

*In vitro* Interaktionsstudie der bakteriellen Insertase YidC  
von *Escherichia coli* mit seinem Substrat Pf3 coat  
Protein durch Fluoreszenzspektroskopie

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

Fakultät Naturwissenschaften  
Universität Hohenheim

Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie

vorgelegt von:

Sophie Winterfeld

aus Leipzig

2011

„D100“

Dekan:	Prof. Dr. Heinz Breer
1. berichtende Person:	Prof. Dr. Andreas Kuhn
2. berichtende Person:	Prof. Dr. Armin Huber

Eingereicht am:	29.09.2011
Mündliche Prüfung:	21.12.2011

Die vorliegende Arbeit wurde am 25.11.2011 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

© Verlag Dr. Hut  
Sternstr. 18  
80538 München  
Tel.: 08966060798  
[www.dr.hut-verlag.de](http://www.dr.hut-verlag.de)

# Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von September 2006 bis September 2011 am Institut für Mikrobiologie der Universität Hohenheim unter Leitung von Prof. Andreas Kuhn angefertigt.

Ich bedanke mich recht herzlich bei Herrn Prof. Andreas Kuhn für die Überlassung des interessanten Themas, die gute Betreuung, seine Offenheit sowie für die kritischen Anregungen bei der Anfertigung der schriftlichen Arbeit.

Für die Anfertigung des Zweitgutachtens danke ich Herrn Prof. Armin Huber.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Uwe Gerken für die Unterstützung und die zahlreichen Hilfestellungen und Anregungen während der gesamten Zeit.

Desweiteren danke ich Prof. Michael Börsch und Stefan Ernst für die Unterstützung und Hilfestellung bei den Messungen am 3. Physikalischen Institut der Universität Stuttgart.

Ohne die Unterstützung und sehr kollegiale Atmosphäre am Institut hätte die Arbeit nur halb so viel Spaß gemacht. Daher danke ich allen Kollegen des Institutes, die mich über die Jahre begleitet haben und mir mit vielen Ratschlägen vor allem den Einstieg erleichtert haben.

Weiterhin bedanke ich mich bei meiner Familie für die jahrelange Unterstützung und das Interesse an meiner Arbeit.



# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Translokationswege in Gram-negativen Bakterien .....	1
1.1.1	Sec-abhängige Translokation.....	1
	Post-translational.....	3
	Co-translational über SRP .....	3
1.1.2	Sec-unabhängige Membraninsertion.....	5
	TatABC Komplex.....	5
	YidC-only Insertion in <i>E. coli</i> .....	6
1.2	Die YidC/Oxa1/Alb3 Familie .....	8
	Oxa 1.....	9
	Alb3.....	10
	YidC .....	10
1.3	Der filamentöse Phage Pf3 .....	12
1.3.1	Membraninsertion von Pf3 coat Protein.....	13
1.4	Ziele der Arbeit.....	15
2	Material und Methoden.....	17
2.1	Material .....	17
2.1.1	Geräte.....	17
2.1.2	Material .....	17
2.1.3	Chemikalien .....	18
2.1.4	Proteine, Antibiotika, Enzyme, Fluoreszenzfarbstoffe und Antikörper..	20
2.1.5	Lipide, Plasmide und <i>E.coli</i> Stämme .....	20
2.1.6	Oligonukleotide und Sequenzierprimer .....	22
2.1.7	Puffer .....	23
2.2	Methoden.....	26
2.2.1	Molekular- und mikrobiologische Methoden .....	26
	Quick Change Mutagenese .....	26
	Herstellung chemokompetenter Zellen .....	26
	Transformation .....	27
	Sequenzierung .....	27
	Überexpression plasmid-codierter Gene.....	28

	Komplementation .....	29
2.2.2	Proteinchemische Methoden.....	30
	Reinigung von YidC WT und Einzel-Cystein Mutanten .....	30
	Reinigung von Pf3 coat Einzel-Cystein Mutanten .....	30
	Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) .....	31
	Silberfärbung .....	31
	Western Blot (semi-dry) .....	32
	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	32
2.2.3	Fluoreszenzmarkierung von Einzel-Cystein Mutanten.....	33
2.2.4	Herstellung semisynthetischer Liposomen .....	35
2.2.5	YidC-Rekonstitutionsmethoden.....	36
2.2.6	Trypsinverdau der Proteoliposomen zur Topologiebestimmung .....	37
2.3	Fluoreszenzspektroskopie.....	38
2.3.1	Grundlagen der Fluoreszenz.....	38
2.3.2	Titration von Pf3 coat Protein zu YidC-Proteoliposomen .....	39
2.4	Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie .....	41
2.4.1	Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS).....	41
2.4.2	Grundlagen von FRET (Förster-Resonanz-Energietransfer) .....	42
2.4.3	FRET-Messungen .....	45
3	Ergebnisse .....	51
3.1	Komplementation .....	51
3.2	Reinigung von YidC und Pf3 coat Protein .....	52
3.2.1	Reinigung der Einzel-Cystein Mutanten von YidC .....	52
3.2.2	Reinigung Einzel-Cystein Mutanten von Pf3 coat.....	53
3.3	Topologiebestimmung von YidC-Proteoliposomen .....	55
3.3.1	YidC WT rekonstituiert in Liposomen .....	55
3.3.2	Einzel-Cystein Mutanten von YidC rekonstituiert in DOPC-Liposomen.....	56
3.4	Tryptophanfluoreszenz und Linienprofil.....	57
3.5	Titration von YidC Proteoliposomen mit Pf3 coat Protein .....	59
3.5.1	YidC WT-Proteoliposomen titriert mit Pf3W0 coat und Pf3-19A coat... ..	59
3.5.2	DOPC-Proteoliposomen von YidC Mutanten titriert mit Pf3W0 coat .....	61
3.6	Fluoreszenzmarkierung von Einzel-Cystein Mutanten.....	62
3.7	Einzelmolekülexperimente zur Interaktion von YidC mit Pf3 coat .....	63

3.7.1	Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) .....	63
3.7.2	Bestimmung der FRET-Effizienzen aus YidC – Pf3 coat Interaktionen	65
3.7.3	Einzel-Photonen-Bursts zeigen den aktiven Transport von Pf3 coat in YidC Proteoliposomen.....	70
3.7.4	Temperaturabhängigkeit des Insertionsprozesses .....	72
4	Diskussion.....	75
4.1	Bindung von Pf3 coat an YidC-Proteoliposomen .....	75
4.2	Das Diffusionsverhalten von Pf3 coat gibt Aufschluss über dessen Form ..	78
4.3	Zeitaufgelöste Insertion von Pf3 coat in YidC-Proteoliposomen durch Einzelmolekülmessungen .....	80
4.4	Temperaturabhängigkeit der Insertion.....	84
4.4.1	Berechnung der Transferenergie für die Insertion von Pf3 coat.....	85
5	Zusammenfassung.....	89
6	Summary.....	91
7	Literaturverzeichnis .....	93
8	Anhang .....	107
8.1	DNA- und Aminosäuresequenz von YidC aus <i>E. coli</i> .....	107
8.2	DNA- und Aminosäuresequenz von Pf3 coat Protein .....	108
9	Abkürzungen und Trivialnamen.....	111



# 1 Einleitung

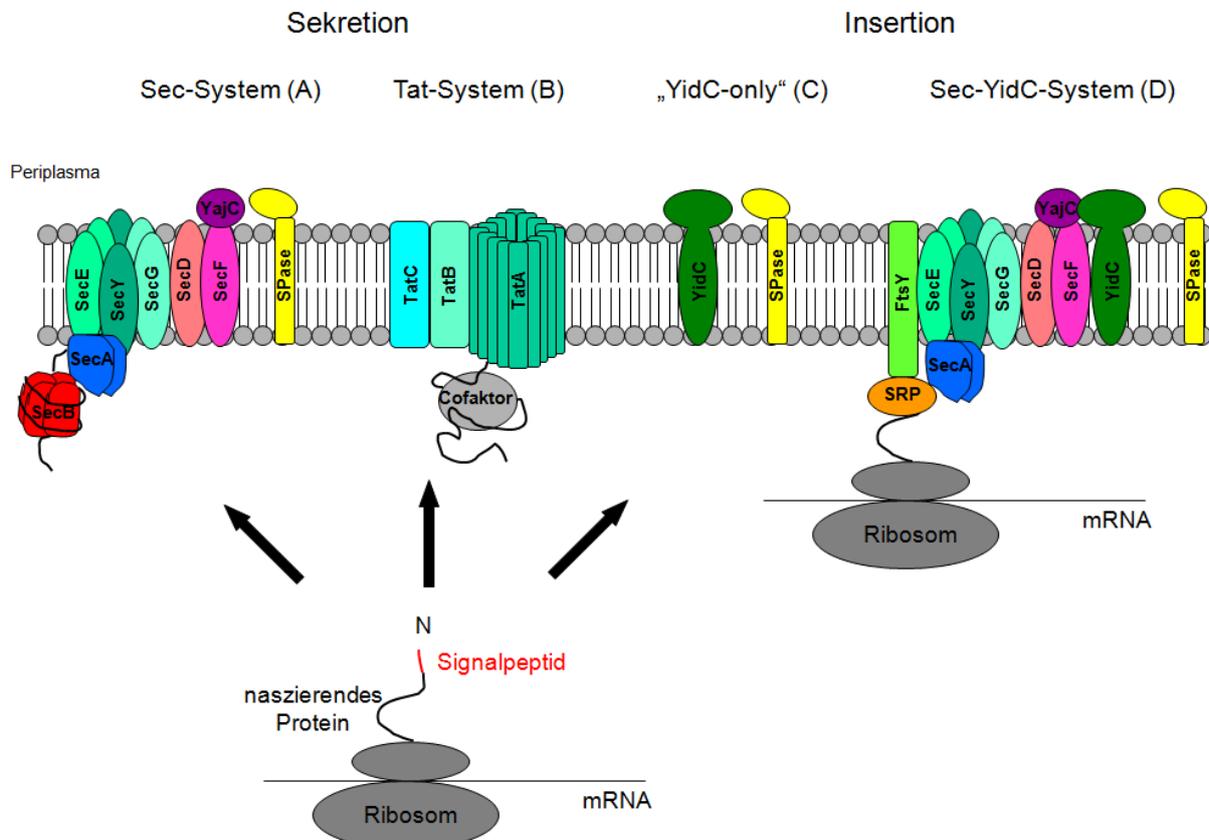
## 1.1 Translokationswege in Gram-negativen Bakterien

Gram-negative Bakterien sind von zwei verschiedenen Membranen umgeben. Die äußere Membran bildet eine asymmetrische Doppelschicht und besteht vornehmlich aus Phospholipiden und Lipopolysacchariden. Die innere Membran (Cytoplasmamembran) ist im Gegensatz dazu eine symmetrisch aufgebaute Lipiddoppelschicht von Phospholipiden. Beide Membranen sind durch ein Peptidoglycan-haltiges Periplasma getrennt und enthalten eine Vielzahl an Membranproteinen mit unterschiedlichsten Funktionen. Von allen Proteinen in *Escherichia coli* (*E. coli*) sind 20 – 30% der Proteine in der Cytoplasmamembran lokalisiert (Daley et al. 2005) und enthalten vorwiegend  $\alpha$ -helikale Transmembransegmente. Lediglich 2% der gesamten Proteine sind in der äußeren Membran verankert, meist mit einer amphipatischen  $\beta$ -Fasstruktur. All diese Proteine dienen z.B. der Energieversorgung der Zelle, dem Aufbau und dem Erhalt des Membranpotentials oder dem Transport diverser Nährstoffe, Giftstoffe und auch anderer Proteine über die Membran. Die Proteine müssen nach ihrer Biogenese an den für sie vorbestimmten Zielort geleitet werden. Dies geschieht im Wesentlichen in drei Schritten. Schon während der Translation der Proteine am Ribosom erfolgt die Selektierung auf welchem Weg das Protein an seinen Zielort gebracht wird. Das sogenannte Targeting (Zielführung) ist der erste Schritt eines jeden Proteins, welches in die Cytoplasmamembran inseriert oder darüber transloziert wird und kann auf verschiedenen Wegen stattfinden. Anschließend erfolgt die Translokation über (sekretorische Proteine) oder die Insertion in die Cytoplasmamembran. Dafür verantwortlich sind sogenannte Translokasen und Insertasen. Dabei gibt es eine Reihe verschiedener Mechanismen, je nach Beschaffenheit des zu transportierenden Proteins (Abbildung 1.1-1). Und schlussendlich erfolgt die funktionale Assemblierung der Membranproteine in Multiproteinkomplexen (zusammengefasst in Facey und Kuhn 2010, Dalbey et al. 2011).

### 1.1.1 Sec-abhängige Translokation

Über die Sec-Translokase werden sowohl Membranproteine in die Cytoplasmamembran inseriert als auch sekretorische Proteine über diese transportiert (siehe Abbildung 1.1-1 A und D). Die Sec-Translokase findet sich nicht nur in der Cytoplasmamembran von Bakterien sondern auch von Archaeen sowie im Endoplasmatischen Retikulum von Eukaryonten. Die zentralen Komponenten der Sec-Translokase bilden die integralen Membranproteine SecY, SecE und SecG. Dabei sind die Komponenten SecY und SecE essentiell und SecG wirkt stark stimulierend.

Diese drei Komponenten bilden einen stabilen heterotrimeren Komplex mit einem Durchmesser von 5-8 Å durch die Membran (Veenendaal et al. 2004, van den Berg et al. 2004). Des Weiteren findet sich assoziiert an die Translokationspore der SecDFYajC Komplex. Das Vorhandensein von SecDF führt zu einer effizienteren Translokation und Insertion von Membranproteinen, sie sind jedoch nicht essentiell für die Translokasefunktion (Pogliano et al. 1994, Chen et al. 2005, Tsukazaki et al. 2011).



**Abbildung 1.1-1: Translokationsmechanismen an der Cytoplasmamembran von *E. coli*.** Die Sekretion von Proteinen erfolgt post-translational über die Sec-Translokase (A) oder den TatABC-Transporter (B). Proteine der inneren Bakterienmembran inserieren entweder Sec-unabhängig über den YidC-only Weg (C) oder mittels der Sec-Translokase im Beisein von YidC (D).

Die Funktion von YajC für den Translokase-Komplex ist derzeit unbekannt. Auf der cytoplasmatischen Seite der Lipiddoppelschicht liegt die als Motorprotein agierende periphere Komponente SecA, eine ATPase (Papanikou et al. 2007, Driessen et al. 2008, zusammengefasst in Dalbey et al. 2011). SecYEG tritt in der Membran als Homodimer auf (Yahr und Wickner 2000, Bessoneau et al. 2002, Mori et al. 2003). Mit Hilfe von Crosslink Studien wurde gezeigt, dass beide Monomere dabei mit den Rückseiten zueinander (*back-to-back*) orientiert sind (Kaufmann et al. 1999, Veenendaal et al. 2001, Deville et al. 2011). Es wird vermutet, dass in einem dimeren

Komplex ein Monomer der Bindung von SecA dient und das andere Monomer die offene Pore für die Translokation stellt (Osborne und Rapoport 2007).

