sich die Mutanten in beiden Fällen in gleichartiger Umgebung befanden.

Diese Ergebnisse reihen sich in die anderer Arbeitsgruppen ein, welche ebenfalls drei Fluoreszenz-Lebensdauern für Proteine bestimmen konnten, die einen oder zwei Tryptophan-Reste enthalten (Lakowicz, 2006; Beechem & Brand, 1985). Da die minimale Zeitauflösung des Messaufbaus bei 700 ps lag (IRF 700 ps; Kap. 3.7.2.1) kann nicht ausgeschlossen werden, dass kürzere Fluoreszenz-Lebensdauern existieren können.

Der Fluoreszenz-Intensitätszerfall der Tryptophan-Reste der P1-Domäne wies lediglich zwei Fluoreszenz-Lebensdauern ($\tau_1 \approx 4$ ns und $\tau_2 \approx 7$ ns) auf (Tab. 9). Dies könnte daran liegen,

dass das Fluoreszenzverhalten der drei Tryptophan-Reste der P1-Domäne (W252, W264 und W308) durch die schwach polare Umgebung innerhalb der β -Struktur, in der sie lokalisiert sind, im Vergleich zu dem Tryptophan-Rest der jeweiligen Einzel- bzw. Doppel-Tryptophanmutante, die in der vergleichsweise polaren Grenzschicht von Membran und Wasser bzw. in einer α -Helix liegen, verschieden ist (Oliver & Paetzel, 2008; Ravaud *et al.*, 2008).

Die Fluoreszenz-Lebensdauern der rekonstituierten YidC-Tryptophanmutanten und der P1-Domäne stehen in Einklang mit den Ergebnissen der „steady-state“ Fluoreszenzspektroskopie und der bisher bekannten Membrantopologie von YidC (Sääf *et al.*, 1998; Kiefer & Kuhn, 2007).

4.6 Beweglichkeit der YidC-Tryptophanmutanten

Aus dem Verlauf der Anisotropie ließen sich für jede in Liposomen rekonstituierte YidC-Tryptophanmutante zwei Rotationskorrelationszeiten θ_1 und θ_2 berechnen (Tab. 11). Dies bedeutet, dass die Tryptophan-Reste beweglich waren. Die Beweglichkeit kann durch Bewegung des Indolrings, welcher um die C_α - C_β und C_β - C_γ Bindung oszillieren und rotieren könnte sowie durch Taumelbewegungen des gesamten Tryptophan-Restes aufgrund der Flexibilität des Peptidrückgrates verursacht werden. Rotationskorrelationszeiten um 1 ns werden begrenzten Bewegungen des Tryptophan-Restes zugeschrieben. Vom Auftreten einer zweiten Rotationskorrelationszeit durch interne Bewegung des Tryptophan-Restes wird in Anisotropie-Experimenten nur selten berichtet (Datema *et al.*, 1987; Vogel *et al.*, 1988; Johnson & Hudson, 1989). NMR-Messungen (nuclear magnetic resonance, Kernspinresonanz) besagen, dass Rückgratbewegungen im Nanosekundenbereich auftreten können (Alexandrescu & Shortle, 1994; Chevelkov *et al.*, 2009). Deshalb wird die Rotationskorrelationszeit θ_2 Bewegungen des Tryptophan-Restes zugeschrieben, die aufgrund von Bewegungen des Proteinrückgrats verursacht werden. Es ist möglich, dass eine weitere Rotationskorrelationszeit θ_3 existiert, welche mit diesem Messaufbau nicht detektiert werden konnte ($\theta_3 < 1$ ns), da der Wert der fundamentalen Anisotropie $r_0 = 0,11 \pm 0,01$ (Durchschnitt der Werte aus Tab. 11) leicht von dem Literaturwert $r_0 = 0,13$ abwich (Valeur & Weber, 1977; Ruggiero *et al.*, 1990).

Die Bindung des Proteins Pf3W0 coat führt zur Bewegung aller drei periplasmatischen Bereiche von YidC. Der größte Effekt tritt hierbei in der ersten periplasmatischen Domäne P1

(Mutante YidC_{2W}) und im dritten periplasmatischen Bereich (Mutante YidC_{W508}) auf (Tab. 11 und Abb. 36). Die lange Rotationskorrelationszeit θ_2 verlängerte sich bei diesen Mutanten durch Bindung von Pf3W0 coat am signifikantesten. Die interne, begrenzte Beweglichkeit des Tryptophan-Restes jeder Mutante wurde durch die Bindung von Pf3W0 coat nicht beeinflusst, denn die kurze Rotationskorrelationszeit θ_1 blieb nach Bindung von Pf3W0 coat nahezu unverändert.

In vivo Quervernetzungs-Experimente zeigen, dass mittig gelegene Aminosäuren der Transmembrandomäne von Pf3 coat die Aminosäure 17 der ersten Transmembrandomäne von YidC sowie die Aminosäure 430 der dritten Transmembrandomäne von YidC kontaktieren (Klenner *et al.*, 2008). Die Interaktion von Pf3 coat mit der ersten Transmembrandomäne von YidC könnte für die geänderte Beweglichkeit der Tryptophan-Reste W332/W334 (YidC_{2W}) nach Bindung von Pf3W0 coat ursächlich sein.

5. Zusammenfassung

Die YidC-Insertase des Gram-negativen Bakteriums *E. coli* ermöglicht die Insertion von Proteinen in die Cytoplasmamembran. YidC selbst ist ebenfalls in der Cytoplasmamembran lokalisiert und durchspannt diese mit sechs Transmembrandomänen. Dabei sind der N- und der C-Terminus im Cytoplasma lokalisiert. Die sechs Transmembrandomänen werden durch drei periplasmatische Bereiche (P1, P2 und P3) und zwei im Cytoplasma lokalisierte Bereiche (C1 und C2) verbunden. Es ist bekannt, dass durch die Bindung des YidC-abhängigen Proteins Pf3 coat Konformationsänderungen in der Tertiärstruktur von YidC verursacht werden. Diese molekulare Dynamik von YidC wurde in dieser Arbeit mittels „steady-state“ und zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie genauer untersucht. Dafür wurden drei YidC-Tryptophanmutanten verwendet, die an Position 354 in der ersten periplasmatischen Domäne P1, an Position 454 im zweiten periplasmatischen Bereich P2 bzw. an Position 508 nahe des dritten periplasmatischen Bereichs P3 jeweils einen Tryptophan-Rest enthielten. Zusätzlich wurde eine Doppel-Tryptophanmutante verwendet, die zwei Tryptophan-Reste in der P1-Domäne an Position 332/334 enthielt. Diese Tryptophan-Reste dienten als intrinsische Fluorophore. Zunächst wurde gezeigt, dass die YidC-Tryptophanmutanten den Wachstumsdefekt des *E. coli* YidC-Depletionsstammes JS7131 komplementieren konnten und zudem in der Lage waren, das strikt von YidC abhängige Protein PClep in die Cytoplasmamembran des Depletionsstammes zu inserieren. Dies stellte sicher, dass die YidC-Tryptophanmutanten funktionell waren. Die gereinigten YidC-Tryptophanmutanten wurden in Liposomen rekonstituiert und mit Pf3W0 coat, einer Tryptophan-freien Mutante von Pf3 coat, titriert. Dies ermöglichte spektroskopische Untersuchungen jedes einzelnen periplasmatischen Bereichs (P1, P2 und P3) von YidC vor und nach Bindung von Pf3W0 coat Protein. Analysen der Emissionsspektren und der Fluoreszenz-Lebensdauern der Detergenz-solubilisierten sowie der rekonstituierten YidC-Tryptophanmutanten vor Bindung von Pf3 coat ließen darauf schließen, dass sich der jeweilige Tryptophan-Rest der Einzel-Tryptophanmutanten (YidC_{W354}, YidC_{W454} und YidC_{W508}) in der Grenzschicht von Wasser und Membran befand. Diese Ergebnisse sind vereinbar mit der bisher bekannten Membrantopologie von YidC. Die Tryptophan-Reste der Doppel-Tryptophanmutante (YidC_{2W}) wiesen Fluoreszenzeigenschaften auf, die in Einklang mit der bekannten Struktur der P1-Domäne stehen, wonach sie sich in einem teilweise zugänglichen, α -helikalen Bereich befinden. Die Analyse der Emissionsspektren und der Fluoreszenz-Lebensdauern führten des Weiteren zur Erkenntnis, dass durch Bindung des Pf3W0 coat Proteins

