

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	1
1	Der generelle, essentielle Sekretionsweg (Sec-Weg)	2
1.1	Die Sec-Signalsequenz	2
1.2	Die Sec-Translokase	3
1.3	SecB- und b-SRP-abhängiges Targeting	4
1.4	Der Mechanismus der Sec-abhängigen Proteintranslokation	5
1.5	Die <i>prl</i> -Mutationen der <i>sec</i> -Gene	5
2	Der Tat- („twin-arginine translocation“) Weg	6
2.1	Die Substrate des Tat-Weges	6
2.1.1	Die Tat-Signalsequenz	6
2.1.1.1	Das Zwillingsarginin-Konsensus-Motiv (S/T-R-R-x-F-L-K)	7
2.1.1.2	Die Hydrophobizität der h-Region	8
2.1.1.3	Positiv geladene Aminosäuren in der c-Region	8
2.1.2	Der reife Teil von Tat-Substraten	9
2.1.2.1	Der Tat-abhängige Proteinexport besitzt „proofreading“-Eigenschaften	10
2.2	Der Tat-Exportapparat	11
2.2.1	Die <i>tat</i> -Gene und die Komponenten des Tat-Apparates	11
2.2.1.1	Die Topologie der Tat-Translokase-Untereinheiten	12
2.2.1.2	Die Struktur der Tat-Translokase und die Funktionen ihrer Untereinheiten	13
2.2.1.3	Modelle zum Mechanismus der Tat-abhängigen Proteintranslokation	15
2.2.1.4	Die Energetisierung des Tat-Weges	16
3	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	16
II	Material und Methoden	19
1	Chemikalien und Enzyme	19
2	Bakterienstämme, Plasmide, Phagen und Oligonukleotide	19
3	Mikrobiologische Methoden	22
3.1	Kultivierung von Bakterien	22
3.1.1	Nährmedien	22
3.1.2	Kultivierungsbedingungen	23
3.2	Stammhaltung	23
3.3	Transformation von <i>E. coli</i> -Stämmen	23
3.3.1	Transformation von <i>E. coli</i> -Stämmen (Hanahan, 1983)	23
3.3.2	Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation (Dower <i>et al.</i> , 1988, verändert)	24

4	Molekularbiologische Methoden	25
4.1	Isolierung von Plasmid-DNA und chromosomaler DNA	25
4.2	Allgemeine molekularbiologische Methoden	25
4.2.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	25
4.2.2	Entsalzen von Plasmid-DNA	25
4.2.3	Agarose-Gelelektrophorese	25
4.2.4	Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen	26
4.2.5	Behandlung mit alkalischer Phosphatase	26
4.2.6	Ligation von DNA-Fragmenten	26
4.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	26
4.4	Nicht radioaktive DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode	27
5	Mutagenesen	27
5.1	Ortsgerichtete Mutagenese	27
5.2	Chemische <i>in vitro</i> -Mutagenese Plasmid-kodierter <i>tat</i> -Gene von <i>E. coli</i> mit Hydroxylamin (Humphreys <i>et al.</i> , 1976, modifiziert)	28
5.3	Chemische <i>in vivo</i> -Mutagenese Plasmid-kodierter <i>tat</i> -Gene von <i>E. coli</i> mit 2-Aminopurin und 5-Azacytidin	28
5.4	Transposon-Mutagenese von <i>E. coli</i> mit Tn5 <i>phoA</i> -1 (Gutierrez <i>et al.</i> , 1987)	29
5.4.1	Herstellung eines λ :Tn5 <i>phoA</i> -1-Lysates	29
5.4.2	Transposon-Mutagenese	29
5.4.3	Identifizierung des Transposon-Insertionsortes	30
6	Proteinchemische Methoden	30
6.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, Laemmli, 1970)	30
6.2	„Western Blot“-Analyse	31
6.2.1	Herstellung von Peptid-Antisera zum Nachweis der Proteine TatA und TatB aus <i>E. coli</i>	32
6.3	Osmotischer Schock mit <i>E. coli</i>	32
6.4	Isolierung von <i>E. coli</i> -Membranen	33
III	Ergebnisse	35
1	Das TorAMalE-Fusionsprotein als Reporter für den Tat-abhängigen Proteinexport in <i>E. coli</i>	35
2	Das TorAMalE-System ist zur Identifizierung von Tat-Mutanten geeignet	36
2.1	Potentielle Tat-Mutanten lassen sich mit Hilfe des TorAMalE-Systems klassifizieren	37
2.2	Die Existenz weiterer, essentieller <i>tat</i> -Gene in <i>E. coli</i> ist unwahrscheinlich	38
2.3	Zusammenfassung	40
3	Die Erkennung von Tat-Substraten durch die Tat-Translokase	41
3.1	Experimenteller Ansatz zur Untersuchung der Substrat-Erkennung durch die Tat-Translokase in <i>E. coli</i>	41