### **Post-translational**

Die meisten sekretorischen Proteine werden als Präproteine mit einer abspaltbaren Signalsequenz am N-Terminus synthetisiert und post-translational über die Cytoplasmamembran geschleust (siehe Abbildung 1.1-1 A). Nach erfolgter Synthese wird das Präprotein zur Verhinderung der Aggregation von hydrophoben Bereichen an das als Homotetramer vorliegende Chaperon SecB gebunden (Watanabe und Blobel 1989, Randall et al. 1998, Manting et al. 2000). Dabei bindet SecB an den maturen Teil des Präproteins, so dass die Signalsequenz für spätere Interaktionen frei liegt. Der SecB-Präprotein-Komplex wird anschließend an die periphere Membrankomponente SecA des transmembranen Translokase-Apparates SecYEG dirigiert (Hartl et al. 1990, Driessen et al. 2001). Dort bindet SecB an die C-terminale Domäne von SecA (Zhou et al. 2003), wobei die Interaktion zwischen SecB und SecA durch Bindung der Signalsequenz an SecA verstärkt wird (Fekkes et al. 1998). Anschließend verlässt SecB den Komplex und steht somit einem neu-synthetisierten Protein als Chaperon zur Verfügung (Fekkes et al. 1997). SecA vermittelt nun unter ATP-Hydrolyse die Translokation des Präproteins durch die Translokationspore der Sec-Translokase (zusammengefasst in Vrontou et al. 2004, Papanikou et al. 2007). Dabei wird die Polypeptidkette jeweils um 20 bis 30 Aminosäuren in die Translokationspore geschoben (Economou et al. 1994, van der Wolk et al. 1997). Nach erfolgter Translokation dissoziiert SecA vom SecYEG Komplex. Im Periplasma wird das translozierte Präprotein durch eine Signal-Peptidase prozessiert und das mature Protein generiert.

### **Co-translational über SRP**

Im Gegensatz zu den sekretorischen Proteinen besitzen die meisten integralen Membranproteine keine abspaltbare Signalsequenz. Die Information für die Insertion in die Cytoplasmamembran befindet sich meist in der ersten Transmembranregion. Proteine mit einem langen hydrophilen cytoplasmatisch lokalisierten N-Terminus, wie das Sensorprotein KdpD, werden hingegen gleich zu Beginn ihrer Synthese für das co-translational Targeting erkannt (Maier et al. 2008). Die meisten integralen Membranproteine und einige sekretorische Proteine werden co-translational mittels des SRP (*signal-recognition-particle*) und seinem Rezeptor FtsY (*filamentous temperature sensitive Y*) an die membranständige Sec-Translokase geleitet (siehe Abbildung 1.1-1 D; Herskovits et al. 2000). Das bakterielle SRP besteht aus dem cytosolischen Ribonukleoprotein Ffh (*fifty-four-homologue*) und einer 4.5 S RNA (Luirink et al. 2004, Wild et al. 2004). Die Bindung des SRP an die Signalsequenz hängt einerseits von der Hydrophobizität der Signalsequenz und andererseits vom

Vorhandensein basischer Aminosäurereste ab (Valent et al. 2001, Peterson et al. 2003). Die meisten der bisher analysierten Membranproteine benötigen SRP für das Targeting, wie z.B. FtsQ (van der Laan et al. 2004), die Leader-Peptidase Lep (de Gier et al. 1996), SecY (Seluanov et al. 1997), der Zuckertransporter MalF (Wagner et al. 2008) und die Mannitol-Permease MtlA (Koch et al. 1999). Der Komplex aus SRP, Ribosom und naszierender Kette wird nun an die Membran geleitet, wo das SRP an seinen Rezeptor FtsY bindet und einen SRP-FtsY Komplex bildet. Sowohl SRP (gebunden an ein Ribosom mit naszierender Kette) als auch FtsY haben jeweils ein GTP gebunden. Erst durch GTP-Hydrolyse kann der Komplex auseinander diffundieren und die naszierende Kette an die Sec-Translokase zur Membraninsertion übergeben werden (Keenan et al. 2001, Koch et al. 2003). Die Übergabe der naszierenden Kette an die Translokationspore benötigt den direkten Kontakt von FtsY und SecY (Angelini et al. 2005). Membranproteine mit einem großen periplasmatischen Loop (> 60 AS) benötigt die Anwesenheit von SecA (Kuhn et al. 1988, Andersson et al. 1993, Urbanus et al. 2001 und 2002). Die Insertion von Transmembranproteinen mit kleineren periplasmatischen Bereichen kann hingegen auch in Abwesenheit von SecA stattfinden (Scotti et al. 1999, Neumann-Haefelin et al. 2000).

Hinweise auf die laterale Entlassung hydrophober Membransegmente in die Membran wurden mit der Entdeckung von YidC erzielt (Stuart und Neupert 2000). Die Insertase YidC ist bei manchen Membranproteinen an der lateralen Integration transmembraner Proteindomänen in die Lipiddoppelschicht beteiligt, nachdem sie in die Sec-Translokase eingetreten sind (Scotti et al. 2000, Samuelson et al. 2001, van der Laan et al. 2001, Luirink et al. 2001, van der Laan et al. 2004). YidC kontaktiert dabei nur zu inserierende Proteine, nicht aber sekretorische Proteine (Samuelson et al. 2000, Scotti et al. 2000, van der Laan et al. 2001, Beck et al. 2001, Urbanus et al. 2001). Mittels Photocrosslink Studien konnte gezeigt werden, dass solche Proteine zunächst an SecY und danach an YidC binden (Houben et al. 2004). Im Fall von MtlA konnte dabei eine enge Bindung der dritten Transmembrandomäne des Substrates mit SecE und eine Bindung der ersten Transmembrandomäne des Substrates mit YidC beobachtet werden (Beck et al. 2001). Zudem wurde für YidC die Funktion eines Chaperons (Faltungshelfer) am Beispiel des Membranproteins MalF, des Zuckertransporters MalFGK<sub>2</sub> (Wagner et al. 2008) und als Assemblierungshelfer membranständiger Proteine, wie z.B. der NADH Dehydrogenase I nachgewiesen (Beck et al. 2001, Kuhn et al. 2003, Nagamori et al. 2004, Price et al. 2008). YidC bildet zudem einen Komplex mit der Sec-Translokase über den SecDFYajC-Komplex (Nouwen et al. 2002). In der assoziierten Form mit SecYEG spielt es eine wesentliche Rolle bei der Insertion der Untereinheit a der ATP-Synthase (Yi et al. 2004, Kol et al. 2009), der Untereinheit II der Cytochrom-b<sub>63</sub>-Oxidase – CyoA (Celebi et al. 2006, van Bloois et al. 2006, du Plessis et al. 2006)

und NuoK der NADH Dehydrogenase I (Price et al. 2010). Dass YidC im Komplex mit SecYEG für Membranproteine eine wichtige Rolle bei der lateralen Entlassung aus der Translokationspore in die Membran spielt, zeigen Versuche mit YidC-Depletionen. In Abwesenheit von YidC kommt die Insertion von z.B. TatC oder der Leader-Peptidase zum Erliegen, da die Sec-Pore nach Eintritt der zu inserierenden Proteine belegt bleibt (Samuelson et al. 2001, Chen et al. 2003).

### 1.1.2 Sec-unabhängige Membraninsertion

Nicht alle Membranproteine werden mittels der Sec-Translokase in oder über die Membran transloziert. Dieser Sec-unabhängige Weg kann über verschiedene Mechanismen stattfinden. Einige sekretorische Proteine werden post-translational mittels des TatABC-Komplexes über die Membran geschleust. Kleinere Proteine mit kurzen hydrophilen Termini bzw. Loops inserieren mit Hilfe der Insertase YidC in die Membran. Für manche Proteine, wie z.B. die Sensor Kinase KdpD, wurde eine sogenannte spontane Insertion gezeigt, d. h. sie inseriert in Abwesenheit von der Sec-Translokase und YidC. Jedoch ist die Insertion abhängig vom Membranpotential an der Cytoplasmamembran sowie dem Targeting über SRP (Facey und Kuhn 2003, Maier et al. 2008).

### TatABC Komplex

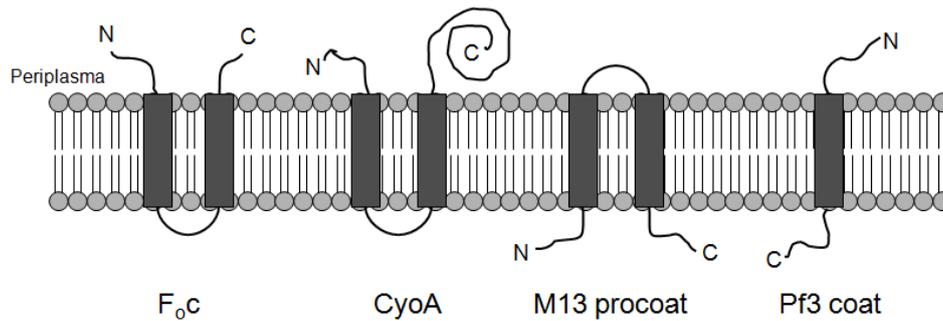
Wie bereits erwähnt werden manche sekretorische Proteine, wie Membran-assoziierte Proteinuntereinheiten, im gefalteten Zustand über den Tat-Weg (*twin arginine translocase*, siehe Abbildung 1.1-1 B) ins Periplasma transportiert (zusammengefasst in Robinson und Bolhuis 2001). Dieser Komplex besitzt eine variable Größe und wird nur gebildet, wenn er benötigt wird (Palmer et al. 2005, Robinson et al. 2004, Sargent et al. 2007). Homologe zu diesem Transportsystem finden sich in Prokaryonten sowie in der Thylakoidmembran von Chloroplasten, nicht aber in tierischen Zellen (Robinson et al. 2000). Substrate dieses Translokationsweges sind häufig periplasmatische Proteine mit Metall-Kofaktoren, wie z.B. Proteine des respiratorischen oder photosynthetischen Elektronentransports (Palmer et al. 2005). Es wurden jedoch auch Substrate ohne Metall-Kofaktoren identifiziert, welche u.a. eine Rolle bei der Virulenz von Bakterien spielen (Ochsner et al. 2002, Pradel et al. 2003, zusammengefasst in de Buck et al. 2008). Diese Substrate werden mittels des Tat-Signalpeptides, bestehend aus zwei Argininen gefolgt von einer hydrophoben zentralen Domäne sowie einer oftmals basischen C-terminalen Domäne, an den Tat-Komplex dirigiert (Bogsch et al. 1997, Cristóbal et al. 1999). Die basischen Aminosäurereste verhindern zudem ein Targeting zur Sec-Translokase (Wexler et al. 2000). In *E. coli* besteht die Tat-Translokase aus den Untereinheiten TatA, TatB und TatC (Wexler et al. 2000). TatB und TatC bilden einen hochmolekularen Komplex an welchen das Substrat bindet (Bolhuis et al. 2001, Alami et

al. 2003). Über die Anzahl an assemblierten TatA-Untereinheiten reguliert sich die Größe der Tranlokationspore. Da die Substrate im gefalteten Zustand transportiert werden, muss der Kanal von variabler Größe sein (Gohlke et al. 2005). Im Gegensatz zur Sec-Translokase ist der Transport von Substraten nur vom Membranpotential abhängig. Nach der Sekretion des Substrates ins Periplasma wird die Tat-Signalsequenz durch die Leader-Peptidase prozessiert.

### **YidC-only Insertion in *E. coli***

Wie zuvor erwähnt tritt die Insertase YidC in Assoziation mit der Sec-Translokase auf. Allerdings vermittelt YidC auch die Insertion kleiner Membranproteine unabhängig von SecYEG, durch den so genannten ‚YidC-only‘ Weg (siehe Abbildung 1.1-1 C). Dieser Insertionsweg wurde entdeckt, als nach YidC-Depletion in der Zelle die Insertion von Sec-unabhängigen Proteinen inhibiert war, von denen man annahm, dass sie spontan inserieren (Geller et al. 1985, Samuelson et al. 2000). Alle Substrate dieses YidC-only Weges besitzen meist nur ein bis zwei Transmembranbereiche mit kurzen und neutralen oder negativ geladenen zu translozierenden Regionen (Kiefer und Kuhn 2007). Bisher bekannte bakterielle Substrate des YidC-only Weges sind unter anderem die c-Untereinheit der  $F_1F_o$ -ATPase (Yi et al. 2003, van der Laan et al. 2004), der N-Terminus der Untereinheit II der Cytochrom- $b_{03}$ -Oxidase (van der Laan et al. 2003) sowie der mechano-sensitive Kanal MscL (Facey et al. 2007, Samuelson et al. 2000, Price et al. 2011) (Abbildung 1.1-2). Mit Hilfe von YidC werden die Termini der c-Untereinheit der  $F_1F_o$ -ATPase in Abwesenheit von SRP und der Sec-Translokase über die Cytoplasmamembran transloziert und die Proteine assembliert (Yi et al. 2003, van der Laan et al. 2004). Da die Assemblierung der c-Untereinheit der initiale Schritt des Aufbaus der  $F_1F_o$ -ATPase ist, beeinflusst das Vorhandensein von YidC die Assemblierung des gesamten  $F_o$ -Komplexes der ATPase (Hermolin und Fillingame 1995). Aufgrund dieser Abhängigkeit führt die Depletion von YidC zu einer verminderten Protonen-motorischen Kraft (auch als Membranpotential bezeichnet) aufgrund des stark reduzierten Levels an Atmungskettenkomplexen (van der Laan et al. 2003 und 2004, van Bloois et al. 2004 und 2006, Celebi et al. 2006, du Plessis et al. 2006).

Die Depletion von zellulärem YidC führt zudem zur Induktion des Phagenschock-Proteins PspA, welches das Membranpotential beeinflusst und zur Aktivierung der Cpx-Stressantwort führt (Darwin et al. 2005, Wang et al. 2010). Diese Reaktionen der Zelle belegen die wichtige Rolle von YidC bei der Faltung von Membranproteinen (zusammengefasst in Ruiz und Silhavy 2005, Shimohata et al. 2007, Wang et al. 2010).



**Abbildung 1.1-2: Schematische Darstellung einiger Substrate des YidC-only Insertionsweges in *E. coli*. Die c-Untereinheit der  $F_1F_0$ -ATPase ( $F_{0c}$ ) sowie die Untereinheit II der Cytochrom- $b_{03}$ -Oxidase *CyoA* sind zelleigene Substrate von *E. coli* im Gegensatz zu den Phagenhüllproteinen M13 procoat und Pf3 coat.**

Beim YidC-only Weg wurde auch eine Beteiligung des SRP beim co-translationalen Targeting von MscL sowie der c-Untereinheit der  $F_1F_0$ -ATPase beobachtet (van Bloois et al. 2004, Facey et al. 2007). Das Substrat wird anschließend an YidC übergeben und die Proteine inseriert. Ob dieser Prozess dann co- oder post-translational abläuft ist derzeit nicht bekannt. Ein co-translationaler Prozess würde eine Bindung des Komplexes, bestehend aus SRP und Ribosom mit naszierender Kette, an YidC voraussetzen. Vom mitochondrialen Homolog Oxa-1 ist bekannt, dass es C-terminal eine Ribosomenbindestelle besitzt (Jia et al. 2003, Preuss et al. 2005). Da der C-Terminus vom YidC wesentlich kürzer ist im Vergleich zu Oxa-1, ist eine Funktion als Ribosomenbindestelle fraglich.