Konformationsänderungen in allen drei periplasmatischen Bereichen (P1, P2 und P3) von YidC stattfanden. Anisotropie-Messungen zeigten, dass diese Konformationsänderungen zu Bewegungen der Tryptophan-Reste in allen drei periplasmatischen Bereichen der YidC-Tryptophanmutanten führten, wobei die periplasmatische Domäne P1 mit den Tryptophan-Resten W332/W334 und der dritte periplasmatische Bereich P3 mit dem Tryptophan-Rest W508 am signifikantesten betroffen waren.

5. Summary

The membrane insertase YidC of the Gram-negative bacterium *E. coli* enables the insertion of proteins into the cytoplasmic membrane. YidC itself is localized in the cytoplasmic membrane and spans the membrane six times with its N- and C-termini localized in the cytoplasm. These six transmembrane segments are connected by three periplasmic loops (P1, P2 and P3) and two cytoplasmic loops (C1 and C2). It is known that the binding of the YidC-dependent protein Pf3 coat induces conformational changes in the tertiary structure of YidC. This molecular dynamic of YidC was examined in detail with steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy. Therefore, three tryptophan mutants of YidC with one tryptophan residue each, at position 354 in the first periplasmic domain P1, at position 454 in the second periplasmic region and at position 508 near the third periplasmic region, respectively, were used. Additionally, a double tryptophan mutant was used which contained two tryptophan residues at position 332/334 of the domain P1. These tryptophan residues were used as intrinsic fluorophores. First, it was shown that the tryptophan mutants of YidC complemented the growth defect of the *E. coli* YidC-depletion strain JS7131. Additionally, the mutants were able to insert the strictly YidC-dependent PClep protein into the cytoplasmic membrane of the depletion strain. Thus, the functionality of the tryptophan mutants of YidC was ensured. Purified tryptophan mutants of YidC were reconstituted into liposomes and titrated with Pf3W0 coat, a tryptophan free mutant of Pf3 coat protein allowing spectroscopic studies of each periplasmic region (P1, P2 and P3) before and after binding of Pf3W0 coat protein. Analysis of the emission spectra and the fluorescence lifetimes of detergent solubilized as well as of the reconstituted YidC tryptophan mutants before binding of Pf3W0 coat revealed that the tryptophan residue of each single tryptophan mutant (YidC_{W354}, YidC_{W454} and YidC_{W508}) was localized at the membrane/water interface. These results are consistent with the proposed membrane topology of YidC. The tryptophan residues of the double tryptophan mutant of YidC (YidC_{2W}) showed fluorescence properties consistent with their localization in a partially exposed α -helical segment of the P1 domain. Analysis of the emission spectra and the fluorescence lifetimes provided additional evidence that binding of Pf3W0 coat induced conformational changes of all periplasmic regions (P1, P2 and P3) within YidC. Measurements of fluorescence anisotropy showed that the conformational changes affected motions within all three periplasmic regions of the YidC tryptophan mutants, whereas the periplasmic domain P1 with the tryptophan residues W332/W334 and the third periplasmic domain P3 with the tryptophan residue W508 were affected most significantly.

6. Literaturverzeichnis

- Ahrem, B., Hoffschulte, H. K., Müller, M. (1989) *In vitro* membrane assembly of a polytopic, transmembrane protein results in an enzymatically active conformation. *J. Cell. Biol.* 108(5), 1637-46.
- Akimaru, J., Matsuyama, S., Tokuda, H., Mizushima, S. (1991) Reconstitution of a protein translocation system containing purified SecY, SecE, and SecA from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 6545-9.
- Akiyama, Y., Ito, K. (1987) Topology analysis of the SecY protein, an integral membrane protein involved in protein export in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 6, 3465-70.
- Alexandrescu, A. T., Shortle, D. (1994) Backbone dynamics of a highly restricted disordered 131 residue fragment of staphylococcal nuclease. *J. Mol. Biol.* 242, 527-546.
- Altamura, N., Capitano, N., Bonnefoy, N., Papa, S., Dujardin, G. (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* OXA1 gene is required for the correct assembly of cytochrome c oxidase and oligomycin-sensitive ATP synthase. *FEBS Lett.* 382, 111-115.
- Ames, G. F. (1968) Lipids of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: structure and metabolism. *J. Bacteriol.* 95, 833-43.
- Andersson, H., 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, 683-91.
- Angelini, S., Deitermann, S., Koch, H. G. (2005) FtsY, the bacterial signal-recognition particle receptor, interacts functionally and physically with the SecYEG translocon. *EMBO Rep.* 6, 476-81.
- Arkin, I. T., Brunger, A. T. (1998) Statistical analysis of predicted transmembrane alpha-helices. *Biochim. Biophys. Acta.* 1429, 113-28.

- Balzer, D., Ziegelin, G., Pansegrau, W., Kruff, V., Lanka, E. (1992) KorB protein of promiscuous plasmid RP4 recognizes inverted sequence repetitions in regions essential for conjugative plasmid transfer. *Nucleic Acids Res.* 20, 1851–1858.
- Beck, K., Wu, L. F., Brunner, J., Müller, M. (2000) Discrimination between SRP- and SecA/SecB-dependent substrates involves selective recognition of nascent chains by SRP and trigger factor. *EMBO J.* 19, 134-143.
- Beck, K., Eisner, G., Trescher, D., Dalbey, R. E., Brunner, J., Müller, M. (2001) YidC, an assembly site for polytopic *Escherichia coli* membrane proteins located in immediate proximity to the SecYE translocon and lipids. *EMBO Rep.* 2, 709-14.
- Becker, W., Bergmann, A., (2005) Multidimensional time-correlated single-photon counting. *Reviews in fluorescence* 2, 77–108.
- Beechem, J. M., and Brand, L. (1985) Time-resolved fluorescence of proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 54, 43-71.
- Berks, B. C., Sargent, F., Palmer, T. (2000) The Tat protein export pathway. *Mol. Microbiol.* 35, 260-74.
- Bernstein, H. D., Poritz, M. A., Strub, K., Hoben, P. J., Brenner, S., Walter, P. (1989) Model for signal sequence recognition from amino-acid sequence of 54K subunit of signal recognition particle. *Nature* 340, 482-486.
- Blattner, F. R., Plunkett, G. 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277, 1453-1462.
- Bonnefoy, N., Chalvet, F., Hamel, P., Slonimski, P. P., Dujardin, G. (1994) Oxa1, a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene whose sequence is conserved from prokaryotes to eukaryotes controls cytochrome oxidase biogenesis. *J. Mol. Biol.* 239, 201-212.

