



## Untersuchungen zur Membranintegrität während der Tat-abhängigen Proteintranslokation in *Escherichia coli*

Stefan Fleckenstein

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

# Untersuchungen zur Membranintegrität während der Tat-abhängigen Proteintranslokation in *Escherichia coli*

Stefan Fleckenstein

Schriften des Forschungszentrums Jülich  
Reihe Gesundheit / Health

Band / Volume 60

---

ISSN 1866-1785

ISBN 978-3-89336-841-9

**INHALTSVERZEICHNIS:**

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
<b>3.1</b>	<b>Der Sec-Weg</b>	<b>5</b>
<b>3.2</b>	<b>Der Tat-Weg</b>	<b>7</b>
3.2.1	Charakteristische Eigenschaften von Tat-Signalpeptiden	7
3.2.2	Tat-abhängig translozierte Substrate	10
3.2.3	Ausschluss ungefalteter Proteine von der Tat-Translokation	10
3.2.4	Interaktion von Tat-Substraten mit spezifischen und allgemeinen Chaperonen	11
3.2.5	Energetisierung des Tat -Weges	12
3.2.6	Komponenten der Tat-Translokase	13
3.2.7	Stöchiometrie der Tat-Komponenten	17
3.2.8	Interaktionen zwischen den Tat-Komponenten	18
3.2.9	Prozess der Tat-abhängigen Proteintranslokation	19
<b>3.3</b>	<b>Genetische Untersuchung von Interaktionen zwischen Substrat und Translokase</b>	<b>24</b>
<b>3.4</b>	<b>Zielsetzung dieser Arbeit</b>	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>29</b>
<b>4.1</b>	<b>Chemikalien und Enzyme</b>	<b>29</b>
<b>4.2</b>	<b>Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide</b>	<b>29</b>
4.2.1	Bakterienstämme	29
4.2.2	Plasmide	30
4.2.3	Oligonukleotide	34
<b>4.3</b>	<b>Mikrobiologische Methoden</b>	<b>35</b>
4.3.1	Nährmedien	35
4.3.2	Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung	36
<b>4.4</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>37</b>

4.4.1	Präparation von Plasmid-DNA	37
4.4.2	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	37
4.4.3	Dephosphorylierung von DNA mittels alkalischer Phosphatase	38
4.4.4	Konzentrationsbestimmung von DNA mittels Gelabschätzung	38
4.4.5	Fällung von DNA aus wässriger Lösung	38
4.4.6	Ligation von DNA-Fragmenten	38
4.4.7	Agarosegelelektrophorese	39
4.4.8	Aufreinigung von DNA	39
4.4.9	Amplifikation von DNA mittels PCR (Polymerasekettenreaktion)	39
4.4.10	Transformation von <i>E. coli</i>	40
4.4.11	Sequenzierung von DNA	40
4.4.12	Ortsgerichtete Mutagenese	41
4.4.13	Ungerichtete Mutagenese von DNA-Fragmenten durch „error-prone“-PCR	41
4.4.14	Generierung TatA-gekoppelter L9P-Suppressortranslokasen	42
<b>4.5</b>	<b>Biochemische und proteinchemische Methoden</b>	<b>42</b>
4.5.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, variiert nach Lämmli, 1970)	42
4.5.2	Färbung von SDS-Gelen	43
4.5.3	Western-Blot	44
4.5.4	Präparation von <i>E. coli</i> -Membranen	45
4.5.5	Fraktionierung von <i>E. coli</i> -Zellen mittels EDTA-Sphäroblastierung	45
4.5.6	Bestimmung der intrazellulären ATP-Konzentration	46
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>47</b>
<b>5.1</b>	<b>Untersuchung der Ursache des neuartigen Phänotyps des Stammes GSJ101 [<math>\Delta</math>tat] mit der Kombination des Reporterproteins TorA-MalE und der Tat-Translokase TatAB(L9P)C auf McM</b>	<b>48</b>
5.1.1	Die Kombination des Reporterproteins TorA-MalE mit der Tat-Translokase TatAB(L9P)C hat einen wachstumsinhibierenden Effekt auf den Stamm GSJ101	49
5.1.2	Die Kombination des Reporterproteins TorA-MalE mit der Tat-Translokase TatAB(L9P)C bewirkt eine Abnahme der PMF über der Membran	51
5.1.3	Die Kombination des Reporterproteins TorA-MalE mit der Tat-Translokase TatAB(L9P)C resultiert in einer Reduktion der intrazellulären ATP-Konzentration	54
5.1.4	Die Tat-Translokase TatAB(L9P)C kann sowohl das artifizielle Reporterprotein TorA-MalE als auch native Tat-Substrate ins Periplasma translozieren	55