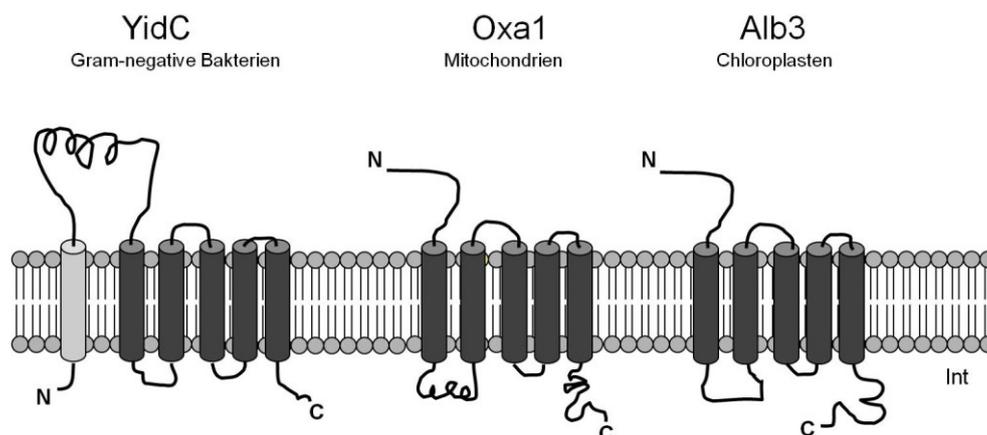
Weitere Substrate des ‚YidC-only‘ Weges sind die Haupthüllproteine der filamentösen Phagen Pf3 und M13. Die kurzen Phagenproteine gelangen ohne weitere Beteiligung eines Proteins post-translational zum YidC. Die Sec-unabhängige Insertion von Pf3 coat (siehe Abschnitt 1.3) und M13 procoat wurde *in vitro* mit YidC-enthaltenden Lipidvesikeln gezeigt (Serek et al. 2004, Stiegler et al. 2010).

Das Haupthüllprotein des M13 Phagen wird als 73 Aminosäuren langes Präprotein (procoat) synthetisiert, welches zweimal die Membran durchspannt. Beide Termini sind dabei im Cytoplasma lokalisiert und die Transmembrandomänen über einen kurzen hydrophilen periplasmatischen Loop verbunden. N-terminal besitzt M13 procoat eine 23 Aminosäuren umfassende Signalsequenz welche am Ende eine Erkennungsregion für die Leader-Peptidase beinhaltet (Wickner et al. 1979). Der mature Teil (M13 coat) besteht aus 50 Aminosäuren mit einer negativ geladenen periplasmatischen Domäne, einem hydrophoben Transmembranbereich und einem positiv geladenen C-terminalen, cytoplasmatisch lokalisierten Bereich. M13 procoat gelangt auf einem SRP-unabhängigen Weg zur Membran und an YidC (de Gier et al. 1998, Chen et al. 2003). Der N- und C-Terminus des Präproteins sind positiv geladen, worüber die Bindung von M13 procoat mittels elektrostatischer Wechselwirkungen an die negativ geladenen Phospholipide der Cytoplasmamembran erfolgt

(Gallusser und Kuhn 1990). Anschließend interagiert der hydrophobe Transmembranbereich mit der Cytoplasmamembran (Kuhn et al. 1986, Samuelson et al. 2001) und unter Ausbildung einer  $\alpha$ -helikalen Struktur inseriert M13 procoat in die Membran (Kiefer und Kuhn 1997). Der negativ geladene periplasmatische Loop, welcher den N-Terminus des muren Proteins darstellt, wird mit Hilfe des Membranpotentials und YidC über die Membran transloziert (Date et al. 1980, Zimmermann et al. 1982, Samuelson et al. 2000 und 2001) und scheint nur für den vom Membranpotential abhängigen Einbau nötig zu sein. Dadurch kann das zu translozierende Protein seine endgültige Konformation einnehmen (Cao et al. 1994).

## 1.2 Die YidC/Oxa1/Alb3 Familie

Die YidC/Oxa1/Alb3 Familie wurde 1994 bei der Untersuchung der Cytochrom-Oxidase in Mitochondrien entdeckt (Bonnefoy et al. 1994, Bauer et al. 1994). Durch Sequenzanalysen konnten Homologe in Bakterien (YidC) sowie Chloroplasten (Alb3 und Alb4), in Archaeen jedoch nur sporadisch nachgewiesen werden (Yen et al. 2001, Zhang et al. 2009). Außer in Mitochondrien und Chloroplasten konnten keine weiteren Homologe in Eukaryonten identifiziert werden (Luirink et al. 2001, Kiefer und Kuhn 2007, Bonnefoy et al. 2009). Alle Mitglieder der Familie weisen eine hoch konservierte Kernregion mit flankierenden N- und C-terminalen Domänen variabler Länge auf (Yen et al. 2001; Abbildung 1.2-1). Diese Kernregion enthält die katalytische Aktivität welche eine Rolle bei der Insertion und Assemblierung von Proteinkomplexen, wie Sensorproteinen, energieerzeugenden Komplexen oder Transportern spielt (Moore et al. 2000, Samuelson et al. 2000, Scotti et al. 2000).



**Abbildung 1.2-1:** Schematische Darstellung der Strukturen der Mitglieder der YidC/Oxa1/Alb3 Familie. Konservierte Transmembranbereiche sind dunkel dargestellt und in hellgrau ist der YidC-spezifische N-terminale Transmembranbereich abgebildet. Int steht für das Cytoplasma der Bakterien, die mitochondriale Matrix sowie dem Thylakoidlumen der Chloroplasten.

Das YidC-Oxa-Alb System ist dahingehend besonders, da es für die Insertion von Membranproteinen keine Hydrolyse von Nukleotidtriphosphaten benötigt. Dass die Mitglieder der YidC/Oxa1/Alb3 Familie funktionell konserviert sind zeigen Komplementationsversuche. Sowohl Oxa1 wie auch Alb3 können die Funktion von YidC in *E. coli* komplementieren (Jiang et al. 2002, Preuss et al. 2005, van Bloois et al. 2007).

### **Oxa 1**

Dass die Mitglieder der YidC Familie eine Rolle bei der Membranbiogenese spielen wurde zuerst an der inneren Mitochondrienmembran bei der Untersuchung des Cytochrom-Oxidase Komplexes und der Biogenese der  $F_1F_0$ -ATP-Synthase in *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt (Bonney et al. 1994, Bauer et al. 1994, Altamura et al. 1996). Neben Oxa1 wurde ein weiteres Homolog in Mitochondrien gefunden, das Protein Cox18 (Oxa2 in *Neurospora crassa*). Cox18 fungiert auf eine post-translationale Weise nachfolgend von Oxa1 bei der Assemblierung der Cytochrom-Oxidase (Funes et al. 2004). Für die Translokase Oxa1 wurde eine essentielle Rolle bei der Translokation des N-Terminus der Untereinheit (UE) II der Cytochrom-c-Oxidase aus der mitochondrialen Matrix in die innere Membran nachgewiesen (He und Fox 1997, Hell et al. 1997). Dabei wurde eine Interaktion von Ribosomen mit dem C-Terminus des Oxa1 gezeigt (Jia et al. 2003, Szyrach et al. 2003). Der C-Terminus der UE II der Cytochrom-c-Oxidase wird hingegen von Cox18 in die Membran inseriert (Funes et al. 2004). Im Gegensatz zu Oxa1 besitzt Cox18 nicht die Möglichkeit der Ribosomenbindung für ein co-translationales Targeting. Da Mitochondrien weder über den Tat- noch den Sec-Translokationsweg verfügen wird vermutet, dass die Oxa1/Cox18 Proteine die Insertion von Membranproteinen aus der Matrix in die innere Membran katalysieren. Dabei werden kernkodierte Proteine zunächst über den TOM und TIM Komplex aus dem Cytoplasma in die Matrix geschleust (zusammengefasst in Perry et al. 2008), von wo aus sie mittels der Oxa Proteine in die innere Membran inseriert werden. Weitere Substrate von Oxa1 sind die kernkodierten Proteine CoxII, ATPase-su9 und Oxa1 selbst sowie die mitochondrial kodierten Proteine Cox1 und Cox2 (Hell et al. 1997 und 2001).

### Alb3

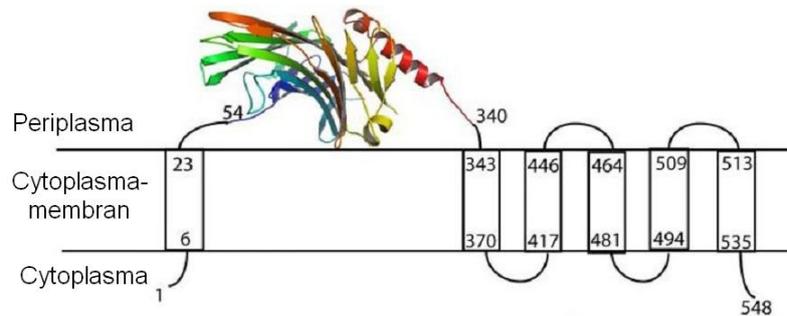
Kurz nach der Entdeckung von Oxa1 in Mitochondrien wurden die Homologe Alb3 und Alb4 in den Chloroplasten von *Arabidopsis thaliana* entdeckt und für diese Proteine eine Rolle bei der Membraninsertion gezeigt (Sundberg et al. 1997, Moore et al. 2000, Gedes et al. 2006). Alb3 vermittelt unter anderem die Insertion und Assemblierung von Lichtsammelkomplexen in der Thylakoidmembran (Moore et al. 2000, Bellafiore et al. 2002). Diese Proteine werden zunächst post-translational vom Cytoplasma in das Stroma der Chloroplasten importiert und anschließend mittels des SRP Komplexes (cpSRP54 und cpSRP43) an die Thylakoidmembran geleitet (Moore et al. 2000). Dabei konnte eine direkte Interaktion von Alb3 mit dem cpSRP, dem Rezeptor cpFtsY und cpSecY nachgewiesen werden (Jiang et al. 2002, Moore et al. 2003).

Alb4 ist ein zweites Homolog der YidC/Oxa1/Alb3 Familie in Chloroplasten und ist wie Alb3 in der Thylakoidmembran lokalisiert. Im Gegensatz zu Alb3 ist Alb4 nicht essentiell, wenngleich die Depletion von Alb4 zu einem reduzierten Level an verschiedenen Untereinheiten der Chloroplasten  $F_1F_o$ -ATP-Synthase führt (Benz et al. 2009). Dies deutet auf eine Rolle des Alb4 bei der Assemblierung und Stabilisierung des  $F_1F_o$ -ATP-Synthase Komplexes in Chloroplasten hin.

### YidC

Die bakterielle Insertase YidC ist das am besten charakterisierte Mitglied der YidC/Oxa1/Alb3 Familie und wurde durch eine Sequenzhomologie des mitochondrialen Oxa1 Proteins identifiziert (zusammengefasst in Dalbey und Kuhn 2000). Es spielt eine entscheidende Rolle bei der Insertion von Membranproteinen (Samuelson et al. 2000, Scotti et al. 2000). Im Gegensatz zu Gram-negativen Bakterien besitzen Gram-positive Bakterien (z.B. *Bacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*) zwei Oxa1-Homologe – YidC1 und YidC2 (Yen et al. 2001). Sie weisen jedoch eine abweichende Struktur vom YidC Gram-negativer Bakterien auf (Funes et al. 2009).

YidC aus *E. coli* besteht aus 548 Aminosäuren und durchspannt die Membran sechsmal wobei beide Termini ins Cytoplasma ragen (Abbildung 1.2-2, Sääf et al. 1998). Diese Topologie wurde bei vielen Transportern beobachtet (Saier et al. 2000). Zwischen der ersten und zweiten Transmembrandomäne befindet sich ein 320 Aminosäuren umfassender periplasmatischer Loop (P1-Loop) dessen Struktur (super  $\beta$ -Sandwich-Faltung) im Jahr 2008 durch Röntgenkristallographie aufgeklärt werden konnte (Oliver und Paetzel 2008, Ravaud et al. 2008). Für den P1-Loop konnte eine Interaktion über SecDF mit der Sec-Translokase nachgewiesen werden (Nouwen und Drießen 2002, Xie et al. 2006).



**Abbildung 1.2-2: Schematische Darstellung der Struktur von YidC aus *E.coli* mit der durch Röntgenkristallographie aufgeklärten Struktur des P1-Loops (aus Oliver und Paetzel 2008).**

Mit Hilfe von Deletions- und Substitutionsmutanten von YidC konnte gezeigt werden, dass die Transmembrandomänen 2, 3 und 6 wichtig für die Aktivität der Insertase sind (Jiang et al. 2003). Diese Transmembrandomänen zeigen neben Transmembrandomäne 5 auch die höchste Homologie zu den anderen Mitgliedern der YidC Familie (Yen et al. 2001). Die Transmembrandomäne 3 ist dabei essentiell für die Insertasefunktion von YidC, da bereits Einzel-Serin Mutationen zum Verlust der Funktion führen (Jiang et al. 2003). Zudem konnte durch Crosslink Experimente mit Pf3 coat Protein eine vermutliche Bindungstasche an der Transmembrandomäne 3 nachgewiesen werden (Klenner et al. 2008). Die Transmembrandomänen 4 und 5 sind für die Funktion von YidC nicht essentiell, da sie durch andere hydrophobe Aminosäuren ohne Funktionsverlust ausgetauscht werden können. Auch der P1-Loop ist nicht für die Funktion von YidC als Insertase essentiell. Über 90 % des Loops können ohne Funktionsverlust deletiert werden (Xie et al. 2007). Proteine, welche mittels Sec und YidC inserieren, werden stets über das SRP an die Membran geleitet, wie z.B. MtlA und FtsQ (Koch et al. 1999, Scotti et al. 1999). Dabei vermittelt YidC die laterale Integration und Faltung der durch die Sec-Translokase inserierten Proteine (Beck et al. 2001, Samuelson et al. 2001, Yi et al. 2003). YidC interagiert dabei mit den hydrophoben Membransegmenten der Substrate auf verschiedene Weisen (Scotti et al. 2000, Chen et al. 2002). Im Fall der Leader-Peptidase wurde eine sequenzielle Übernahme der einzelnen Transmembransegmente von der Sec-Translokase und der nachfolgenden lateralen Entlassung in die Membran beobachtet (Houben et al. 2004). Im Gegensatz dazu bildet YidC bei der Mannitolpermease eine Assemblierungsstelle. So werden die einzelnen Transmembranbereiche nacheinander von der Sec-Translokase an YidC übergeben. Erst wenn alle Transmembranbereiche an YidC übergeben sind und die korrekte Tertiärstruktur ausgebildet ist, wird das Substrat lateral in die Membran entlassen (Beck et al. 2001).

Röntgenkristallstrukturanalysen zeigten, dass Membranproteine, welche mehrfach die Membran durchspannen dicht gefaltete und über hydrophobe Interaktionen verbundene Transmembranhelices aufweisen, welche möglicherweise in Stufen

gefaltet werden (Popot und Engelman 1990). Es wird vermutet, dass YidC eine geschützte Umgebung für die aus der Sec-Translokase entlassenen Transmembranbereiche der Proteine bietet und für eine korrekte Faltung und Ausbildung der tertiären Struktur verantwortlich ist (Dalbey und Kuhn 2004). Eine solche Rolle als Faltungshelfer konnte anhand der Lactose Permease LacY mittels konformationeller Antikörper gezeigt werden (Nagamori et al. 2004).

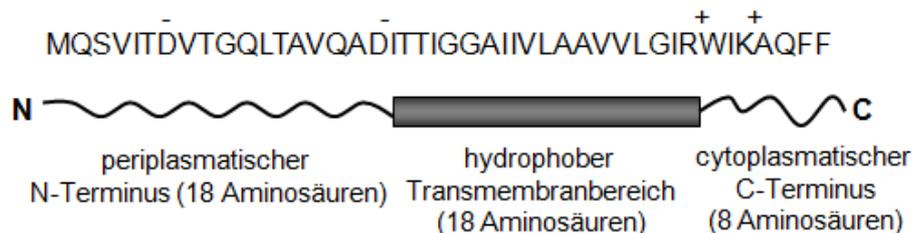
Die Frage der Oligomerisierung von YidC in der Membran ist umstritten. Mittels 2D-Kristall Experimenten wurde 2008 eine dimere Form von YidC postuliert (Lotz et al. 2008). Auch Kryo-Elektronenmikroskopie Untersuchungen zeigten eine dimere Form und Bildung einer Pore bei der Assoziation an ein translatierendes Ribosom (Kohler et al. 2009). Da für gereinigtes Oxa1 aus *Neurospora crassa* eine tetramere Form beobachtet wurde (Nargang et al. 2002), ist eine dimere Form von *E. coli* YidC möglich.