- Bowman, R. L., Caulfield, P. A., Udenfriend, S. (1955) Spectrophotofluorometric assay in the visible and ultraviolet. *Science* 122, 32-33.
- Bradley, D. E. (1974) Adsorption of bacteriophages specific for *Pseudomonas aeruginosa* R factors RP1 and R1822. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 57, 893-900.
- Brand, L., Everse, J., Kaplan, N. O. (1962) Structural characteristics of dehydrogenases. *Biochemistry.* 1, 423-434.
- Brosius, J., Erfle, M., Storella, J. (1985) Spacing of the -10 and -35 regions in the tac promoter. Effect on its *in vivo* activity. *J. Biol. Chem.* 260, 3539-41.
- Brundage, L., Hendrick, J. P., Schiebel, E., Driessen, A. J., Wickner, W. (1990) The purified *E. coli* integral membrane protein SecY/E is sufficient for reconstitution of SecA-dependent precursor protein translocation. *Cell* 62, 649-657.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M., Short, J. M. (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5, 376-379.
- Burnell, E., van Alphen, L., Verkleij, A., de Kruijff, B. (1980) ³¹P nuclear magnetic resonance and freeze-fracture electron microscopy studies on *Escherichia coli*. I. Cytoplasmic membrane and total phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta* 597, 492-501
- Burstein, E. A., Vedenkina, N. S., Ivkova, M. N. (1973) Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules. *Photochem. Photobiol.* 18, 263-279.
- Burstein, E. A., Permyakov, E. A., Yashin, V. A., Burkhanov, S. A., Finazzi-Agrò, A. (1977) The fine structure of luminescence spectra of azurin. *Biochim. Biophys. Acta* 491, 155-159.
- Cao, G., Kuhn, A., Dalbey, R. E. (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, 866-875.

- Casadio, R., Fariselli, P., Finocchiaro, G., Martelli, P. L. (2003) Fishing new proteins in the twilight zone of genomes: the test case of outer membrane proteins in *Escherichia coli* K12, *Escherichia coli* O157:H7, and other Gram-negative bacteria. *Protein Sci.* 12, 1158-68.
- Chen, H., Bjerknes, M., Kumar, R., Jay, E. (1994) Determination of the optimal aligned spacing between the Shine-Dalgarno sequence and the translation initiation codon of *Escherichia coli* mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 22, 4953-4957.
- Chen, M., Samuelson, J. C., Jiang, F., Müller, M., Kuhn, A., Dalbey, R. E. (2002) Direct interaction of YidC with the Sec-independent Pf3 coat protein during its membrane protein insertion. *J. Biol. Chem.* 277, 7670-5.
- Chen, R. F. (1967) Fluorescence quantum yields of tryptophan and tyrosine. *Anal. Lett.* 1, 35-42.
- Chevelkov, V., Fink, U., Reiff, B. (2009) Quantitative analysis of the backbone motion in proteins using MAS solid-state NMR spectroscopy. *J. Biomol. NMR* 45, 197-206.
- Collier, D. N., Bankaitis, V. A., Weiss, J. B., Bassford, P. J. Jr. (1988) The antifolding activity of SecB promotes the export of the *E. coli* maltose-binding protein. *Cell* 53, 273-83.
- Coulter, C. B., Stone, F. M., Kabat, E. A. (1936) The structure of the ultraviolet absorption spectra of certain proteins and amino acids. *J. Gen. Physiol.* 19, 739-52.
- Datema, K. P., Visser, A. J. W. G., van Hoek, A., Wolfs, C. J. A. M., Spruijt, R. B., Hemminga, W. A. (1987) Time-resolved tryptophan fluorescence anisotropy investigation of bacteriophage M13 coat protein in micelles and mixed bilayers. *Biochemistry* 26, 6145-6152.
- de Gier, J. W., Mansournia, P., Valent, Q. A., Phillips, G. J., Lührink, J., von Heijne, G. (1996) Assembly of a cytoplasmic membrane protein in *Escherichia coli* is dependent on the signal recognition particle. *FEBS Lett.* 399, 307-9.

- de Gier, J. W., Scotti, P. A., Sääf, A., Valent, Q. A., Kuhn, A., Luirink, J., 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, 14646-51.
- de Lauder, W. B., Wahl, P. (1970) pH dependence of the fluorescence decay of tryptophan. Biochemistry 9, 2750-4.
- de Petris, S. (1967) Ultrastructure of the cell wall of *Escherichia coli* and chemical nature of its constituent layers. J. Ultrastruct. Res. 19, 45-83.
- Douville, K., Leonard, M., Brundage, L., Nishiyama, K., Tokuda, H., Mizushima, S., Wickner, W. (1994) Band 1 subunit of *Escherichia coli* preprotein translocase and integral membrane export factor P12 are the same protein. J. Biol. Chem. 269, 18705-7.
- Duggan, D. E., Udenfriend, S. (1956) The spectrophotofluorometric determination of tryptophan in plasma and of tryptophan and tyrosine in protein hydrolysates. J. Biol. Chem. 223, 313-9.
- Duong, F., Wickner, W. (1997) Distinct catalytic roles of the SecYE, SecG and SecDFyajC subunits of preprotein translocase holoenzyme. EMBO J. 16, 2756-68.
- du Plessis, D. J., Berrelkamp, G., Nouwen, N., Driessen, A. J. (2009) The lateral gate of SecYEG opens during protein translocation. J. Biol. Chem. 284, 15805-14.
- Economou, A., Wickner, W. (1994) SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. Cell 78, 835-43.
- Eftink, M. R., Ghiron, C. A. (1976) Exposure of tryptophanyl residues in proteins. Quantitative determination by fluorescence quenching studies. Biochemistry 15, 672-80.
- Eisner, G., Koch, H. G., Beck, K., Brunner, J., Müller, M. (2003) Ligand crowding at a nascent signal sequence. J. Cell. Biol. 163, 35-44.