---

<b>5.2</b>	<b>Untersuchung des Einflusses der Kombination aus Reporterprotein TorA-MalE und Wildtyp-Tat-Translokase auf das Wachstum, die PMF und die intrazelluläre ATP-Konzentration</b>	<b>59</b>
5.2.1	Die Expression von plasmidkodierten Tat-Translokase Komponenten führt zu einer erhöhten Menge an TatA, TatB und TatC in der Membran	60
5.2.2	Die beiden Stämme GSJ100 [tat <sup>+</sup> , pTM, pLV] und GSJ100 [tat <sup>+</sup> , pTM, pTatABC] exportieren eine große Menge an TorA-MalE ins Periplasma und zeigen einen heterogenen Phänotyp auf McM	61
5.2.3	Das hohe Maß an TorA-MalE-Export durch die Stämme GSJ100 [tat <sup>+</sup> , pTM, pLV] und GSJ100 [tat <sup>+</sup> , pTM, pTatABC] führt zu einer Wachstumsinhibition	63
5.2.4	Das hohe Maß an TorA-MalE-Export durch die Wildtyp-Tat-Translokase im Stamm GSJ100 [tat <sup>+</sup> , pTM] hat eine Abnahme der intrazellulären ATP-Konzentration zur Folge	67
<b>5.3</b>	<b>Untersuchung des Einflusses der Überexpression verschiedener artifizierlicher Tat-Substrate sowie eines nativen Tat-Substrats auf das Wachstum des Stammes GSJ100 [tat<sup>+</sup>]</b>	<b>68</b>
5.3.1	TorA-MalE, MdoD <sup>2+</sup> -MalE und SufI werden durch den Stamm GSJ100 [tat <sup>+</sup> ] in signifikanter Menge ins Periplasma transloziert	69
5.3.2	Die Translokation der artifizierlichen Tat-Substrate, nicht jedoch des nativen Tat-Substrats SufI, hat einen wachstumsinhibierenden Einfluss auf den Stamm GSJ100 [tat <sup>+</sup> ]	71
<b>5.4</b>	<b>Untersuchung des Einflusses der Kombination des nativen Tat-Substrats SufI mit der mutierten Translokase TatAB(L9P)C auf das Wachstum und die ATP-Konzentration des Stammes GSJ101 [<math>\Delta</math>tat]</b>	<b>73</b>
5.4.1	SufI wird von den Stämmen GSJ101 [ $\Delta$ tat] mit Wildtyp-Translokase TatABC sowie mit mutierter Translokase TatAB(L9P)C in signifikanter Menge ins Periplasma transloziert	74
5.4.2	Die Translokation des nativen Tat-Substrats SufI durch die mutierte Tat-Translokase TatAB(L9P)C hat keinen inhibierenden Einfluss auf das Wachstum des Stammes GSJ101 [ $\Delta$ tat, pSufI, pTatAB(L9P)C]	76
5.4.3	Die Interaktion des nativen Tat-Substrats SufI mit der Tat-Translokase TatAB(L9P)C hat keinen inhibierenden Einfluss auf die intrazelluläre ATP-Konzentration des entsprechenden Stammes	78
<b>5.5</b>	<b>Untersuchung hinsichtlich Morphologie und Größe unterschiedlicher Kolonien der Stämme GSJ100 [tat<sup>+</sup>, pTM, pTatABC] und GSJ101 [<math>\Delta</math>tat, pTM, pTatAB(L9P)C]</b>	<b>81</b>

---

5.5.1	Die Kombination aus TorA-MalE und Tat-Translokase in den Stämmen GSJ100 [tat <sup>+</sup> , pTM, pTatABC] und GSJ101 [ $\Delta$ tat, pTM, pTatAB(L9P)C] führt zu spontanen Tat-gekoppelten Mutationen	81
5.5.2	Charakterisierung der TatA-, TatB- und TatC-gekoppelten L9P-Suppressor-Tat-Translokasen	87
5.5.3	Untersuchung der Funktionalität der mutierten Tat-Translokasen, in welche je eine der L9P-Suppressor-Mutationen einzeln eingefügt wurde	104
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>115</b>
<b>6.1</b>	<b>Die Tat-abhängige Translokation kann zu einem erhöhten Einstrom von Protonen in Folge einer Verletzung der Membranintegrität führen</b>	<b>115</b>
6.1.1	Die Translokation des Reporterproteins TorA-MalE durch die mutierte Tat-Translokase TatAB(L9P)C führt zu einer Verletzung der Membranintegrität	115
6.1.2	Bei der Translokation des Reporterproteins TorA-MalE durch die mutierte Translokase TatAB(L9P)C erfolgt zusätzlich zum hohen Energieaufwand für die Translokation ein erhöhter Protoneneinstrom pro transloziertem TorA-MalE	119
6.1.3	Die Mutation L9P in TatB bewirkt eine Veränderung der Konformation des aus TatB und TatC gebildeten Rezeptorkomplexes	121
6.1.4	Die Tat-abhängige Translokation verschiedener artifizier Substrate hat eine Verletzung der Membranintegrität zur Folge und bedarf eines höheren Energieaufwands als die Translokation nativer Substrate	123
<b>6.2</b>	<b>Eine Verletzung der Membranintegrität in Folge Tat-abhängiger Translokation wird durch Inhibition/Inaktivierung der Translokase oder durch Adaptation der Translokase an TorA-MalE verhindert</b>	<b>124</b>
6.2.1	Eine Reduktion des Maßes an Translokation des artifizierten Reporterproteins TorA-MalE verhindert eine Verletzung der Membranintegrität	125
6.2.2	Durch Adaptation der mutierten Tat-Translokase an das artifizier Reporter-protein TorA-MalE wird der mit der Translokation einhergehende Protonen-einstrom reduziert und eine Verletzung der Membranintegrität verhindert	134
6.2.3	Die Translokation des Reporterproteins TorA-MalE durch die mutierten Tat-Translokasen TatAB(L25Q)C, TatABC(I60L) sowie TatABC(P85L) führt zu einer Verletzung der Membranintegrität	136
<b>6.3</b>	<b>Modell zum Einfluss der Tat-abhängigen Translokation artifizier und nativer Tat-Substrate auf die Membranintegrität von <i>E. coli</i></b>	<b>142</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURANGABEN</b>	<b>145</b>

**Gesundheit / Health**  
**Band / Volume 60**  
**ISBN 978-3-89336-841-9**