Neben der Rolle als Insertase und Assemblierungsfaktor scheint YidC auch eine Rolle bei der Qualitätskontrolle bereits inserierter Proteine zu spielen. YidC wurde in einem großen Komplex mit dem Hitzeschockprotein FtsH und seinem Modulator HflC/K gefunden und scheint dort für den Schutz vor missgefalteten Proteinen zu sorgen, indem es die korrekte Faltung unterstützt (van Bloois et al. 2008). Mittels ATP-Hydrolyse kann FtsH Membranproteine aus der Membran entfernen um sie zu degradieren (Kihara et al. 1999). Das Stress-induzierte Protein FtsH degradiert bekanntermaßen die Untereinheit  $\alpha$  der ATPase sowie SecY, wenn diese im Überschuss oder in Abwesenheit ihrer Komplexpartner exprimiert werden (Kihara et al. 1995, Akiyama et al. 1996). Eventuell hat YidC in diesem Komplex mit FtsH auch eine selektive Funktion und übergibt falsch gefaltete Proteine direkt an FtsH zur Degradierung in der Nähe der Sec-Translokase.

### 1.3 Der filamentöse Phage Pf3

Der filamentöse Bakteriophage Pf3 infiziert das Gram-negative Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* (Stanisch et al. 1974). Etwa 2500 Kopien des Haupthüllproteins (gp8 oder Pf3 coat) sowie einige Kopien kleinerer Hüllproteine umschließen die einzelsträngige DNA in Form eines Filamentes mit einer Länge von ca. 700 nm und einem Durchmesser von etwa 6 nm (Welsh et al. 1998). In dem Phagenfilament bilden die negativ geladenen N-Termini der Pf3 coat Proteine die äußere Oberfläche und die positiv geladenen C-Termini bilden die Auskleidung des mit DNA gefüllten Kerns, wobei sie mit der DNA interagieren (Day et al. 1988, Greenwood et al. 1991, Pederson et al. 2001). Die Pf3 coat Proteine umschließen die DNA dabei in einer durchgängigen helikalen Anordnung (Welsh et al. 1998). Die Hüllproteine filamentöser Phagen werden zunächst als Transmembranproteine synthetisiert und dann als austretender viraler Partikel assembliert (Russel et al. 1991).

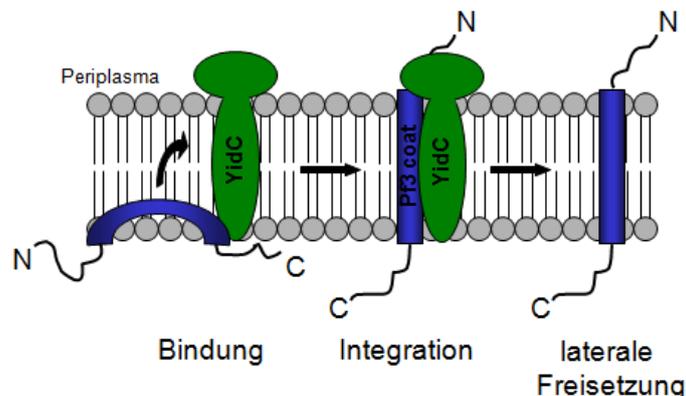
Das Haupthüllprotein Pf3 coat besteht aus 44 Aminosäuren mit einem negativ geladenen N-Terminus, einer hydrophoben Transmembrandomäne sowie einem positiv geladenen C-Terminus (Abbildung 1.3-1). Pf3 coat besitzt in der Membran eine N<sub>außen</sub>-C<sub>innen</sub> Topologie und liegt zu 85% in einer  $\alpha$ -helikalen Konformation vor (Aisenbrey et al. 2006).



**Abbildung 1.3-1: Schematische Darstellung des Haupthüllproteins des Pf3 Phagen Pf3 coat mit der Aminosäuresequenz.**

### 1.3.1 Membraninsertion von Pf3 coat Protein

Das Pf3 coat Protein wird unabhängig von der Sec-Translokase, aber mit Hilfe von YidC in die Cytoplasmamembran von *E. coli* inseriert (Abbildung 1.3-2). Da Pf3 coat im Gegensatz zu anderen Phagenhüllproteinen (z.B. M13) keine Signalsequenz besitzt, stellt sich die Frage des Membran Targetings. Die Struktur von Pf3 coat selbst verfügt über Signalsequenz-ähnliche Merkmale. Über die positiven Ladungen am C-Terminus sowie den hydrophoben Transmembranbereich interagiert das Protein mit der negativ geladene Innenseite der Membran über elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen und orientiert sich damit entlang der Lipidschicht (Chen et al. 2002). Die Interaktion zwischen Pf3 coat und YidC basiert auf hydrophoben Wechselwirkungen, was mittels Fluoreszenz-Titrationsmessungen mit solubilisiertem YidC WT beobachtet wurde (Gerken et al. 2008). Die Bindung von Pf3 coat an YidC zeigt dabei keine Abhängigkeit vom pH-Wert, so dass eine vorrangige Interaktion über elektrostatische Wechselwirkungen ausgeschlossen werden kann.



**Abbildung 1.3-2: Vermutlicher Insertionsmechanismus von Pf3 coat Protein in *E.coli* durch YidC.**

Nach spezifischer Bindung von Pf3 coat an YidC über hydrophobe Wechselwirkungen wird der negativ geladene N-Terminus über die Membran transloziert. Durch diese positiven und negativen Ladungen an den Termini wird stets die korrekte Orientierung des Proteins in der Membran erhalten.

Werden aber zusätzliche negative Ladungen am N-Terminus eingebracht, so ist keine Insertion mehr möglich. Ein Austausch aller geladenen gegen ungeladene Aminosäuren verhindert ebenfalls die Insertion (Kiefer und Kuhn 1999). Das Einbringen zusätzlicher hydrophober Aminosäuren in den Transmembranbereich führt dagegen zur spontanen Insertion in Abwesenheit von YidC (Kiefer und Kuhn 1999, Ridder et al. 2001). Auch *in vitro* inseriert Pf3 coat Protein mit zusätzlichen hydrophoben Aminosäureresten spontan in Liposomen in Abwesenheit von YidC (Serek et al. 2004, Ernst et al. 2011). *In vivo* findet die Anlagerung des Pf3 coat an die Membran über elektrostatische Wechselwirkungen statt, die aufgrund des vorhandenen Membranpotentials (MP) verstärkt werden. Für die Insertion von Pf3 coat ist jedoch das MP nicht zwingend erforderlich, da *in vitro* die Insertion von Pf3 coat auch ohne MP beobachtet werden konnte (Chen et al. 2001). Dabei wurde stets die der *in vivo* entsprechenden Orientierung erhalten (Ernst et al. 2011).

## 1.4 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Interaktion zwischen dem Phagenhüllprotein Pf3 coat und der *E. coli* Insertase YidC mit Hilfe von Fluoreszenzspektroskopie näher zu untersuchen.

Sowohl *in vivo* wie auch *in vitro* konnte die Abhängigkeit der Pf3 coat Insertion von YidC beobachtet werden. Dennoch stellte sich die Frage wie genau die Interaktion der beiden Proteine abläuft. Mit Hilfe von Fluoreszenz-Titrationsmessungen konnte bereits der Bindungsmechanismus bei solubilisiert vorliegendem YidC charakterisiert werden.

Durch verschiedene Rekonstitutionsmethoden wurden YidC-Proteoliposomen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung hergestellt und mittels Fluoreszenz-Titrationsmessungen wurde deren Einfluß auf die Bindung von Pf3 coat an YidC untersucht.

Als Schlüsselexperiment für die nähere Charakterisierung des Insertionsprozesses von Pf3 coat in YidC-Proteoliposomen dienten Einzelmolekülexperimente, mit deren Hilfe der bisher postulierte Insertionsmechanismus im Detail und zeitaufgelöst aufgeklärt werden sollte.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Pharmacia LKB-Pump P1	GE Healthcare (Uppsala, Se)
Extruder Einheit	Avanti Polar Lipids Inc. (Alabama, AL, US)
Airfuge Ultrazentrifuge Rotor A 100/18	Beckman Coulter (Fullerton, CA, US)
Zentrifuge Avanti Rotor JA-25.50	Beckman Coulter (Fullerton, CA, US)
Ultrazentrifuge Optima LE-8K Rotor Ti60	Beckman Coulter (Fullerton, CA, US)
Chromatographieeinheit FPLC <i>ÄKTA Basic</i>	Amersham Bioscience (San Francisco, CA, US)
Quarzglas Absorptions- und Fluoreszenzküvetten	Hellma (Müllheim)
Fluoreszenzspektrometer <i>F-4500</i>	Horiba Jobin Yvon (München)
Photomultiplier Tube R928P Photocool™	Hamamatsu (Japan)
UV-Vis-SpectroPhotometer $\lambda$ 15	Perkin Elmer (Connecticut, US)
Photometer Novaspec II	Amersham pharmacia biotech
Drehschieberpumpe E2M5 (5 m <sup>3</sup> /h)	Edwards (München)
French Pressure Cell Press Zelle: SLMO (bis 20000 psi)	American Instrument Company Inc. (Siverspring, ML,US)

#### 2.1.2 Material

<b>Materialien</b>	<b>Hersteller</b>
Biobeads® SM-2 Adsorbent (20-50 mesh)	Bio-Rad (Hercules, CA, US)
Sterilfilter 0,2 $\mu$ m Porengröße	FisherBrand (Schwerte)
Rundfilter 0,4 $\mu$ m, zur Pufferfiltration	Sartorius (Göttingen)
Extrudermembran 0,4 $\mu$ m	Avanti Polar Lipids Inc. (Alabama, AL, US)
<b>Proteinkonzentrierung</b>	
Zentrifugalfilter <i>Amicon Ultra MWCO 50.000</i>	Amicon (Witten)

Zentrifugalfilter *Vivaspin* MWCO 3.000  
 U-Tube® *Concentrator* 500-3  
 Ultrafiltration Amicon Rührzelle Ø 43cm

Sartorius (Göttingen)  
 Novagen (Darmstadt)  
 Amicon (Witten)

### Chromatographie

Einweg-Säulen (5 ml)  
 Superdex 200 HiLoad 16/60  
 Superdex 200 10/30  
 Superdex 75 HiLoad 16/60  
 Ni-NTA Agarose Flowthrough

Quiagen GmbH (Hilden)  
 GE Healthcare (Uppsala, Se)  
 GE Healthcare (Uppsala, Se)  
 GE Healthcare (Uppsala, Se)  
 Quiagen GmbH (Hilden)

### Western Blot

Gel-Blotting Papier  
 Nitrocellulose Blottingmembran  
 Filmmaterial für Western Blot  
 Entwickler-Lösung  
 Fixier-Lösung  
 ECL Reagenz

Watman (Dassel)  
 Watman (Dassel)  
 Valmex (Augsburg)  
 AGFA (Mortsel, B)  
 Tetenal (Norderstedt)  
 Millipore (Billerica, MA, US)

## 2.1.3 Chemikalien

### Kurzbezeichnung/Reinheit

### Hersteller

Aktivkohle 1,5 mm Lebensmittelqualität  
 Ammoniummolybdat x 4H<sub>2</sub>O  
 Ampicillin  
 APS  
 Arabinose  
 Ascorbinsäure  
 Atto520 Maleimid, Atto647N Maleimid  
 Bromphenolblau (BPB)  
 CaCl<sub>2</sub>  
 Coomassie Brilliant Blau R-250  
 Dichlormethan  
 DMSO  
 Dodecyl-β-D-Maltosid (DDM)  
 DTT  
 EDTA  
 Essigsäure  
 Ethanol  
 Folin-Reagenz  
 Formaldehyd (37%)

Merck (Darmstadt)  
 Sigma (St. Louis, MO, US)  
 Sigma (St. Louis, MO, US)  
 Sigma (St. Louis, MO, US)  
 Fluka (Buchs, Schweiz)  
 Merck (Darmstadt)  
 Atto-Tec (Siegen)  
 Merck (Darmstadt)  
 Sigma (St. Louis, MO, US)  
 Serva (Heidelberg)  
 Riedel (Seelze)  
 Sigma (St. Louis, MO, US)  
 Gerbu (Wieblingen)  
 USB (Cleveland, OH, US)  
 Sigma (St. Louis, MO, US)  
 Merck (Darmstadt)  
 Fisher Scientific (Schwerte)  
 Merck (Darmstadt)  
 Merck (Darmstadt)

---

Glucose	Fluka (Buchs, Schweiz)
Glutaraldehyd	Sigma (St. Louis, MO, US)
Glycerin	Fluka (Buchs, Schweiz)
Glycin	USB (Cleveland, OH, US)
Harnstoff, p.a.	Fluka (Buchs, Schweiz)
Harnstoff, ultra pure	USB (Cleveland, OH, US)
HCl, 37% Lösung	Merck (Darmstadt)
Hefe-Extrakt	Oxoid (Cambridge, UK)
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Merck (Darmstadt)
Imidazol	Sigma (St. Louis, MO, US)
IPTG	Gerbu (Wieblingen)
Isopropanol Chromasolv	Sigma (St. Louis, MO, US)
KCl	Sigma (St. Louis, MO, US)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fluka (Buchs, Schweiz)
KI	Merck (Darmstadt)
Kupfer(III)sulfat x 5H <sub>2</sub> O	Merck (Darmstadt)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
MgCl <sub>2</sub>	Merck (Darmstadt)
Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	Merck (Darmstadt)
NaCl	Sigma (St. Louis, MO, US)
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Merck (Darmstadt)
NaDOC	Merck (Darmstadt)
NaOH	Merck (Darmstadt)
Natriumacetat	Fluka (Buchs, Schweiz)
Natriumtartrat	Merck (Darmstadt)
Natriumthiosulfat	Roth (Karlsruhe)
Nickel(II)sulfat	Sigma (St. Louis, MO, US)
Ponceau S	Sigma (St. Louis, MO, US)
Rotiphorese, 30% (w/v)	Roth (Karlsruhe)
Saccharose	Sigma (St. Louis, MO, US)
SDS	Roth (Karlsruhe)
Silbernitrat	Merck (Darmstadt)
TCA	Merck (Darmstadt)
TCEP	Molecular Probes (Eugene, OR US)
TEMED	Sigma (St. Louis, MO, US)
Tricin	Roth (Karlsruhe)
Trifluoressigsäure (TFE)	Boehringer (Ingelheim)
Tris	Sigma (St. Louis, MO, US)
Trypton	Oxoid (Cambridge, UK)
Tween 20	Merck (Darmstadt)

### 2.1.4 Proteine, Antibiotika, Enzyme, Fluoreszenzfarbstoffe und Antikörper

Bezeichnung	Hersteller/Händler
Benzonase <sup>®</sup> , Reinheitsgrad II 250U/μl	Merck (Darmstadt)
BSA	Sigma (St. Louis, MO, US)
Protease-Inhibitoren Mix III	Roche (Mannheim)
Ampicillin (c <sub>end</sub> 200 μg/ml)	Sigma (St. Louis, MO, US)
Chloramphenicol (c <sub>end</sub> 25 μg/ml)	Fluka (Buchs, Schweiz)
Pfu ultra II DNA-Polymerase 2,5U/μl	Stratagene (Santa Clara, CA, US)
Pfu Puffer	Stratagene (Santa Clara, CA, US)
Thermo-Sequenase 4U/μl	USB (Cleveland, Ohio, US)
ddNTP-Mix	USB (Cleveland, Ohio, US)
dNTP-Mix	Fermentas (St. Leon-Rot)
Atto520 Maleimid	Atto-Tec (Siegen)
Atto647N Maleimid	Atto-Tec (Siegen)

#### Primäre Antikörper

Maus-anti-His Antikörper (monoklonal, Sigma St. Louis, MO, US) verdünnt 1:7.500 in 1x TBS; 0,05% (v/v) Tween 20

Hase-anti-P1-Loop (YidC) Antikörper Serum (polyklonal, Kankurnaz-Apa 2004 Diplarbeit) verdünnt 1:10.000 in 1 x TBS

#### Sekundäre Antikörper

Schaf-anti-Maus Antikörper (monoklonal, GE Healthcare Uppsala, Se), Peroxidase konjugiert, verdünnt 1:12.000 in 1x TBS; 0,05% (v/v) Tween 20

Ziege-anti-Hase Antikörper (polyklonal, Sigma St. Louis, MO, US), Peroxidase konjugiert, verdünnt 1:12.000 in 1xTBS; 0,05% (v/v) Tween-20

### 2.1.5 Lipide, Plasmide und *E.coli* Stämme

#### Semisynthetische Lipide

1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholine (DOPC)	Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, US)
1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-[Phospho- <i>rac</i> -(1-glycerol)] (DOPG)	Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, US)
1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphoethanolamin (DOPE)	Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, US)

## Plasmide

### pMS119

Der Expressionsvektor pMS119 besitzt einen *tac*-Promotor mit zugehörigem *lacI*-Gen. Zusätzlich verfügt das Plasmid als Selektionsmarker über ein  $\beta$ -Lactamase-Gen (*bla*) und damit über eine Ampicillin-Resistenz.