- Facey, S. J., Neugebauer, S. A., Krauss, S., 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, 995-1004.
- Facey, S. J., Kuhn, A. (2010) Biogenesis of bacterial inner-membrane proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 2343-62.
- Finazzi-Agrò, A., Rotilio, G., Avigliano, L., Guerrieri, P., Boffi, V., Mondovì, B. (1970) Environment of copper in *Pseudomonas fluorescens* azurin: fluorometric approach. *Biochemistry* 9, 2009-14.
- Fräckowiak, D., Zelent, B., Malak, H., Planner, A., Cegielski, R., Leblanc, R. M. (1994) Fluorescence of aggregated forms of Chl a in various media. *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* 78, 49-55.
- Gallusser, A., Kuhn, A. (1990) Initial steps in protein membrane insertion. Bacteriophage M13 procoat protein binds to the membrane surface by electrostatic interaction. *EMBO J.* 9, 2723-9.
- Garavito, R. M., Markovic-Housley, Z., Jenkins, J. A. (1986) The growth and characterization of membrane protein crystals. *J. Crystal Growth* 76, 701-709.
- Gerken, U., Erhardt, D., Bär, G., Ghosh, R., Kuhn, A. (2008) Initial binding process of the membrane insertase YidC with its substrate Pf3 coat protein is reversible. *Biochemistry* 47, 6052-6058.
- Gerken, U., Imhof, N. (2010) PicoQuant Application Note: Time-resolved spectroscopy of proteins. <http://www.picoquant.com/appnotes.htm>.
- Hanada, M., Nishiyama, K. I., Mizushima, S., Tokuda, H. (1994) Reconstitution of an efficient protein translocation machinery comprising SecA and the three membrane proteins, SecY, SecE, and SecG (p12). *J. Biol. Chem.* 269, 23625-31.

- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-80.
- Hartl, F. U., Lecker, S., Schiebel, E., Hendrick, J. P., Wickner, W. (1990) The binding cascade of SecB to SecA to SecY/E mediates preprotein targeting to the *E. coli* plasma membrane. *Cell* 63, 269-79.
- Hell, K., Herrmann, J. M., Pratje, E., Neupert, W., Stuart, R. A. (1998) Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 2250-5.
- Hell, K., Neupert, W., Stuart, R. A. (2001) Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *EMBO J.* 20, 1281-8.
- Helm, M., Wölfl, S. (2007) *Instrumentelle Bioanalytik: Einführung für Biologen, Biochemiker, Biotechnologen und Pharmazeuten.* WILEY-VCH, Weinheim
- Houben, E. N., Scotti, P. A., Valent, Q. A., Brunner, J., de Gier, J. L., Oudega, B., Luirink, J. (2000) Nascent Lep inserts into the *Escherichia coli* inner membrane in the vicinity of YidC, SecY and SecA. *FEBS Lett.* 476, 229-33.
- Jiang, F., Yi, L., Moore, M., Chen, M., Rohl, T., van Wijk, K. J., de Gier, J. W., Henry, R., Dalbey, R. E. (2002) Chloroplast YidC homolog Albino3 can functionally complement the bacterial YidC depletion strain and promote membrane insertion of both bacterial and chloroplast thylakoid proteins. *J. Biol. Chem.* 277, 19281-8.
- Jiang, F., Chen, M., Yi, L., de Gier, J. W., Kuhn, A., Dalbey, R. E. (2003) Defining the regions of *Escherichia coli* YidC that contribute to activity. *J. Biol. Chem.* 278, 48965-72.
- Johnson, I. D., Hudson, B. S. (1989) Environmental modulation of M13 coat protein tryptophan fluorescence dynamics. *Biochemistry* 28, 6392-400.
- Kaneshiro, T., Marr, A. G. (1962) Phospholipids of *Azotobacter agilis*, *Agrobacterium tumefaciens*, and *Escherichia coli*. *J. Lipid Res.* 3, 184-189.

- Keenan, R. J., Freymann, D. M., Stroud, R. M., Walter, P. (2001) The signal recognition particle. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 755-75.
- Kellenberger, E., Ryter, A. (1958) Cell wall and cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4, 323-6.
- Kiefer, D., Hu, X., Dalbey, R., Kuhn, A. (1997) Negatively charged amino acid residues play an active role in orienting the Sec-independent Pf3 coat protein in the *Escherichia coli* inner membrane. *EMBO J.* 16, 2197-204.
- Kiefer, D., Kuhn, A. (1999) Hydrophobic forces drive spontaneous membrane insertion of the bacteriophage Pf3 coat protein without topological control. *EMBO J.* 18, 6299-6306.
- Kiefer, D., Kuhn, A. (2007) YidC as an essential and multifunctional component in membrane protein assembly. *Int. Rev. Cytol.* 259, 113-38.
- Klenner, C., Yuan, J., Dalbey, R. E., Kuhn, A. (2008) The Pf3 coat protein contacts TM1 and TM3 of YidC during membrane biogenesis. *FEBS Lett.* 582, 3967-72.
- Koch, H. G., Hengelage, T., Neumann-Haefelin, C., MacFarlane, J., Hoffschulte, H. K., Schimz, K. L., Mechler, B., Müller, M. (1999) *In vitro* studies with purified components reveal signal recognition particle (SRP) and SecA/SecB as constituents of two independent protein-targeting pathways of *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Cell.* 10, 2163-73.
- Koch, H. G., Müller, M. (2000) Dissecting the translocase and integrase functions of the *Escherichia coli* SecYEG translocon. *J. Cell. Biol.* 150, 689-94.
- Koch, H. G., Moser, M., Schimz, K. L., Müller, M. (2002) The integration of YidC into the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* requires the signal recognition particle, SecA and SecYEG. *J. Biol. Chem.* 277, 5715-8.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E. L. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* 305, 567-80.

- Kuhn, A., Wickner, W., Kreil, G. (1986) The cytoplasmic carboxy terminus of M13 procoat is required for the membrane insertion of its central domain. *Nature* 322, 335-339.
- 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, 267-71.
- Kuhn, A., Stuart, R., Henry, R., Dalbey, R. E. (2003) The Alb3/Oxa1/YidC protein family: membrane-localized chaperones facilitating membrane protein insertion? *Trends Cell Biol.* 13, 510-6.
- Kulinski, T., Wennerberg, A. B., Rigler, R., Provencher, S. W., Pooga, M., Langel, U., Bartfai, T. (1997) Conformational analysis of galanin using end to end distance distribution observed by Förster resonance energy transfer. *Eur. Biophys. J.* 26, 145-54.
- Kumamoto, C. A. (1989) *Escherichia coli* SecB protein associates with exported protein precursors *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5320-4.
- Kurzban, G. P., Gitlin, G., Bayer, E. A., Wilchek, M., Horowitz, P. M. (1989) Shielding of tryptophan residues of avidin by the binding of biotin. *Biochemistry* 28, 8537-8542.
- Ladokhin, A. S., Wang, L., Steggle, A. W., Holloway, P. W. (1991) Fluorescence study of a mutant cytochrome b5 with a single tryptophan in the membrane-binding domain. *Biochemistry* 30, 10200-6.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Lakowicz, J. R. (2006) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd edition, Springer, New York.
- Lessl, M., Balzer, D., Lurz, R., Waters, V. L., Guiney, D. G., Lanka, E. (1992) Dissection of IncP conjugative plasmid transfer: Definition of the transfer region Tra2 by mobilization of the Tra1 region in trans. *J. Bacteriol.* 174, 2493-2500.