3.2 Konstruktion eines im Tat-Wildtyp exportdefekten Reporterproteins durch ortsgerichtete Mutagenese	42
3.2.1 Ein Austausch des Zwillingsarginins in der TorA-Signalsequenz zu einem Doppel-Lysin bewirkt keinen Exportblock der TorA(KK)MalE-Variante	43
3.2.2 Die Varianten TorA(KQ)MalE und TorA(DD)MalE werden im <i>E. coli</i> Tat-Wildtyp nicht exportiert	45
3.3 Zusammenfassung	48
3.4 Isolierung von Plasmid-gekoppelten Tat-Mutanten („2nd site“-Suppressoren)	49
3.5 Charakterisierung der isolierten Tat-Mutanten	51
3.5.1 Vergleich der Tat-Proteinmengen mittels Antiseren gegen TatA, TatB und TatC	52
3.5.2 Die isolierten Tat-Mutanten vermitteln den Export der Modell-Substrate TorAMalE und TorA(KQ)MalE	54
3.5.2.1 Der Phänotyp der isolierten Tat-Mutanten lässt einen Export sowohl von TorA(KQ)MalE als auch des unveränderten TorAMalE-Reporters erkennen	54
3.5.2.2 Wachstumskurven in Maltose-Minimalmedium ermöglichen bei Überexpression der <i>tat</i> -Gene eine qualitative Abschätzung des Exportverhaltens	57
3.5.2.3 Die unterschiedlich starke Suppression der KQ-Mutation durch die Plasmid-gekoppelten Tat-Mutanten wird auf Proteinebene bestätigt	61
3.5.2.4 Der Export des unveränderten TorAMalE-Fusionsproteins durch die Tat-Mutanten ist auch auf Proteinebene erkennbar	64
3.6 Zusammenfassung	67
4 Untersuchungen zur Funktion einer „Minimal-Translokase“ aus TatA und TatC in <i>E. coli</i>	68
4.1 Ist das TatB-Protein in <i>E. coli</i> essentiell?	68
4.1.1 Klonierung eines Plasmid-kodierten <i>E. coli</i> <i>tatAC</i> -Operons	68
4.1.2 Das TatB-Protein ist keine essentielle Untereinheit der Tat-Translokase in <i>E. coli</i>	69
4.2 Zusammenfassung	71
4.3 Isolierung von Plasmid-gekoppelten TatAC-Mutanten	71
4.4 Charakterisierung der isolierten TatAC-Mutanten	73
4.4.1 Vergleich der Tat-Proteinmengen mittels Antiseren gegen TatA und TatC	73
4.4.2 Die isolierten TatAC-Mutanten zeigen einen verbesserten Export des TorAMalE-Fusionsproteins	75
4.4.2.1 Der Phänotyp der TatAC-Mutanten lässt eine je nach Mutation unterschiedlich starke Verbesserung des Tat-abhängigen Proteinexportes erkennen	75
4.4.2.2 Die unterschiedliche Export-Effizienz in den TatAC-Mutanten lässt sich mit Hilfe von Wachstumskurven in Maltose-Minimalmedium qualitativ abschätzen	77
4.4.2.3 Die höhere Effizienz des Tat-Weges in den Plasmid-gekoppelten TatAC-Mutanten wird auf Proteinebene bestätigt	78
4.5 Zusammenfassung	80

IV	Diskussion	81
1	Die Existenz weiterer <i>tat</i> -Gene in <i>E. coli</i> ist sehr unwahrscheinlich	81
1.1	Untersuchungen zur Existenz bislang unbekannter Tat-Komponenten in <i>E. coli</i>	81
1.1.1	Die Ergebnisse der Transposon-Mutagenese sprechen gegen die Existenz bislang unbekannter <i>tat</i> -Gene in <i>E. coli</i>	81
2	Das TorAMaIE-System ermöglicht im Vergleich zu anderen Tat-Modellsubstraten oder -Reporterproteinen auch die Untersuchung von Exportvorgängen mit verringerter Effizienz	86
2.1	Das Zwillingsarginin in Tat-Signalsequenzen ist für das Targeting zur Tat-Translokase nicht absolut essentiell	86
2.2	TorAMaIE im Vergleich mit anderen Reporterproteinen zur Analyse des Tat-abhängigen Proteinexportes in <i>E. coli</i>	88
3	Untersuchungen zur Erkennung von Tat-Substraten durch die Tat-Translokase in <i>E. coli</i>	90
3.1	Charakterisierung der Tat-Mutanten, welche den Exportdefekt von TorA(KQ)MaIE supprimieren	91
3.1.1	Aminosäure-Austausche in den N-Termini von TatB und TatC supprimieren den Exportdefekt von TorA(KQ)MaIE	91
3.1.1.1	Die TatB- und TatC-Mutanten supprimieren den Exportdefekt von TorA(KQ)MaIE mit unterschiedlicher Effizienz	93
3.1.1.2	Das Zwillingsarginin in Tat-Signalsequenzen wird nicht direkt über die Arginin-Seitenketten erkannt, sondern ist vermutlich Bestandteil eines strukturellen Erkennungs-Signals	96
4	Untersuchungen zur Funktion einer „Minimal-Translokase“ aus TatA und TatC in <i>E. coli</i>	99
4.1	Das TatB-Protein ist keine essentielle Untereinheit der Tat-Translokase in <i>E. coli</i>	99
4.2	Bifunktionelle TatA-Muteine übernehmen die „Bindeglied“-Funktion von TatB, so dass aus einem TatABC(E)-Apparat ein TatAC-System entsteht	100
V	Zusammenfassung	105
VI	Literatur	107