Die Gene der Proteine Pf3-16C coat und Pf3-48C coat sind über eine *XbaI* und *EcoRI*-Schnittstelle in die MCS (HE) kloniert und enthalten eine Ribosomenbindestelle aus dem pT7-7 Vektor (Kankurnaz-Apa 2004, Diplomarbeit).

Bei dem Gen des Pf3-19A Proteins ist der transmembrane Bereich gegen 19 Alanine ausgetauscht (über eine *SpeI* und *EcoRI*-Schnittstelle). Das Gen der Mutante ist über die *XbaI* und *BamHI*-Schnittstelle in die MCS (HE) kloniert, wobei die Ribosomenbindestelle aus dem pT7-7 Vektor enthalten ist (Xie et al. 2007).

Die Gene der Einzel-Cystein Mutanten von YidC (außer 7C und 423SIM60) sind über die Schnittstellen *EcoRI* und *HindIII* in die MCS (EH) kloniert, besaßen damit eine Ribosomenbindestelle aus dem pT7-7 Vektor und wurden für die Arbeit zur Verfügung gestellt.

### pGZ119

Der Expressionsvektor pGZ119 ist ähnlich aufgebaut wie der pMS119 Vektor. Er besitzt einen *tac*-Promotor und das Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen (*cat*) mit daraus resultierender Chloramphenicol-Resistenz.

Die Gene der YidC Mutanten 7C und 423SIM60 (C423S – für die Quick Change Mutagenese) sind über die *EcoRI* und *HindIII* Schnittstelle in die MCS (EH) kloniert, besaßen damit eine Ribosomenbindestelle aus dem pT7-7 Vektor und wurden in dieser Arbeit zur Verfügung gestellt.

## *E. coli* Stämme

### XL1 Blue (Bullock et al., 1987)

Genotyp: *supE44; recA1; endA1; gyrA96; thi-1; hsdR17; glnV44; relA1; lac<sup>-</sup> F[proAB<sup>+</sup>lacI<sup>q</sup>lacZ $\Delta$ M15Tn10(tet<sup>r</sup>)]*

Dieser Stamm gehört der K12-Gruppe von *E. coli* an und ist rekombinationsdefizient. Diese Zellen sind hoch chemokompetent und werden daher für Klonierungen und zur DNA-Präparation eingesetzt.

**C43 (Miroux und Walker, 1996)**

Genotyp: *F – ompT hsdSB (rb- mb-) gal dcm (DE3)*

*E.coli* C43 (DE3) ist ein Derivat des BL21 (DE3) Stammes, welcher eine erhöhte Effizienz bei der Expression toxischer rekombinanter Proteine aufweist.

**MK6S (generiert aus MC1061 nach Wanner)**

Genotyp: *F- araD139Δ(ara-leu)7696 galE15 galK16 Δ(lac)X74 rpsL (Str<sup>r</sup>) hsdR2 (r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>)mcrA mcrB1 p<sub>ara</sub>YidC*

Dieser Stamm wurde ausgehend vom Stamm MC1061 (Casabadian und Cohen, 1980) durch die Methode nach Wanner erzeugt. Im MK6 Stamm unterliegt das chromosomale *yidC* Gen der Kontrolle des araBAD Promotors und kann daher nur durch Anwesenheit von Arabinose im Medium induziert werden.

**2.1.6 Oligonukleotide und Sequenzierprimer****Oligonukleotide** (Eurofins MWG Operon, Ebersberg)

Oligonukleotide zum Einbau eines Cysteins anstelle des Glutamins an Position 16 des Pf3-19A coat Proteins

**Pf319A16C-1:**

5' –g aca gcg gtg **tgt** gct gat act ag- 3'                      Tm: 70°C

**Pf319A16C-2:**

5' – ct agt atc agc **aca** cac cgc tgt c- 3'                      Tm: 70°C

Oligonukleotide zum Austausch des Serins an Position 405 gegen ein Cystein in der YidC Mutante 423SIM60 (natürlich vorkommendes Cys an Position 423 gegen Ser ausgetauscht - Institutsbestand)

**S405C-1:**

5' – cag cgt atc **tgt** cag gaa atg – 3'                      Tm: 62,2°C

**S405C-2:**

5' – cat ttc ctg **aca** gat acg ctg – 3'                      Tm: 62,2°C

## Sequenzierprimer

### IMID

5' – gca aca gta ttt cgc gac gg – 3'

Tm: 58°C

### Tack back

5' – ggc tga aaa tct tct ctc atc cg – 3'

Tm: 59°C

## 2.1.7 Puffer

### Sequenzierung

TBE (10x) 0,89 M Tris/HCl pH 8,3; 0,89 M Borsäure, 0,02 M EDTA;

Stop-Lösung 95% (v/v) Formamid; 10 mM EDTA; 0,1% (w/v) basisches Fuchsin; 0,01% (w/v) Bromphenolblau; pH 9,0

### Reinigung

PBS (10x) 1,4 M NaCl; 27 mM KCl; 101 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O; 18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

### YidC WT

Solubilisierungspuffer 1 x PBS pH 7,4; 150 mM NaCl; 20 mM Imidazol; 0,5 mM TCEP; 1% (w/v) DDM

Waschpuffer 1 x PBS pH 7,4; 150 mM NaCl; 40 mM Imidazol; 0,5 mM TCEP; 0,03% (w/v) DDM

Elutionspuffer 1 x PBS pH 7,4; 150 mM NaCl; 400 mM Imidazol; 0,5 mM TCEP; 0,2% (w/v) DDM

### YidC Cystein Mutanten

Solubilisierungspuffer 20 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 15 mM Imidazol; 0,4 mM TCEP; 1% (w/v) DDM

Waschpuffer 20 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 40 mM Imidazol; 0,4 mM TCEP; 0,03% (w/v) DDM

Elutionspuffer 20 mM Tris/HCl pH 7,0; 100 mM NaCl; 400 mM Imidazol; 0,4 mM TCEP; 0,1% (w/v) DDM

### Pf3 coat Cystein Mutanten

Solubilisierungspuffer 100 mM Tris/HCl pH 8,5; 8 M Harnstoff

Laufpuffer A RP-FPLC 100 mM Tris/HCl pH 8,5; 5% (v/v) Isopropanol; 0,1% (v/v) TFE

Laufpuffer B RP-FPLC 100 mM Tris/HCl pH 8,5; 80% (v/v) Isopropanol; 0,1% (v/v) TFE

Laufpuffer Superdex 200 100 mM Tris/HCl pH 8,0; 10% (v/v) Isopropanol

Laufpuffer Superdex 75 100 mM Tris/HCl pH 7,5; 10% (v/v) Isopropanol

**SDS-PAGE**

Laufpuffer (10x)	247 mM Tris; 34,6 mM SDS; 1,9 M Glycin
Probenpuffer (5x)	Lösung 1: 200 mM Tris/HCl pH 6,8; 20 mM EDTA Lösung 2: 83 mM Tris/HCl pH 6,8; 29% (v/v) Glycerin; 8,3% (w/v) SDS; 0,146% (w/v) BPB

→ 500 µl Lösung 1 + 400 µl Lösung 2 + 100 µl 1 M DTT

Probenpuffer ohne BPB	0,3 M Tris/HCl pH 6,8; 50% (v/v) Glycerin; 5% (w/v) SDS
-----------------------	--

→ 900 µl Probenpuffer ohne BPB + 100 µl 1 M DTT

Upper Tris	2 M Tris/HCl pH 8,8
Lower Tris	1 M Tris/HCl pH 6,8
Färbelösung	25% (v/v) Isopropanol; 10% (v/v) Essigsäure; 0,05% (w/v) Coomassie R250
Entfärber	10% (v/v) Essigsäure

Anleitung für 4 Minigele

Trenngel (12%)	12 ml Rotiphorese; 5,6 ml Upper Tris; 12,1 ml H <sub>2</sub> O; 120 µl 25% (w/v) SDS; 150 µl 10% (w/v) APS; 10 µl TEMED
Sammelgel (6%)	2,66 ml Rotiphorese; 2,5 ml Lower Tris; 14,6 ml H <sub>2</sub> O; 80 µl 25% (w/v) SDS; 100 µl 10% (w/v) APS; 10 µl TEMED

**SDS-Tricin-Gele**

Gelpuffer	3 M Tris/HCl pH 8,45; 0,3% (w/v) SDS
Anodenpuffer	0,2 M Tris/HCl pH 8,9
Kathodenpuffer	0,1 M Tris/HCl pH 8,25; 0,1 M Tricin; 0,1% (w/v) SDS

Anleitung für 4 Minigele

Trenngel (15%)	15 ml Rotiphorese; 10 ml Gelpuffer; 4 g Glycerin; 1 ml H <sub>2</sub> O; 100 µl 10% (w/v) APS; 10 µl TEMED
Spacergel (10%)	825 µl Rotiphorese; 1 ml Gelpuffer; 1,2 ml H <sub>2</sub> O; 10 µl 10% (w/v) APS; 1 µl TEMED
Sammelgel (4%)	550 µl Rotiphorese; 1,25 ml Gelpuffer; 3,25 ml H <sub>2</sub> O; 40 µl 10% (w/v) APS; 4 µl TEMED

**Silberfärbung**

Fixierer	40% (v/v) Ethanol; 10% (v/v) Essigsäure
Sensitivierer	30% (v/v) Ethanol; 0,03% (v/v) Glutaraldehyd; 8 mM Natriumthiosulfat; 0,83 M Natriumacetat
Silberlösung	14,7 mM Silbernitrat + 0,015% (v/v) Formaldehyd
Entwickler	236 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> + 0,008% (v/v) Formaldehyd
Stopplösung	50 mM EDTA

**Western Blot**

Transferpuffer (5x)	125 mM Tris; 1 M Glycin
TBS-Puffer (10x)	250 mM Tris/HCl pH 7,4; 27 mM KCl; 1,37 M NaCl
Ponceau S Lösung	0,1% (w/v) Ponceau S; 5% (v/v) Essigsäure
LB-Medium	1% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) NaCl; 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt
LB-Agar-Platten	1% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) NaCl; 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt, 1,5% (w/v) Agar

**Proteinbestimmungstest Lowry&Peterson**

CTC-Lösung	0,5 Teile 0,2% (w/v) Cu(III)SO <sub>4</sub> x5H <sub>2</sub> O + 0,5 Teile 0,4% (w/v) Natriumtartrat + Teil 20% (w/v) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
Lösung A	gleiche Volumina: CTC-Lösung, 10% (w/v) SDS; 0,8 M NaOH und ddH <sub>2</sub> O

**FRET-Messungen**

Puffer für Proteoliposomen	20 mM Tris/HCl pH 7,0; 100 mM NaCl
Pf3-Puffer	20 mM Tris/HCl pH 7,0; 100 mM NaCl; 0,5% (v/v) Isopropanol

Bereits die Stammlösungen (1 M) von Tris und NaCl wurden mit Aktivkohle versetzt. 3 Tage vor den Messungen wurde der Puffer in seiner gewünschten Zusammensetzung hergestellt und nochmals mit Aktivkohle versetzt und am Tag der Messung steril filtriert. Beim Pf3-Puffer wurde das Isopropanol erst nach dem sterilfiltrieren zugesetzt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekular- und mikrobiologische Methoden

#### Quick Change Mutagenese

Für den Austausch einzelner Aminosäuren in Proteinen wird häufig die Methode der Quick Change verwendet. Dabei werden Primer konstruiert, welche das Triplet der gewünschten Aminosäure in der Mitte der Primersequenz enthalten. Beiderseits dieses Triplets werden jeweils 3 Triplets komplementär zur Ausgangs-DNA verwendet, wodurch die Primer fest an die Ausgangs-DNA binden können. Die Primer-Sequenzen sollten mit einem G oder C enden. Die beiden Primer sind zueinander revers komplementär. In dieser Arbeit wurde mit Hilfe der Quick Change das Glutamin gegen ein Cystein an Position 16 des Pf3-19A coat Proteins ausgetauscht. Als Ausgangs-DNA diente das *pf319A*-Gen im pMS119HE Vektor aus Institutsbeständen. Der Quick Change Ansatz sowie das verwendete PCR-Programm sind in Tabelle 2-1 zusammengefasst. Neben der Pf3 Mutante wurde auch die YidC-405C Mutante durch die Methode der Quick Change erzeugt. Dabei wurde das Serin an Position 405 gegen ein Cystein ausgetauscht. Als Ausgangs-DNA diente das *423SIM60* Gen im pGZ119EH Vektor aus Institutsbeständen. Diese Mutante verfügte bereits über eine Substitution des natürlich vorkommenden Cysteins an Position 423 gegen ein Serin. Der Quick Change Ansatz sowie das verwendete PCR-Programm sind in Tabelle 2-1 zusammengefasst.

Reagenz / Enzym	Volumen (µl)	PCR- Zeit (sec)	PCR-Temperatur (°C)
H <sub>2</sub> O	40	120	95
Pfu-Puffer (10x)	5	30	95
Primer 1	1	30	50
Primer 2	1	150	72
Ausgangs-DNA	1	420	72
dNTP Mix	1	∞	7
Pfu ultra II	1	-	-

Tabelle 2-1: Reaktionsansatz für die Quick Change Mutagenese und dabei verwendetes PCR-Programm.