- Lill, R., Dowhan, W., Wickner, W. (1990) The ATPase activity of SecA is regulated by acidic phospholipids, SecY, and the leader and mature domains of precursor proteins. *Cell* 60, 271-80.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Luiten, R. G., Schoenmakers, J. G., Konings, R. N. (1983) The major coat protein gene of the filamentous *Pseudomonas aeruginosa* phage Pf3: absence of an N-terminal leader signal sequence. *Nucleic Acids Res.* 11, 8073-85.
- MacFarlane, J., Müller, M. (1995) The functional integration of a polytopic membrane protein of *Escherichia coli* is dependent on the bacterial signal-recognition particle. *Eur. J. Biochem.* 233, 766-71.
- Matsuyama, S., Fujita, Y., Sagara, K., Mizushima, S. (1992) Overproduction, purification and characterization of SecD and SecF, integral membrane components of the protein translocation machinery of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1122, 77-84.
- Miroux, B., Walker, J. E. (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, 289-298
- Moore, M., Harrison, M. S., Peterson, E. C., Henry, R. (2000) Chloroplast Oxa1p homolog Albino3 is required for post-translational integration of the light harvesting chlorophyll-binding protein into thylakoid membranes. *J. Biol. Chem.* 275, 1529-32.
- Morise, H., Shimomura, O., Johnson, F. H., Winant, J. (1974) Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry* 13, 2656-62.
- Nagamori, S., Smirnova, I. N., Kaback, H. R. (2004) Role of YidC in folding of polytopic membrane proteins. *J. Cell. Biol.* 165, 53-62.

- Neumann-Haefelin, C., Schäfer, U., Müller, M., Koch, H. G. (2000) SRP-dependent co-translational targeting and SecA-dependent translocation analyzed as individual steps in the export of a bacterial protein. *EMBO J.* 19, 6419-26.
- Nishiyama, K., Mizushima, S., Tokuda, H. (1993) A novel membrane protein involved in protein translocation across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 12, 3409-15.
- Nishiyama, K., Hanada, M., Tokuda, H. (1994) Disruption of the gene encoding p12 (SecG) reveals the direct involvement and important function of SecG in the protein translocation of *Escherichia coli* at low temperature. *EMBO J.* 13, 3272-7.
- Nouwen, N., Driessen, A. J. (2002) SecDFyajC forms a heterotetrameric complex with YidC. *Mol. Microbiol.* 44, 1397-405.
- Oliver, D. B., Beckwith, J. (1982) Regulation of a membrane component required for protein secretion in *Escherichia coli*. *Cell* 30, 311-9.
- Oliver, D. C., Paetzel, M. (2008) Crystal structure of the major periplasmic domain of the bacterial membrane protein assembly facilitator YidC. *J. Biol. Chem.* 283, 5208-5216.
- Otto, C. M., Niagro, F., Su, X., Rawlings, C. A. (1995) Expression of recombinant feline tumor necrosis factor is toxic to *Escherichia coli*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2, 740-6.
- Petrich, J. W., Chang, M. C., McDonald, D. B., Fleming, G. R. (1983) On the origin of nonexponential fluorescence decay in tryptophan and its derivatives. *JACS* 105, 3824-3832
- Pogliano, K. J., Beckwith, J. (1994) Genetic and molecular characterization of the *Escherichia coli secD* operon and its products. *J. Bacteriol.* 176, 804-14.
- Poritz, M. A., Strub, K., Walter, P. (1988) Human SRP RNA and *E. coli* 4.5S RNA contain a highly homologous structural domain. *Cell* 55, 4-6.

- Poritz, M. A., Bernstein, H. D., Strub, K., Zopf, D., Wilhelm, H., Walter, P. (1990) An *E. coli* ribonucleoprotein containing 4.5S RNA resembles mammalian signal recognition particle. *Science* 250, 1111-7.
- Randall, L. L. (1983) Translocation of domains of nascent periplasmic proteins across the cytoplasmic membrane is independent of elongation. *Cell* 33, 231-40.
- Randall, L. L., Hardy, S. J. (1986) Correlation of competence for export with lack of tertiary structure of the mature species: a study *in vivo* of maltose-binding protein in *E. coli*. *Cell* 46, 921-8.
- Randall, L. L., Topping, T. B., Hardy, S. J. (1990) No specific recognition of leader peptide by SecB, a chaperone involved in protein export. *Science* 248, 860-3.
- Ravaud, S., Stjepanovic, G., Wild, K., 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, 9350-8.
- Ridder A. N., Morein, S., Stam, J. G., Kuhn, A., de Kruijff, B., Killian, J. A. (2000) Analysis of the role of interfacial tryptophan residues in controlling the topology of membrane proteins. *Biochemistry*. 39, 6521-8.
- Rischel, C., Thyberg, P., Rigler, F., Poulsen, F. M. (1996) Time-resolved fluorescence studies of the molten globule state of apomyoglobin. *J. Mol. Biol.* 257, 877-85.
- Rohrer, J., Kuhn, A. (1990) The function of a leader peptide in translocating charged amino acyl residues across a membrane. *Science* 250, 1418-21.
- Ruggiero, A. J., Todd, D. C., Fleming, G. R. (1990) Subpicosecond fluorescence anisotropy of tryptophan in water. *J. Am. Chem. Soc.* 112, 1003-1014.
- Sääf, A., Monné, M., de Gier, J. W., von Heijne, G. (1998) Membrane topology of the 60-kDa Oxa1p homologue from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 273, 30415-8.

- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-4.
- Samuelson, J. C., Chen, M., Jiang, F., Möller, I., Wiedmann, M., Kuhn, A., Phillips, G. J., Dalbey, R. E. (2000) YidC mediates membrane protein insertion in bacteria. *Nature* 406, 637-41.
- Samuelson, J. C., Jiang, F., Yi, L., Chen, M., de Gier, J. W., Kuhn, A., Dalbey, R. E. (2001) Function of YidC for the insertion of M13 procoat protein in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 276, 34847–34852
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Schatz, P. J., Riggs, P. D., Jacq, A., Fath, M. J., Beckwith, J. (1989) The secE gene encodes an integral membrane protein required for protein export in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 3, 1035-44.
- Schechter, A. N., Chen, R. F., Anfinsen, C. B. (1970) Kinetics of folding of staphylococcal nuclease. *Science* 167, 886-7.
- Schiebel, E., Driessen, A. J., Hartl, F. U., Wickner, W. (1991) $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ and ATP function at different steps of the catalytic cycle of preprotein translocase. *Cell* 64, 927-39.
- Scotti, P. A., Valent, Q. A., Manting, E. H., Urbanus, M. L., Driessen, A. J., Oudega, B., Luirink, J. (1999) SecA is not required for signal recognition particle-mediated targeting and initial membrane insertion of a nascent inner membrane protein. *J. Biol. Chem.* 274, 29883-8.
- Scotti, P. A., Urbanus, M. L., Brunner, J., de Gier, J. W., von Heijne, G., van der Does, C., Driessen, A. J., Oudega, B., Luirink, J. (2000) YidC, the *Escherichia coli* homologue of mitochondrial Oxa1p, is a component of the Sec translocase. *EMBO J.* 19, 542-9.

- Seluanov, A., Bibi, E. (1997) FtsY, the prokaryotic signal recognition particle receptor homologue, is essential for biogenesis of membrane proteins. *J. Biol. Chem.* 272, 2053-5.
- Serek, J., Bauer-Manz, G., Struhalla, G., van den Berg, L., Kiefer, D., Dalbey, R. E., Kuhn, A. (2004) *Escherichia coli* YidC is a membrane insertase for Sec-independent proteins. *EMBO J.* 23, 295-301.
- Shimomura, O., Johnson, F. H., Saiga, Y. (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 59, 223-39.
- Shine, J., Dalgarno, L. (1974) The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: Complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 1342-1346.
- Shore, V. G., Pardee, A. B. (1956) Fluorescence of some proteins, nucleic acids and related compounds. *Arch. Biochem. Biophys.* 60, 100-7.
- Stanisich, V. A. (1974) The properties and host range of male-specific bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.* 84, 332-342.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., Dubendorff, J. W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185, 60-89.
- Sundberg, E., Slagter, J. G., Fridborg, I., Cleary, S. P., Robinson, C., 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, 717-30.
- Szabo, A. G., Rayner, D. M. (1980) Fluorescence decay of tryptophan conformers in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* 102, 554-563.

- Tabor, S., Richardson, C. C. (1985) A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1074-8.
- Teale, F. W., Weber, G. (1957) Ultraviolet fluorescence of the aromatic amino acids. Biochem. J. 65, 476-82.
- Teale, F. W. (1960) The ultraviolet fluorescence of proteins in neutral solution. Biochem. J. 76, 381-8.
- Thomas, G. J. Jr., Prescott, B., Day, L. A. (1983) Structure similarity, difference and variability in the filamentous viruses fd, If1, IKE, Pfl and Xf. Investigation by laser Raman spectroscopy. J. Mol. Biol. 165, 321-56.
- Thomas, J. D., Daniel, R. A., Errington, J., Robinson, C. (2001) Export of active green fluorescent protein to the periplasm by the twin-arginine translocase (Tat) pathway in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 39, 47-53.
- Topping, T. B., Randall, L. L. (1994) Determination of the binding frame within a physiological ligand for the chaperone SecB. Protein Sci. 3, 730-6.
- Turoverov, K. K., Kuznetsova, I. M., Zaitsev, V. N. (1985) The environment of the tryptophan residue in *Pseudomonas aeruginosa* azurin and its fluorescence properties. Biophys. Chem. 23, 79-89.
- Turoverov, K. K., Kuznetsova, I. M. (1986) What causes the depolarization of trypsin and trypsinogen fluorescence. Intramolecular mobility or non-radiative energy transfer? Biophys. Chem. 25, 315-23.
- Ulbrandt, N. D., Newitt, J. A., Bernstein, H. D. (1997) The *E. coli* signal recognition particle is required for the insertion of a subset of inner membrane proteins. Cell 88, 187-96.

- Urbanus, M. L., Fröderberg, L., Drew, D., Björk, P., de Gier, J. W., Brunner, J., Oudega, B., Luirink, J. (2002) Targeting, insertion, and localization of *Escherichia coli* YidC. *J. Biol. Chem.* 277, 12718-23.
- Valent, Q. A., de Gier, J. W., von Heijne, G., Kendall, D. A., ten Hagen-Jongman, C. M., Oudega, B., Luirink, J. (1997) Nascent membrane and presecretory proteins synthesized in *Escherichia coli* associate with signal recognition particle and trigger factor. *Mol. Microbiol.* 25, 53-64.
- Valent, Q. A., Scotti, P. A., High, S., de Gier, J. W., von Heijne, G., Lentzen, G., Wintermeyer, W., Oudega, B., Luirink, J. (1998) The *Escherichia coli* SRP and SecB targeting pathways converge at the translocon. *EMBO J.* 17, 2504-12.
- Valeur, B., Weber, G. (1977) Resolution of the fluorescence excitation spectrum of indole into the 1L_a and 1L_b excitation bands. *Photochem. Photobiol.* 25, 441-4.
- van Bloois, E., Jan Haan, G., de Gier, J. W., Oudega, B., Luirink, J. (2004) F_1F_0 ATP synthase subunit c is targeted by the SRP to YidC in the *E. coli* inner membrane. *FEBS Lett.* 576, 97-100.
- van den Berg, B., Clemons, W. M. Jr., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S. C., Rapoport, T. A. (2004) X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* 427, 36-44.
- van der Laan, M., Bechtluft, P., Kol, S., Nouwen, N., Driessen, A. J. (2004) F_1F_0 ATP synthase subunit c is a substrate of the novel YidC pathway for membrane protein biogenesis. *J. Cell Biol.* 165, 213-22.
- van Riel, M., Kleinen Hammans, J., van de Ven, M., Verwer, W., Levine, Y. K. (1983) Fluorescence excitation profiles of beta-carotene in solution and in lipid/water mixtures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113, 102-7.
- Vimberg, V., Tats, A., Remm, M., Tenson, T. (2007) Translation initiation region sequence preferences in *Escherichia coli*. *BMC Mol. Biol.* 8, 100.

- Vogel, H., Nilsson, L., Rigler, R., Voges, K. P., Jung, G. (1988) Structural fluctuations of a helical polypeptide traversing a lipid bilayer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5067-71.
- von Heijne, G. (1990) The signal peptide. *J. Membr. Biol.* 115, 195-201.
- Ward, F. W. (1923) The absorption spectra of some amino acids: the possible ring structure of cystine. *Biochem. J.* 17, 898-902.
- Winterfeld, S., Imhof, N., Roos, T., Bär, G., Kuhn, A., Gerken, U. (2009) Substrate-induced conformational change of the *Escherichia coli* membrane insertase YidC. *Biochemistry* 48, 6684-6691.
- Xie, K., Kiefer, D., Nagler, G., Dalbey, R. E., 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. *Biochemistry* 45, 13401-13408
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-19.
- Yenugu, S., Hamil, K. G., French, F. S., Hall, S. H. (2004) Antimicrobial actions of the human epididymis 2 (HE2) protein isoforms, HE2alpha, HE2beta1 and HE2beta2. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2, 61.
- Yuan, J., Phillips, G. J., Dalbey, R. E. (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, 8961-72.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Ala	Alanin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Ara	Arabinose
Arg	Arginin
AS	Aminosäuren
Asn	Asparagin
ATP	Adenosintri-phosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
cm	Zentimeter
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
Cys	Cystein
dATP	Desoxyadenosintri-phosphat
dCTP	Desoxycytosintri-phosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleotidtri-phosphat, z. B. ddATP
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
dGTP	Desoxyguanidintri-phosphat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
d. h.	das heißt
dNTP	Desoxyribonukleotidphosphat, z. B. dATP
dTTP	Desoxythymidinphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease

DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Enhanced Chemiluminescence, verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et aliter</i> ; und andere
EtOH	Ethanol
FWHM	full width at half maximum, Breite des Spektrums auf halber Höhe der maximalen Intensität
G	Guanin
g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
g	Gramm
GFP	Green-Fluorescent-Protein
Glc	Glukose
Gln	Glutamin
GTP	Guanosintriphosphat
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure/Chlorwasserstoff
His	Histidin
Ile	Isoleucin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
K_D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
KAc	Kaliumacetat
l	Liter
LB	Luria-Bertani
Leu	Leucin
Lys	Lysin
M	Mol (Mol/l)
mA	Milliampere
mcs	multiple cloning site, multiple Klonierungsstelle