#### Herstellung chemokompetenter Zellen

Die für die Transformation verwendeten *E. coli* Stämme XL1 bzw. C43 wurden über Nacht bei 37°C in 3 ml LB-Medium herangezogen. Mit der Übernachtskultur wurden 100 ml LB-Medium 1:200 angeimpft und bei 37°C geschüttelt, bis eine Zellzahl von 2

$\times 10^8$  erreicht wurde. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei  $3000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  für 10 min sedimentiert und in 10 ml eiskaltem Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0; 100 mM  $\text{CaCl}_2$ ) resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen nochmals zentrifugiert und in 5 ml eiskaltem 10 mM Tris/HCl pH 8,0; 100 mM  $\text{CaCl}_2$  Puffer resuspendiert. Nach 2-stündiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen zu je 100  $\mu\text{l}$  aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### **Transformation**

Die Einzel-Cystein Mutanten von YidC lagen im Vektor pMS119EH bzw. pGZ119EH vor und verfügten über einen am C-Terminus des Proteins befindlichen His<sub>10</sub>-tag. Die verwendeten Pf3 coat Mutanten lagen im Vektor pMS119HE vor. Die Plasmide wurden zunächst in chemokompetente *E. coli* XL-1 Zellen transformiert. Dabei wurden 50  $\mu\text{l}$  kompetente Zellen mit 1  $\mu\text{l}$  Plasmid-DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 90 s bei  $42^\circ\text{C}$ , welcher die Zellmembran kurzzeitig porös macht, wodurch die Plasmid-DNA von den Zellen aufgenommen werden kann. Die anschließende Inkubation für 5 min auf Eis kehrt den hitzebedingten Effekt um, so dass die Zellmembran wieder in ihren ursprünglichen Zustand zurückkehren kann. Danach wurden 49  $\mu\text{l}$  LB-Medium zu den Zellen gegeben und mindestens 30 min unter leichtem Schütteln bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Selektion von transformierten Zellen erfolgte durch die Ausplattierung der Bakterien auf LB-Agar Platten mit dem der Resistenz der Plasmide entsprechenden Antibiotika. Aus den XL-1 Zellen wurde später die Plasmid-DNA unter Verwendung eines Extraktions-Kits (Zyppy™ Hiss Diagnostics GmbH, Freiburg) nach Herstellerangaben isoliert. Für die spätere Überexpression der plasmid-codierten Gene wurden die Plasmide in den Expressionsstamm C43 wie beschrieben transformiert.

### **Sequenzierung**

Für die Überprüfung der Mutagenese wurde die Plasmid-DNA nach der Methode von Sanger (Sanger et al. 1977) sequenziert. Bei der auch als Kettenabbruch-Methode benannten Sequenzierung wird die Replikation der als Einzelstrang vorliegenden DNA an verschiedenen Stellen durch den Einbau von 2,3-Didesoxyribonukleotid-triphosphaten (ddNTPs) abgebrochen. Für die Sequenzierung benötigt man die zu sequenzierende DNA, fluoreszenzmarkierte Primer, DNA-Polymerase I (Thermosequenase) sowie die 4 Basen in Form von ddNTPs. Das Pipettierschema und das Programm der Sequenzier-PCR sind in Tabelle 2-2 zusammengefasst. Nach beendeter Reaktion wurden zu jedem Ansatz 2  $\mu\text{l}$  Stopplösung (Thermosequenase Kit) pipettiert. Vor Beladen des Sequenziergels wurden die Proben 2 min bei  $75^\circ\text{C}$  erhitzt und je 1,7  $\mu\text{l}$  auf das Gel geladen.

### Herstellung des Sequenziergels

Die verwendete Gelapparatur von Licor wurde nach Anleitung zusammengesetzt. Anschließend wurden 21 g Harnstoff (ultra pure Licor Qualität) in 6 ml 10 x TBE Puffer (Abschnitt 2.1.7), 6 ml Long Range<sup>TM</sup> Puffer und 10 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst und mit ddH<sub>2</sub>O auf 50 ml aufgefüllt. Zur Vermeidung von Luftblasen im Gel wurde der Puffer entgast. Zum Gießen des Untergels und damit zum Abdichten der Apparatur wurden 3 ml der Lösung abgenommen und mit 32 µl 10% (w/v) APS und 4 µl TEMED versetzt. Nach Auspolymerisierung des Untergels wurden zu den verbliebenen 47 ml Gellösung 250 µl 10% (w/v) APS und 25 µl TEMED pipettiert und unter Verwendung einer Spritze zwischen die Glasplatten gegossen und der Kamm platziert.

Das auspolymerisierte Gel wurde in das automatische Sequenziergerät gespannt und die Daten nach erfolgtem Lauf am PC ausgewertet.

Reagenz / Enzym	Volumen (µl)	PCR- Zeit (sec)	PCR-Temperatur (°C)
Plasmid-DNA	12,5	120	95
DNA-Pol Puffer (10x)	2,5	30	95
Primer (IMID/Tack back)	1	30	59
Thermosteasenase	1,5	60	72
ddNTPs	4	420	72
-	-	∞	7

Tabelle 2-2: Ansatz der Sequenzier-Reaktion sowie das verwendete PCR-Programm.

### Überexpression plasmid-codierter Gene

Das in dieser Arbeit genutzte System zur Überexpression bakterieller Proteine in *E. coli* basiert auf deren Transkriptionskontrolle durch den *tac*-Promotor, einem Hybrid aus dem *lac*- und dem *trp*-Promotor (de Boer et al. 1983). Daher hat der *tac*-Promotor die hohe Transkriptionseffizienz des *trp*-Promotors und die leichte Induzierbarkeit des *lac*-Promotors. Der Promotor befindet sich im 5' Bereich der multiplen Klonierungsstelle der verwendeten Vektoren pMS119EH und pGZ119EH. Der *lac*-Repressor ist – zusätzlich zum chromosomalen Gen – auf dem pMS und pGZ Vektor codiert und wird konstitutiv reprimiert. Durch Zugabe von IPTG oder Lactose zum Kulturmedium wird die Affinität von LacI zum *lac*-Operon verringert und daher die RNA-Polymerase synthetisiert. Die hohe Aktivität dieser Polymerase bewirkt eine starke Transkription der unter Kontrolle des *tac*-Promotors stehenden Gene.

Für die Kultivierung im 5 L Schikanekolben wurden 5 ml LB-Medium mit dem Plasmid entsprechenden Antibiotika mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 110 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden je 2 L LB-Medium 1:100 mit der Vorkultur angeimpft und bei 37°C und 100 rpm bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5 – 0,6 geschüttelt. Anschließend erfolgte die Induktion der Genexpression mit 0,5 – 1 mM IPTG für 3 h bei 37 °C unter Schütteln. Nach dreistündiger Expression wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 3000 x g für 10 min bei 4°C sedimentiert. Anschließend wurde das Medium dekantiert und die Zellen in Puffer (20 mM Tris/HCl pH 8,0; 5% (w/v) Saccharose; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 2 ml Puffer pro 1 g Zellen) resuspendiert. Im Fall der Pf3 coat Proteine wurden die Zellen anschließend in Form von Zellnuggets bei –80°C schockgefroren und bei –20°C gelagert.

### Komplementation

Mit Hilfe eines Komplementationstests wurde die Funktionalität der verwendeten Cystein Mutanten von YidC überprüft. Bei dem hierfür verwendeten MK6S Stamm steht das chromosomale YidC unter der Kontrolle des *araBAD* Promotors (Guzman 1995). Dieser Promotor wird durch Arabinose induziert (Lee et al. 1980, Lee et al. 1987) und das dahinter liegende Gen kann abgelesen werden. Glucose reprimiert dagegen den Promotor und es erfolgt keine Expression. Die zu testenden YidC-Mutanten lagen in den Plasmiden pMS119EH bzw. pGZ119EH vor, welche über einen IPTG induzierbaren *tac*-Promotor verfügten (de Boer et al. 1983). Nach erfolgter Induktion kann das hinter dem Promotor liegende Gen abgelesen werden. Bei den mit diesen Plasmiden transformierten MK6S Zellen sollte das durch Glucose reprimierte chromosomale YidC durch plasmid-codiertes YidC nach Induktion mit IPTG komplementiert werden. Als Positivkontrolle diente wildtypisches YidC und als Negativkontrolle dienten die leeren Vektoren pMS119EH und pGZ119EH.

Für jede Mutante bzw. Kontrolle wurde eine Übernachtskultur in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit einer Einzelkolonie angeimpft. Am nächsten Tag wurden 2 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum und 0,2% (w/v) Glucose angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Danach wurde jeweils eine Verdünnungsreihe von 10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-4</sup> in LB-Medium hergestellt und anschließend jeweils 20 µl auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum und 0,2% (w/v) Arabinose bzw. Glucose gespottet. Zudem enthielt ein Teil der LB-Agarplatten 0,2% (w/v) IPTG zur Induktion der plasmid-codierten Proteine. Die Platten wurden unter der Sterilbank getrocknet und über Nacht bei 37°C inkubiert.

## 2.2.2 Proteinchemische Methoden

### Reinigung von YidC WT und Einzel-Cystein Mutanten

Zu den resuspendierten Zelle wurde Complete® Protease-Inhibitorenmix III nach Herstellerangaben zugesetzt und die Zellen mittels French Press mit 8000 psi in 3 Durchgängen aufgeschlossen. Anschließend wurden 500 Units Benzonase® zugegeben und 10 min auf Eis inkubiert zum Abbau der DNA und RNA. Anschließend wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation für 10 min bei 6000 x g und 4°C sedimentiert, bevor die Membranfraktion durch einen Ultrazentrifugationsschritt für 50 min bei 150000 x g und 4°C sedimentiert wurde. Die Membranproteine des Pellets wurden anschließend in 10 ml Solubilisierungspuffer durch Rühren für 30 min auf Eis und anschließendem Pottern solubilisiert. Zur Abtrennung nicht-solubilisierter Bestandteile wurde nochmals für 1 h bei 150000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit zuvor äquilibrierter Ni-NTA Matrix 1,5 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert und anschließend in eine 5 ml Einwegspritze überführt. Nach dem Waschschrift mit 20 ml Waschpuffer erfolgte die Elution der His-getaggten Proteine über 6 Fraktionen á 2 ml. Der Reinigungserfolg wurde durch Auftrennung der Elutionsfraktionen über eine SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung überprüft.

### Reinigung von Pf3 coat Einzel-Cystein Mutanten

5 g eingefrorene Zellnuggets wurden in 25 ml 0,1 M Tris/HCl pH 8,5 resuspendiert und die Zellen mittels French Press bei 8000 psi in 3 Durchgängen aufgeschlossen. Nach Abtrennung von Zelltrümmern durch Zentrifugation für 10 min bei 6000 x g und 4°C erfolgte die Sedimentierung der Membranfraktion durch einen Ultrazentrifugationsschritt für 50 min bei 150000 x g und 4°C. Die Solubilsierung der Membranproteine erfolgte durch Inkubation für 2 h bei 18°C in 5 ml Solubilisierungspuffer. Der so erhaltene Rohextrakt wurde zunächst in 5 ml Fraktionen über eine mit Puffer A äquilibrierte Umkehrphasen-Chromatografiesäule gereinigt. Das hydrophobe Pf3 coat sollte somit an die ebenfalls hydrophobe Matrix der Säule binden. Die Elution gebundener Proteine erfolgte über einen Gradienten von 5 – 80% (v/v) Isopropanol (mit Puffer B) in 5 ml Fraktionen bei einer Fließgeschwindigkeit von 1,5 ml/min. Aus den vereinten Protein enthaltende Fraktionen, eluiert durch den Gradienten, musste zunächst das Isopropanol bis auf 10% (v/v) am Rotationsverdampfer entfernt werden, da die nachfolgenden Gelchromatografie-Materialien nur maximal 10% (v/v) Isopropanol vertrugen. Anschließend wurden die Fraktionen mittels der Amicon Rührzelle auf ein Volumen von 5 ml eingengt und diese auf eine äquilibrierte Superdex 200 16/60 Säule geladen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min und die eluierten Proteine wurden in 2 ml Fraktionen gesammelt. Die Protein enthaltenden Fraktionen, gemessen über die

Absorption bei 280 nm, wurden vereinigt. Die zuvor mittels einer Amicon Rührzelle auf 5 ml konzentrierte Proteinfraction wurde auf die äquilibrierte Superdex 75 16/60 Säule geladen und das Pf3 coat bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min in 2 ml Fraktionen eluiert. Der Reinigungserfolg wurde durch Auftrennung der Proteinenthaltenden Fraktionen über eine SDS-Tricin-PAGE und anschließender Silberfärbung überprüft.

### **Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)**

Zur Bestimmung der Homogenität von Proteinproben wurde die Methode der diskontinuierlichen denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli angewendet (Laemmli 1970). Das im SDS-Ladepuffer zugesetzte anionische Detergenz SDS wird von den meisten Proteinen gebunden. Die Proteine erhalten somit proportional zur Masse des Proteins eine negative Gesamtladung. Damit ist das elektrophoretische Verhalten der Proteine in der SDS-PAGE nur vom Siebeffekt der Gelmatrix abhängig. Die Porengröße und Effizienz der Auftrennung richtet sich nach der Polyacrylamidkonzentration und dem Vernetzungsgrad. Es wurden 12 % SDS- und 15 % SDS-Tricin Trenngele verwendet, wodurch Proteine mit einer Größe von 15 bis 200 kDa sowie 1 bis 100 kDa (nach Schägger et al. 1987, abgeändert) gut getrennt werden können.

Die Proteinproben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 60 °C erhitzt und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei 17 mA.

Die Detektion von Proteinbanden nach der Gelelektrophorese erfolgte durch Anfärben mit dem Farbstoff Coomassie R-250. Dazu wurden die Gele in einem geeigneten Plastikgefäß mit der Färbelösung für mindestens 30 min inkubiert. Überschüssige Farbstoffteilchen wurden durch Erhitzen und mindestens 15 min Schwenken mit Entfärbelösung aus dem Gel gewaschen.

Fluoreszenzmarkierte Proben wurden mit Probenpuffer ohne Bromphenolblau versetzt. Während der PAGE wurden die Gele von Licht abgeschirmt.

### **Silberfärbung**

Nach der elektrophoretischen Auftrennung können Proteine im Polyacrylamid-Gel angefärbt werden. Voraussetzung hierfür ist die Fixierung der Proteine im Gel und das Auswaschen störender Substanzen wie z.B. SDS. Die Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen durch Silberfärbung ist die sensitivste unspezifische Färbemethode für Proteine. Mit Hilfe der Silberfärbung können Proteinmengen von bis zu 5 ng pro Bande nachgewiesen werden. Das Prinzip der Silberfärbung besteht darin, dass die Silberionen Komplexe mit den Glutamat-, Aspartat- und Cystein-Resten der Proteine bildet. Alkalisches Formaldehyd reduziert das  $\text{Ag}^+$  der Komplexe zu elementarem Silber.

Das SDS-Gel wurde nach der Elektrophorese für mindestens 30 min im Fixierer inkubiert und anschließend für 20 min im Sensitivierer geschwenkt. Anschließend wurde 3 mal 5 min mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Danach wurde das Gel für 20 min in Dunkelheit mit der Silberlösung inkubiert, anschließend 2 mal 1 min in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und schließlich im Dunkeln mit Entwicklerlösung inkubiert bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Die Färbereaktion wurde durch Inkubation mit der Stopplösung beendet.

### **Western Blot (semi-dry)**

Nach der Proteinauftrennung in der SDS-PAGE erfolgte der Elektrotransfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran. Die Semidry Westernblotting Apparatur besteht aus zwei Plattenelektroden, zwischen denen das Blotsandwich, bestehend aus 2 Filterpapieren, Gel und Membran und nochmals 2 Filterpapieren, horizontal eingebaut wird. Dabei werden die in Transferpuffer getränkten Filterpapiere, das Gel und die Membran in einer definierten Reihenfolge aufgeschichtet. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung von 10 V für 1 h wandern die negativ geladenen Proteine aus dem SDS-Gel auf die Nitrocellulosemembran.

Zur Fixierung und Überprüfung der erfolgreichen Übertragung der Proteine auf der Nitrocellulosemembran wurde diese für 5 min in Ponceau S-Lösung geschwenkt. Der rote Azofarbstoff bindet reversibel an positiv geladene Aminogruppen der Proteine. Nach mehrmaligem Spülen mit ddH<sub>2</sub>O, zur Entfernung der PonceauS -Lösung, wurde die Membran für mind. 1 h bei RT bzw. über Nacht bei 4°C schüttelnd mit 1 X TBS und 5% (w/v) Magermilch inkubiert. Durch das sogenannte Blocken wird die Membran mit Proteinen gesättigt, um später unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu verhindern.

Anschließend wurde bei RT dreimal 5 min mit Puffer gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem verdünnten primären Antikörper für mind. 1,5 h bei RT bzw. über Nacht bei 4°C. Nach anschließenden drei Waschsritten á 5 min mit Puffer wurde die Membran mit dem verdünnten sekundären Antikörper 1 h bei RT inkubiert. Anschließend folgten drei Waschsritte á 5 min bei RT. Die Visualisierung der Proteine erfolgte durch eine *enhanced chemiluminescence* (ECL) Reaktion mit der an den sekundären Antikörper gekoppelten Meerrettich-Peroxidase.

### **Bestimmung der Proteinkonzentration**

#### **Lowry & Peterson (Peterson 1977)**

Für die Konzentrationsbestimmungen von Proteinen wurde die 1977 durch Gary L. Peterson abgewandelte Methode von Lowry verwendet. Zunächst wurden für die Eichkurve 0 – 100 µg BSA in 1 ml ddH<sub>2</sub>O angesetzt. Zur Konzentrationsbestimmung der Proben wurden jeweils 20 – 60 µl ebenfalls in 1 ml ddH<sub>2</sub>O angesetzt.

Anschließend wurden die Proteine mit 0,015% (w/v) NaDOC und 7,2% (w/v) TCA für 1 h bei RT gefällt und 12 min bei 20.000 x g sedimentiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und die Pellets an der Luft getrocknet. Anschließend wurden die Pellets mit 500 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und mit je 500 µl Lösung A versetzt, gevortext und 10 min bei RT inkubiert. Dann wurden die Proben mit je 250 µl Lösung B (Mischung 1:6 Folin-Reagenz mit ddH<sub>2</sub>O) versetzt und sofort gevortext. Nach 30 – 60 min Inkubation bei RT wurde die Absorption in 1 cm Sparküvetten bei 750 nm gegen Wasser gemessen.

$$y = a \cdot x^b \quad \text{Gleichung 2-1}$$

Zur Auswertung wurden die Absorptionswerte der Eichkurve gegen die eingesetzte BSA-Konzentration aufgetragen und ein Kurvenfit nach Gleichung 2-1 durchgeführt.

### BCA-Test

Zur Bestimmung der Konzentration an gereinigtem Pf3 coat Protein wurde der BCA-Test verwendet. Dieser Test beruht auf der Bildung eines stabilen violetten Kupferkomplexes nach der Biuret-Reaktion. Dabei wird Cu<sup>2+</sup> durch die oxidierten Peptidbindungen sowie die oxidierten Aminosäurereste von Tryptophan, Cystein und Tyrosin zu einwertigem Cu<sup>+</sup> reduziert, welches dann mit der Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex bildet.

Als Standard wurde BSA verwendet. Dazu wurde eine Eichreihe im Bereich von 25 bis 1000 µg/ml im selben Puffer wie das gereinigte Protein vorlag angesetzt. Sowohl vom Standard wie auch von den Proteinproben wurden je 50 µl in einer Doppelbestimmung angesetzt. Anschließend wurden laut Anleitung des BCA-Kits (Pierce) 50 Teile Lösung A mit 1 Teil Lösung B gemischt und zu jeder Probe 1 ml BCA-Reagenz gegeben und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Abkühlen der Ansätze auf RT wurde die Absorption bei 562 nm gegen Wasser gemessen.

### 2.2.3 Fluoreszenzmarkierung von Einzel-Cystein Mutanten

Damit die gereinigten Proteine später für die Einzelmolekülmessungen verwendet werden konnten, wurden die Einzel-Cystein Mutanten von YidC und Pf3 coat Protein spezifisch markiert. Dazu wurden die Farbstoffe Atto520 Maleimid für Pf3 coat und Atto647N Maleimid für YidC verwendet. Das Maleimid der Farbstoffe wird bei der Kopplungsreaktion kovalent an die Thiolgruppe des Cystein-Restes, unter Bildung einer Kohlenstoff-Schwefel Bindung gebunden.

Für die Fluoreszenzmarkierung wurde zunächst der jeweilige Farbstoff in DMSO gelöst. Zur Konzentrationsbestimmung des gelösten Farbstoffs wurde eine 1:1000 Verdünnung in Wasser hergestellt und das Absorptionsspektrum des jeweiligen Farbstoffs aufgenommen.

	$\epsilon_{\max}$ ( $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )	$\lambda_{\max}$ (nm)
Atto520 Maleimid	$1,1 \times 10^5$	516
Atto647N Maleimid	$1,5 \times 10^5$	644

**Tabelle 2-3: Auflistung der Extinktionskoeffizienten und Absorptionsmaxima der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.**

Für die Berechnung der Konzentration wurde das Lambert-Beersche Gesetz angewendet. Die benötigten Parameter sind in Tabelle 2-3 zusammengefasst.

### **Markierung von YidC Einzel-Cystein Mutanten mit Atto647N Maleimid**

Für die Markierung wurden 200  $\mu\text{l}$  6 – 10  $\mu\text{M}$  gereinigtes Protein in ein 2 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und unter Stickstoffbegasung die äquimolare Konzentration an in DMSO gelöstem Farbstoff zugegeben und der Ansatz für mindestens 15 min lichtgeschützt auf Eis gerührt.

Zur Abtrennung freien Farbstoffs von markiertem Protein wurde der Ansatz auf eine mit Laufpuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,0; 100 mM NaCl; 0,03% (w/v) DDM) äquilibrierte Superdex 200 10/12 Säule geladen. Bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min eluierte das markierte Protein ohne freien Farbstoff nach 5 ml. Die Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und am Typhoon Fluoreszenzscanner mit einer Anregung von 635 nm und dem Emissions Filter BP 670/30 visualisiert. Fraktionen mit sowohl markiertem Protein als auch freiem Farbstoff wurden vereinigt, auf 200  $\mu\text{l}$  eingengt und nochmals über die Säule gereinigt. Markiertes Protein enthaltende Fraktionen wurden bei 4°C bzw. –20°C gelagert.

### **Markierung von Pf3 coat Einzel-Cystein Mutanten mit Atto520 Maleimid**

Zur Markierung der Pf3 coat Mutanten wurden 200  $\mu\text{l}$  20 – 100  $\mu\text{M}$  gereinigtes Protein in ein 2 ml Glasgefäß vorgelegt und unter Stickstoffbegasung ein 5fach molarer Überschuss an TCEP und der in DMSO gelöste Farbstoff in äquimolarer Konzentration unter Stickstoffbegasung zugegeben und der Ansatz lichtgeschützt 30 min bei RT durch leichtes Rühren inkubiert.

Anschließend wurde der Ansatz auf eine mit dem Laufpuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,0; 100 mM NaCl; 10% (v/v) Isopropanol) äquilibrierte Superdex 200 10/30 Säule geladen und bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min der freie Farbstoff vom markierten Protein abgetrennt. Die Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-Tricin PAGE aufgetrennt und am Typhoon Fluoreszenzscanner mit einer Anregung von 532 nm und dem Emissions Filter BP 555/20 visualisiert. Das Pf3 coat Protein eluierte nach ca. 18 ml. Fraktionen mit markiertem Protein wurden in mit Alufolie abgedunkelten Glasgefäßen bei 4°C gelagert.

### Bestimmung der Markierungseffizienz

Für die späteren Messungen im Einzelmolekülexperiment musste von den verwendeten markierten Proteinen die Markierungseffizienz bestimmt werden. Dies ist notwendig um den Anteil an markiertem Protein in den Messansätzen abschätzen zu können. Mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten des Farbstoffs, der Proteinkonzentration sowie dem Molekulargewicht des markierten Proteins kann die Markierungseffizienz nach Gleichung 2-2 berechnet werden.

$$\frac{A \cdot d}{\epsilon_{\max}} \cdot \frac{MW_{YidC}}{\text{mg Protein / ml}} = \frac{\text{mol Atto}}{\text{mol Protein}} \quad \text{Gleichung 2-2}$$

Dabei ist A die Absorption des Fluoreszenzfarbstoffs beim Absorptionsmaximum,  $\epsilon_{\text{Max}}$  der molare Extinktionskoeffizient des Farbstoffs beim Absorptionsmaximum in Wasser und d die Schichtdicke der Küvette.

#### 2.2.4 Herstellung semisynthetischer Liposomen

Es wurden sowohl reine DOPC-Lipide als auch eine Mischung aus 75% DOPE- und 25% DOPG- Lipiden (PE/PG) verwendet. Dazu wurden 60 mg Lipide in einen Rundkolben eingewogen und unter Stickstoffatmosphäre in 6 ml Dichlormethan gelöst. Anschließend wurde das Lösungsmittel in einem mit Stickstoff gefluteten Rotationsverdampfer entfernt, so dass ein Lipidfilm im Rundkolben zurückblieb. Dieser wurde dann an einer Drehschieberpumpe für 5 h bei 50 mbar getrocknet und anschließend in 1 ml entgastem Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7,0; 100 mM NaCl) pro mg eingesetztem Lipid unter Verwendung von Glaskügelchen resuspendiert, wodurch multilamellare Liposomen entstehen. Die resuspendierten Liposomen wurden aliquotiert und bis zur Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Während der gesamten Reinigung wurde der Kolben mit Alufolie gegen Licht abgeschirmt. Die Lipidkonzentration wurde durch die Methode der Phosphatbestimmung nach Ames ermittelt.

#### Phosphatbestimmung nach Ames (Ames 1966)

Für die Rekonstitution von Protein in Liposomen musste zunächst die Konzentration der hergestellten semisynthetischen Liposomen bestimmt werden. Dafür wurde die Methode nach Ames angewendet. Dabei wird als Phosphat-Standard  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  im Bereich von 0 bis 70 ng eingesetzt. Die Lipidprobe wurde 1:10 in  $\text{ddH}_2\text{O}$  verdünnt und davon 10  $\mu\text{l}$  eingesetzt. Zu den Proben wurde zunächst 30  $\mu\text{l}$  10% (w/v)  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (in 95% Ethanol gelöst) zugegeben und die Ansätze über der Bunsenbrennerflamme verascht bis keine nitrosen Gase mehr entweichen. Nach dem Abkühlen wurden 300  $\mu\text{l}$  0,5 M HCl zugegeben, die Röhrchen mit Glaskugeln verschlossen und 15 min in kochendem Wasser inkubiert. Danach wurden 700  $\mu\text{l}$  einer 1:7 Mischung von 10% (w/v) Ascorbinsäure mit 0,42% (w/v) Ammonium-

molybdat in konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  zugegeben, gemischt und anschließend 20 min bei  $45^\circ\text{C}$  im Wasserbad inkubiert. Nach dem Abkühlen der Röhrcchen wurde die Absorption bei 820 nm gegen  $\text{H}_2\text{O}$  gemessen.

## 2.2.5 YidC-Rekonstitutionsmethoden

### Biobeadsmethode (Rigaud et al. 1997, abgewandelt)

Zunächst wurden die semisynthetischen Liposomen mittels Ultraschall in unilamellare Liposomen verarbeitet. Die Liposomen wurden mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  auf 3 mM verdünnt und anschließend auf Eis für 5 min mit Ultraschall behandelt (Duty Cycle 50; output 3). Danach wurden die Liposomen mit 3 mM DDM versetzt und über Nacht auf dem Drehrad bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Dabei lagern sich die Detergenzmoleküle zwischen die Lipidmoleküle, wodurch die Liposomen aufquellen. Die vorgequollenen Liposomen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

Zur Rekonstitution wurden 500  $\mu\text{M}$  vorgequollene Liposomen mit 20 mM Tris/HCl pH 7,0; 100 mM NaCl in ein Reaktionsgefäß vorgelegt und 2  $\mu\text{M}$  gereinigtes YidC Protein zugegeben. Der Ansatz wurde für 2,5 h bei  $4^\circ\text{C}$  auf dem Drehrad vor Licht geschützt inkubiert. Anschließend wurde das Detergenz durch 2 stündige Inkubation des Ansatzes mit in Puffer äquilibrierten Biobeads entfernt. Das Detergenz adsorbiert dabei an die hydrophobe Oberfläche der Harzkügelchen und wird somit aus den Liposomen gezogen, so dass die Lipidmoleküle die hydrophoben Bereiche des Proteins umschließen. Für einen 200  $\mu\text{l}$  Ansatz wurden 30 bis 40 mg Biobeads eingesetzt. Durch anschließende Proteinkonzentrationsbestimmung konnte ein Protein:Lipid Verhältnis von 1:2500 bestimmt werden.

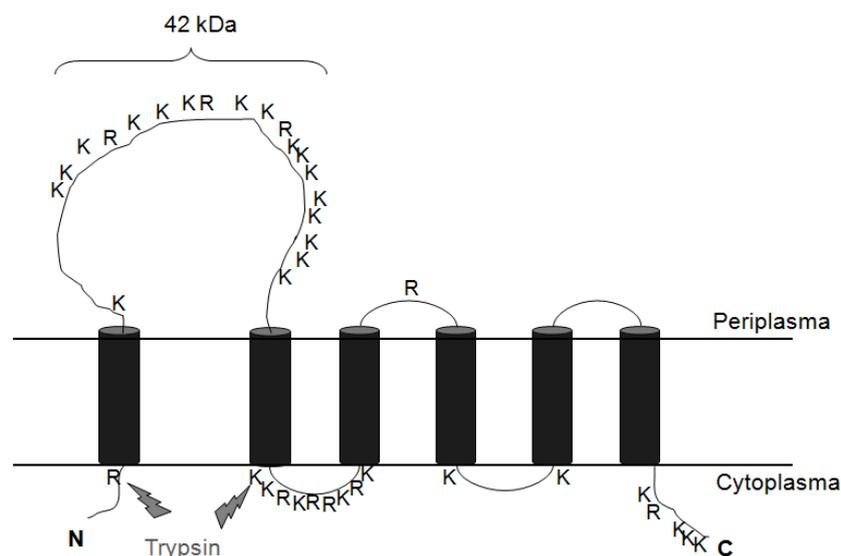
### Extrudermethode

Zur Bildung unilamellarer Vesikel (LUV – *large unilamellar vesicles*) wurden die Lipide auf 500 – 700  $\mu\text{M}$  mit 20 mM Tris/HCl pH 7,0; 100 mM NaCl verdünnt, anschließend 2  $\mu\text{M}$  gereinigtes YidC Protein zugegeben und 20 mal durch eine Membran mit 0,4  $\mu\text{m}$  Durchmesser extrudiert. Dabei platzen die zunächst als multilammellar vorliegende Vesikel auf und es bilden sich unilamellare Vesikel definierter Größe ( $\varnothing$  ca. 250 nm). Bei diesem Prozess baut sich das in den Ansatz gegebene YidC Protein in die Vesikel ein. Die Größenverteilung der extrudierten Liposomen wurde unter Verwendung der dynamischen Lichtstreuung untersucht (Avid Nano W310i, High Wycombe, UK). Dazu wurden 2-5  $\mu\text{l}$  extrudierte Proteo-/Liposomen zu 50  $\mu\text{l}$  Puffer in einer Mikroküvette gegeben, mit der Pipette gemischt und anschließend 5 Messungen von 10 s Länge durchgeführt. Die Software ermittelt aus den Messdaten die mittlere Größenverteilung der Suspension und gibt den ermittelten hydrodynamischen Radius der Partikel an.