Met	Methionin
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mPa·s	Millipascalsekunde
NATA	N-Acetyl-L-tryptophanamid
NATE	N-Acetyl-L-tryptophanethylester
nm	Nanometer
ns	Nanosekunde(n)
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
P	Pellet
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
Phe	Phenylalanin
pmol	picomol
PPO	2,5-Diphenyloxazol
Pro	Prolin
ps	Pikosekunde(n)
psi	pounds per square inch
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SRP	Signal-Erkennungs-Partikel
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	tris buffered saline, trisgepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure

TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin
Thr	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
Val	Valin
v/v	volume/volume, Volumen/Volumen
w/v	weight/volume, Gewicht/Volumen
z. B.	zum Beispiel
μCi	Mikro-Curie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
λ	Wellenlänge Lambda (nm)

DNA-Sequenz von YidC

MetAspSerGln ArgAsnLeu LeuValIle AlaLeuLeuPhe ValSerPhe MetIleTrp
 1 ATGGATTTCG AACGCAATCT TTTAGTCATC GCTTTGCTGT TCGTGTCTTT CATGATCTGG
 TACCTAAGCG TTGCGTTAGA AAATCAGTAG CGAAACGACA AGCACAGAAA GTACTAGACC

 GlnAlaTrpGlu GlnAspLys AsnProGln ProGlnAlaGln GlnThrThr GlnThrThr
 61 CAAGCCTGGG AGCAGGATAA AAACCCGCAA CCTCAGGCC AACAGACCAC GCAGACAACG
 GTTCGGACCC TCGTCCTATT TTTGGGCGTT GGAGTCCGGG TTGTCTGGTG CGTCTGTTGC

 ThrThrAlaAla GlySerAla AlaAspGln GlyValProAla SerGlyGln GlyLysLeu
 121 ACCACCGCAG CGGGTAGCGC CGCCGACCAG GGCGTACCGG CCAGTGGCCA GGGGAAACTG
 TGGTGGCGTC GCCCATCGCG GCGGCTGGTC CCGCATGGCC GGTACCCGGT CCCCTTTGAC

 IleSerValLys ThrAspVal LeuAspLeu ThrIleAsnThr ArgGlyGly AspValGlu
 181 ATCTCGGTTA AGACCGACGT GCTTGATCTG ACCATCAACA CCCGTGGGGG TGATGTTGAG
 TAGAGCCAAT TCTGGCTGCA CGAACTAGAC TGGTAGTTGT GGGCACCCCC ACTACAACCT

 GlnAlaLeuLeu ProAlaTyr ProLysGlu LeuAsnSerThr GlnProPhe GlnLeuLeu
 241 CAAGCCCTGC TGCCTGCTTA CCCGAAAGAG CTGAACTCTA CCCAGCCGTT CCAGCTGTTG
 GTTCGGGACG ACGGACGAAT GGGCTTTTCT GACTTGAGAT GGGTCGGCAA GGTFCGACAAC

 GluThrSerPro GlnPheIle TyrGlnAla GlnSerGlyLeu ThrGlyArg AspGlyPro
 301 GAAACTTCAC CGCAGTTTAT TTATCAGGCA CAGAGCGGTC TGACCGGTCG TGATGGCCCCG
 CTTTGAAGTG GCGTCAAATA AATAGTCCGT GTCTCGCCAG ACTGGCCAGC ACTACCGGGC

 AspAsnProAla AsnGlyPro ArgProLeu TyrAsnValGlu LysAspAla TyrValLeu
 361 GATAACCCGG CTAACGGCCC GCGTCCGCTG TATAACGTTG AAAAAGACGC TTATGTGCTG
 CTATTGGGCC GATTGCCGGG CGCAGGCGAC ATATTGCAAC TTTTCTGCG AATACACGAC

 AlaGluGlyGln AsnGluLeu GlnValPro MetThrTyrThr AspAlaAla GlyAsnThr
 421 GCTGAAGGTC AAAACGAACT GCAGGTGCCG ATGACGTATA CCGACGCGGC AGGCAACACG
 CGACTTCCAG TTTTGCTTGA CGTCCACGGC TACTGCATAT GGCTGCGCCG TCCGTTGTGC

 PheThrLysThr PheValLeu LysArgGly AspTyrAlaVal AsnValAsn TyrAsnVal
 481 TTTACCAAAA CGTTTGTCTT GAAACGTGGT GATTACGCTG TCAACGTCAA CTACAACGTG
 AAATGGTTTT GCAAACAGGA CTTTGCACCA CTAATGCGAC AGTTGCAGTT GATGTTGCAC

 GlnAsnAlaGly GluLysPro LeuGluIle SerThrPheGly GlnLeuLys GlnSerIle
 541 CAGAACGCTG GCGAGAAACC GCTGGAAATC TCCACCTTTG GTCAGTTGAA GCAATCCATC
 GTCTTGCGAC CGCTCTTTGG CGACCTTTAG AGGTGGAAAC CAGTCAACTT CGTTAGGTAG

 ThrLeuProPro HisLeuAsp ThrGlySer SerAsnPheAla LeuHisThr PheArgGly
 601 ACTCTGCCAC CGCATCTCGA TACCGGAAGC AGCAACTTCG CACTGCACAC CTTCCGTGGC
 TGAGACGGTG GCGTAGAGCT ATGGCCTTCG TCGTTGAAGC GTGACGTGTG GAAGGCACCC

 AlaAlaTyrSer ThrProAsp GluLysTyr GluLysTyrLys PheAspThr IleAlaAsp
 661 GCGGCGTACT CCACGCCTGA CGAGAAGTAT GAGAAATACA AGTTCGATAC CATTGCCGAT
 CGCCGCATGA GGTGCGGACT GCTCTTCATA CTCTTTATGT TCAAGCTATG GTAACGGCTA

 AsnGluAsnLeu AsnIleSer SerLysGly GlyTrpValAla MetLeuGln GlnTyrPhe
 721 AACGAAAACC TGAACATCTC TTCGAAAGGT GGTTGGGTGG CGATGCTGCA ACAGTATTTT
 TTGCTTTTGG ACTTGTAGAG AAGCTTTCCA CCAACCCACC GCTACGACGT TGTCATAAAG

 AlaThrAlaTrp IleProHis AsnAspGly ThrAsnAsnPhe TyrThrAla AsnLeuGly
 781 GCGACGGCGT GGATCCCGCA TAACGACGGT ACCAACAACT TCTATACCGC TAATCTGGGT
 CGCTGCCGCA CCTAGGGCGT ATTGCTGCCA TGGTTGTTGA AGATATGGCG ATTAGACCCA

AsnGlyIleAla AlaIleGly TyrLysSer GlnProValLeu ValGlnPro GlyGlnThr
841 AACGGCATCG CCGCTATCGG CTATAAATCT CAGCCGGTAC TGGTTCAGCC TGGTCAGACT
TTGCCGTAGC GGCGATAGCC GATATTTAGA GTCGGCCATG ACCAAGTCGG ACCAGTCTGA

GlyAlaMetAsn SerThrLeu TrpValGly ProGluIleGln AspLysMet AlaAlaVal
901 GGCGCGATGA ACAGCACCTT GTGGGTTGGC CCGGAAATCC AGGACAAAAT GGCAGCTGTT
CCGCGCTACT TGTCGTGGGA CACCCAACCG GGCCTTTAGG TCCTGTTTTA CCGTCGACAA

AlaProHisLeu AspLeuThr ValAspTyr GlyTrpLeuTrp PheIleSer GlnProLeu
961 GCTCCGCACC TGGATCTGAC CGTTGATTAC GGTGTTGTTGT GGTTCATCTC TCAGCCGCTG
CGAGGCGTGG ACCTAGACTG GCAACTAATG CCAACCAACA CCAAGTAGAG AGTCGGCGAC

PheLysLeuLeu LysTrpIle HisSerPhe ValGlyAsnTrp GlyPheSer IleIleIle
1021 TTCAAACCTGC TGAAATGGAT CCATAGCTTT GTGGGTAAC TGGGCTTCTC CATTATCATC
AAGTTTGACG ACTTTACCTA GGTATCGAAA CACCCATTGA CCCCGAAGAG GTAATAGTAG

IleThrPheIle ValArgGly IleMetTyr ProLeuThrLys AlaGlnTyr ThrSerMet
1081 ATCACCTTTA TCGTTCGTGG CATCATGTAC CCGCTGACCA AAGCGCAGTA CACCTCCATG
TAGTGGAAT AGCAAGCACC GTAGTACATG GCGGACTGGT TTCGCGTCAT GTGGAGTAC

AlaLysMetArg MetLeuGln ProLysIle GlnAlaMetArg GluArgLeu GlyAspAsp
1141 GCGAAGATGC GTATGTTGCA GCCGAAGATT CAGGCAATGC GTGAGCGTCT GGGCGATGAC
CGCTTCTACG CATAACAACGT CGGCTTCTAA GTCCGTTACG CACTCGCAGA CCCGCTACTG

LysGlnArgIle SerGlnGlu MetMetAla LeuTyrLysAla GluLysVal AsnProLeu
1201 AAACAGCGTA TCAGCCAGGA AATGATGGCG CTGTACAAAG CTGAGAAGGT TAACCCGCTG
TTTGTGCGAT AGTCGGTCTT TACTACCGC GACATGTTTC GACTCTTCCA ATTGGGCGAC

GlyGlyCysPhe ProLeuLeu IleGlnMet ProIlePheLeu AlaLeuTyr TyrMetLeu
1261 GGCGGCTGCT TCCCGCTGCT GATCCAGATG CCAATCTTCC TGGCGTTGTA CTACATGCTG
CCGCCGACGA AGGGCGACGA CTAGGTCTAC GGTTAGAAGG ACCGCAACAT GATGTACGAC

MetGlySerVal GluLeuArg GlnAlaPro PheAlaLeuTrp IleHisAsp LeuSerAla
1321 ATGGGTTCCG TTGAACTGCG TCAGGCACCG TTTGCACTGT GGATCCACGA CCTGTCCGCA
TACCCAAGGC AACTTGACGC AGTCCGTGGC AAACGTGACA CCTAGGTGCT GGACAGCCGT

GlnAspProTyr TyrIleLeu ProIleLeu MetGlyValThr MetPhePhe IleGlnLys
1381 CAGGACCCGT ACTACATCCT GCCGATCCTG ATGGGCGTAA CGATGTTCTT CATTGAGAAG
GTCCTGGGCA TGATGTAGGA CGGCTAGGAC TACCCGCATT GCTACAAGAA GTAAGTCTTC

MetSerProThr ThrValThr AspProMet GlnGlnLysIle MetThrPhe MetProVal
1441 ATGTCGCCGA CCACAGTGAC CGACCCGATG CAGCAGAAGA TCATGACCTT TATGCCGGTC
TACAGCGGCT GGTGTCACTG GCTGGGCTAC GTCGTCTTCT AGTACTGGAA ATACGGCCAG

IlePheThrVal PhePheLeu TrpPhePro SerGlyLeuVal LeuTyrTyr IleValSer
1501 ATCTTCACCG TGTTCTTCCT GTGGTTCCCG TCAGGTCTGG TGCTGTACTA TATCGTCAGC
TAGAAGTGGC ACAAGAAGGA CACCAAGGGC AGTCCAGACC ACGACATGAT ATAGCAGTGC

AsnLeuValThr IleIleGln GlnGlnLeu IleTyrArgGly LeuGluLys ArgGlyLeu
1561 AACCTGGTAA CCATTATTCA GCAGCAGCTG ATTTACCGTG GTCTGGAAAA ACGTGGCCTG
TTGGACCATT GGTAATAAGT CGTCGTCGAC TAAATGGCAC CAGACCTTTT TGCACCGGAC

HisSerArgGlu LysLysLys Ser***
1621 CATAGCCGCG AGAAGAAAAA ATCCTGA
GTATCGGCGC TCTTCTTTTT TAGGACT

Publikationen

Imhof, N., Kuhn, A., Gerken, U. (2011) Substrate-dependent conformational dynamics of the *Escherichia coli* membrane insertase YidC. *Biochemistry* 50, 3229-3239.

Gerken, U., Imhof, N. (2010) PicoQuant Application Note: Time-resolved spectroscopy of proteins. <http://www.picoquant.com/appnotes.htm>.

Winterfeld, S., Imhof, N., Roos, T., Bär, G., Kuhn, A., Gerken, U. (2009) Substrate-induced conformational change of the *Escherichia coli* membrane insertase YidC. *Biochemistry* 48, 6684-6691.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Andreas Kuhn für die Überlassung des interessanten Themas, die gewährte Freizügigkeit bei der Bearbeitung und das Korrekturlesen bedanken. Die Betreuung und Diskussionen sowie Ratschläge waren stets hilfreich.

Herrn Prof. Dr. Ralf Kölling-Paternoga danke ich sehr für die Übernahme des Koreferates.

Ein großes Dankeschön geht an Dr. Uwe Gerken für das gemeinsame Arbeiten am Fluorolog und Life-time Spektrometer, für die Hilfe bei der Datenbearbeitung sowie das Korrekturlesen des physikalischen Teils dieser Arbeit.

Danke an Susanne Krauss und Gisela Nagler, von denen ich ab und zu kompetente Zellen stibitzen durfte, sowie an Gerda Bär für die Reinigung von Pf3W0 coat.

Bei Susanne Meyer, Anika Schönbauer und Natalie Stiegler bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme in den Anfangstagen der Laborzeit. Den Labor-Damen danke ich für die netten Mädels-Abende.

Allen namentlich nicht genannten Kolleginnen und Kollegen danke ich für die Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft.

Stella Neugebauer danke ich für das angenehme, freundschaftliche, hilfreiche und vor allem unkomplizierte Beisammensein in „unserem“ Labor. Du bist die beste „Labor-Tante“ und es war toll auch nach der Arbeit und an so manchem Wochenende mit dir etwas zu unternehmen.

Tobias Quinten danke ich zutiefst für den allerbesten Rückhalt, den man sich vorstellen kann, die vielen hilfreichen Gespräche, die Aufmunterung, wenn mal wieder kein Ziel in Sicht war und für die Kommata. Ein Glück, dass es dich gibt!

Meinen Eltern – den weltbesten – danke ich für die stete Unterstützung in allem.