Für die Einzelmolekülexperimente wurde zur gleichen Menge Liposomen (700  $\mu\text{M}$ ) weniger Protein gegeben. Durch den Einsatz von 10 nM gereinigtem und fluoreszenzmarkiertem Protein wurde der Einbau von etwa einem markierten Protein pro Liposom gewährleistet.

### 2.2.6 Trypsinverdau der Proteoliposomen zur Topologiebestimmung

Trypsin ist eine Serinprotease die spezifisch an den Aminosäuren Lysin und Arginin die Peptidbindung spaltet. Trypsinschnittstellen finden sich im YidC Protein vor allem im ersten periplasmatischen Loop (P1-Loop, Abbildung 2.2-1).



**Abbildung 2.2-1: Schematische Darstellung des YidC Proteins mit den Trypsinschnittstellen sowie den zu erwartenden Fragmenten nach Trypsinverdau bei korrekter Topologie.**

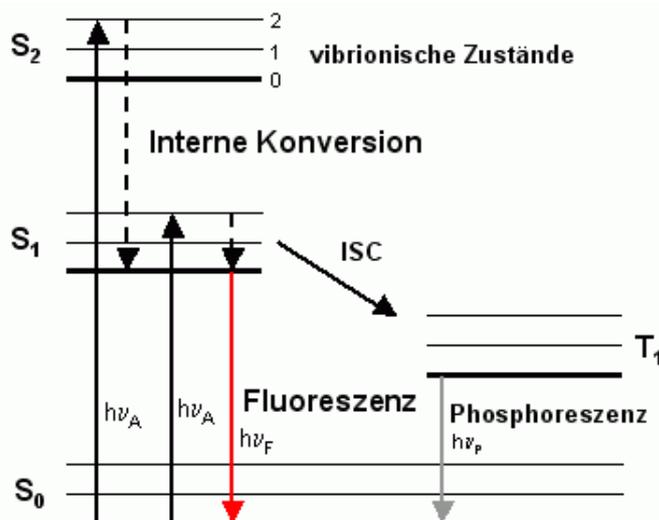
Bei korrekter Rekonstitution, der so genannten ‚loop-in‘ Konformation, befindet sich der P1-Loop im Lumen des Vesikels. Diese Orientierung entspricht der funktionellen und natürlichen Topologie. Dabei kann die Protease nur an den cytoplasmatischen Stellen von YidC schneiden und damit entsteht ein 42 kDa großes Fragment, bestehend aus den Transmembrandomänen 1 und 2 sowie dem P1-Loop. Zum Topologienachweis der Proteine in den Proteoliposomen wurden diese mit Trypsin verdaut. Dazu wurden 3 x 100  $\mu\text{l}$  Proteoliposomen mit der Ultrazentrifuge bei 126.000 x g für 10 min bei 4°C sedimentiert und die pelletierten Proteoliposomen in je 100  $\mu\text{l}$  Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7,0; 100 mM NaCl) resuspendiert, wodurch nur rekonstituiertes und gebundenes YidC im Ansatz verblieben. Dies war nötig für die spätere Bestimmung der tatsächlich eingebauten Proteinmenge (Ansatz 1). Die Ansätze 2 und 3 wurden mit je 4  $\mu\text{M}$  Trypsin versetzt. Als Negativkontrolle wurde zu Ansatz 3 zusätzlich 10% (w/v) SDS gegeben. Das Detergenz baut sich in die Proteoliposomen ein und quillt sie auf, wodurch die in den Proteoliposomen enthaltenen Proteine durch die Protease verdaut werden können. Die Ansätze

wurden 45 min bei RT inkubiert. Der Trypsinverdau wurde durch Zugabe von 15% (w/v) TCA gestoppt und dabei die Proteine gefällt. Anschließend wurden die Proteine in einer SDS-PAGE aufgetrennt und durch einen Western Blot mittels eines gegen den P1-Loop gerichteten Antikörpers nachgewiesen.

## 2.3 Fluoreszenzspektroskopie

### 2.3.1 Grundlagen der Fluoreszenz

Die Aussendung von Licht einer beliebigen Substanz bezeichnet man als Lumineszenz, wobei zwei Fälle unterschieden werden. Abhängig von dem angeregten elektronischen Zustand aus dem die Elektronen in den Grundzustand zurückkehren spricht man von Fluoreszenz oder Phosphoreszenz (Lakowicz 2006). Für die vereinfachte Darstellung der beteiligten photophysikalischen Prozesse eignet sich das Jablonski-Diagramm, dargestellt in Abbildung 2.3-1. Es zeigt die verschiedenen elektronischen Energiezustände sowie deren vibrionische Zustände eines Moleküls.



**Abbildung 2.3-1:** Jablonski-Diagramm mit dem Grundzustand  $S_0$ , den angeregten Zuständen  $S_1$  und  $S_2$ , dem Intersystem Crossing (ISC) sowie dem Triplettzustand  $T_1$ .

Ein Molekül, das Fluoreszenzlicht emittieren kann, wird als Fluorophor bezeichnet. Es besteht meist aus einer komplexen Anordnung mehrerer aromatischer und heterozyklischer Ringe und bildet somit ein räumlich ausgedehntes  $\pi$ -Elektronensystem. Führt man nun dem Molekül Energie in Form von Photonen zu, so kann ein Übergang der Valenzelektronen aus dem Grundzustand  $S_0$  in den angeregten Zustand  $S_1$  stattfinden. Das Elektron wird meist in ein hohes Schwingungsniveau des  $S_1$  Zustandes angeregt, von wo es strahlungslos in das niedrigste Niveau des  $S_1$ -Zustandes relaxiert. Dieser Prozess wird als „innere Umwandlung“ (internal conversion) bezeichnet und findet innerhalb weniger

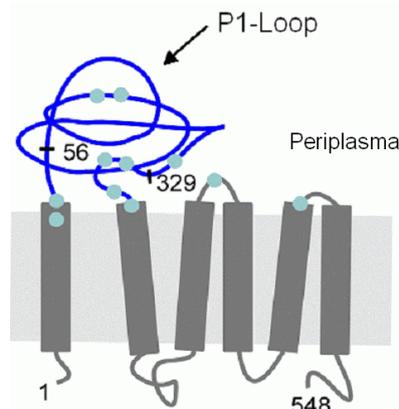
Picosekunden statt. Wird beim Übergang vom  $S_1$  in den  $S_0$ -Zustand ein Photon emittiert, spricht man von Fluoreszenz. Die Fluoreszenzlebensdauer eines Fluorophors, welches im Bereich von Nanosekunden liegt, ist die durchschnittliche Zeit zwischen der Anregung und Rückkehr in den Grundzustand. Dabei gelangen die Elektronen innerhalb von einigen Nanosekunden auf ein vibronisches Zwischenniveau des Grundzustandes  $S_0$ , von wo sie dann mittels einer Schwingungskaskade in den Schwingungsgrundzustand relaxieren. Durch den Verlust der Anregungsenergie durch die erwähnten Schwingungsprozesse besitzen die Fluoreszenzphotonen eine geringere Energie und sind somit zu längeren Wellenlängen verschoben (Stokes- Verschiebung). Ein wichtiges Merkmal eines Fluorophors ist sein Absorptions- und Emissionsspektrum. Die spektralen Eigenschaften sind für jedes Fluorophor spezifisch. Der Verlauf des Emissionsspektrums ist im Allgemeinen unabhängig von der Anregungswellenlänge. Um bei gegebener Einstrahlungsintensität ein intensives Fluoreszenzsignal zu erhalten, ist es wichtig, eine Anregungswellenlänge nahe dem Absorptionsmaximum zu wählen.

Eine wesentliche Eigenschaft von Fluorophoren ist zudem die Fluoreszenz-Quantenausbeute. Sie ist definiert als das Verhältnis aus emittierten zu absorbierten Photonen und berechnet sich aus den Raten von strahlenden und nichtstrahlenden Prozessen. Die Quantenausbeute kann durch eine Vielzahl an Prozessen verringert werden. Man spricht hierbei von Fluoreszenzlöschung oder „quenchen“. Ein besonderer Fall ist der Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET), bei dem der angeregte Zustand eines Fluorophors durch einen zweiten Fluorophor gequencht wird (Abschnitt 2.4.2).

### **2.3.2 Titration von Pf3 coat Protein zu YidC-Proteoliposomen**

Durch die Titration von Pf3 coat zu YidC Proteoliposomen wurde die Dissoziationskonstante bestimmt, welche Aufschluss über die Stärke der Bindung von Pf3 coat an YidC gibt. Die Messungen erfolgten über die Tryptophanfluoreszenz von YidC. YidC besitzt 11 Tryptophane, 8 davon im ersten periplasmatischen Loop (P1-Loop, Abbildung 2.3-2).

Als Substrat wurde eine Tryptophan-freie Mutante von Pf3 coat verwendet (Pf3W0), bei der an Position 38 das Tryptophan gegen ein Phenylalanin ausgetauscht wurde. Dadurch besitzt diese Mutante kaum noch Eigenfluoreszenz.



**Abbildung 2.3-2 Schematische Darstellung der Tryptophan-Reste (türkise Punkte) im YidC WT.**

Das für die Messungen verwendete UV-Spektrofluorimeter FL 3-22 war mit einem temperierbaren Küvettenhalter und einem Photomultiplier für hohe Wellenlängen ausgerüstet. Die Probe wurde mit monochromatischem Licht einer Xenon-Hochdrucklampe angeregt und resultierende Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Wellenlänge im Winkel von  $90^\circ$  von seinem Detektor aufgezeichnet. Für die Messungen wurden die Anregungs- und Emissionsblenden auf 2 und 3 mm eingestellt. Die Spaltbreite der Blenden bestimmte die Signalintensität und spektrale Auflösung. Die Proben wurden in einer Quarkzuvette mit einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Während der Messung wurde die Temperatur des Küvettenhalters durch ein angeschlossenes Thermostat konstant bei  $20^\circ\text{C}$  gehalten, da die Fluoreszenzemission stark von der Temperatur abhängig ist. Die Aufnahme der Emissionsspektren erfolgte nach Anregung bei 295 nm von 305 bis 420 nm bei einer Integrationszeit von 1 sec. Da es sich bei dem verwendeten Gerät um ein Ein-Strahl-Spektrometer handelte, wurde die Referenzkuvette mit Puffer stets separat gemessen und das resultierende Emissionsspektrum anschließend vom Probenspektrum abgezogen.

Zunächst wurden  $300\ \mu\text{l}$  20 mM Tris/HCl pH7,0; 100 mM NaCl in die Kuvette vorgelegt und  $100\ \mu\text{l}$  YidC-Proteoliposomen zupipettiert. Durch mehrmaliges Invertieren der Kuvette wurde die Probe homogenisiert. Anschließend wurde das YidC-Fluoreszenzspektrum in Abwesenheit des Substrates Pf3W0 coat gemessen. Danach wurden schrittweise bis zu  $2,5\ \mu\text{M}$  Pf3W0 coat zutitriert, wobei vor jeder Messung die Kuvette mehrmals invertiert und die Messung nach 2 Minuten gestartet wurde. Diese Inkubationszeit ermöglichte eine vollständige Bindung des Substrates an YidC und damit ein konstantes Fluoreszenzsignal. Alle Messungen wurden in einer Doppelbestimmung durchgeführt.

## 2.4 Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie

Im Gegensatz zu Ensemble-Messungen von Molekülen, bei denen nur gemittelte Informationen über die Eigenschaften des Gesamtsystems erhalten werden, liefern Einzelmolekülmessungen detaillierte Informationen über einzelne Moleküle. So können beispielsweise statische oder dynamische Prozesse zeitaufgelöst beobachtet werden.

### 2.4.1 Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS)

FCS ist eine optische Messmethode zur Bestimmung der charakteristischen Teilcheneigenschaften, wie der Diffusionszeit  $\tau_D$  in sehr starker Verdünnung. Für diese Messungen wird neben der starken Verdünnung auch ein kleines Detektionsvolumen benötigt, um die Fluktuation der Einzelmoleküle im Fokus messen zu können. Das nötige kleine Detektionsvolumen lässt sich mit einem konfokalen Mikroskop erzeugen, wobei durch die auf die Probe abgebildete Lichtquelle eine starke Konzentration des Anregungslichtes auf ein kleines Volumen erreicht wird. Das Detektionsvolumen wird auch als Fokalvolumen bezeichnet und kann bis auf wenige Femtoliter reduziert werden. Durch die Brown'sche Molekularbewegung diffundieren ständig neue Moleküle durch das Fokalvolumen, so dass die Fluoreszenzintensitäten um einen Intensitätsmittelwert fluktuieren. Diese Fluktuationen werden mittels der Autokorrelationsfunktion  $G(\tau)$  analysiert (Gleichung 2-3). Sie ist ein Maß für die Selbstähnlichkeit einer Funktion und beschreibt den Zusammenhang des Wertes einer Meßgröße zum Zeitpunkt  $t$  mit dem Wert dieser Größe zum Zeitpunkt  $t + \tau$  (lag-time).

$$G(\tau_c) = 1 + \frac{1}{N_F} \left( \frac{1}{1 + \tau_c/\tau_d} \right) \left( \frac{1}{1 + (\omega_0/z_0)^2 (\tau_c/\tau_d)} \right)^{1/2} \quad \text{Gleichung 2-3}$$

Dabei ist  $\tau_c$  die Korrelationszeit,  $N_F$  die durchschnittliche Anzahl fluoreszierender Teilchen im Fokus mit den  $1/e^2$  Radii in radialer ( $\omega_0$ ) bzw. axialer ( $z_0$ ) Richtung sowie  $\tau_d = \omega_0^2/4D$ , der charakteristischen translationalen Diffusionszeit der beobachteten Moleküle im Fokalvolumen, mit dem Diffusionskoeffizienten  $D$ .

Mit Hilfe der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie können Diffusionszeiten der sich im Fokus befindlichen Moleküle bestimmt werden, die typischerweise im Bereich von Millisekunden liegt. Bei den Versuchen wurde ein ähnliches Setup verwendet wie für die FRET-Messungen (Abbildung 2.4-3). Für die FCS-Messungen wurde nur der Atto520 Farbstoff mit einem Argon-Ionen Laser (Series 2000, Spectra Physics, Santa Clara, CA, US) bei 514 nm und 100  $\mu$ W angeregt. Es wurden 40  $\mu$ l Probe (40  $\mu$ l Atto520; 40  $\mu$ l Pf3 coat:Atto520 bzw. 20  $\mu$ l Proteoliposomen + 20  $\mu$ l Pf3 coat:Atto520) auf den Objektträger pipettiert, der Laser 100  $\mu$ m in die Probe fokussiert und die Messung nach 5 min für 100 s gestartet. Die Proteinkonzentration in der Probe

wurde so gewählt, dass möglichst nur ein fluoreszierendes Teilchen im Fokus war. Die emittierten Photonen der angeregten Moleküle im Fokus wurden über die Zeit mittels einer APD (Avalanche Photo Diode, AHF) gesammelt, die Daten anschließend in das Programm Burst Analyzer (Zarrabi 2010, Dissertation) geladen und die Autokorrelationsfunktion nach Gleichung 2-3 berechnet.

#### 2.4.2 Grundlagen von FRET (Förster-Resonanz-Energietransfer)

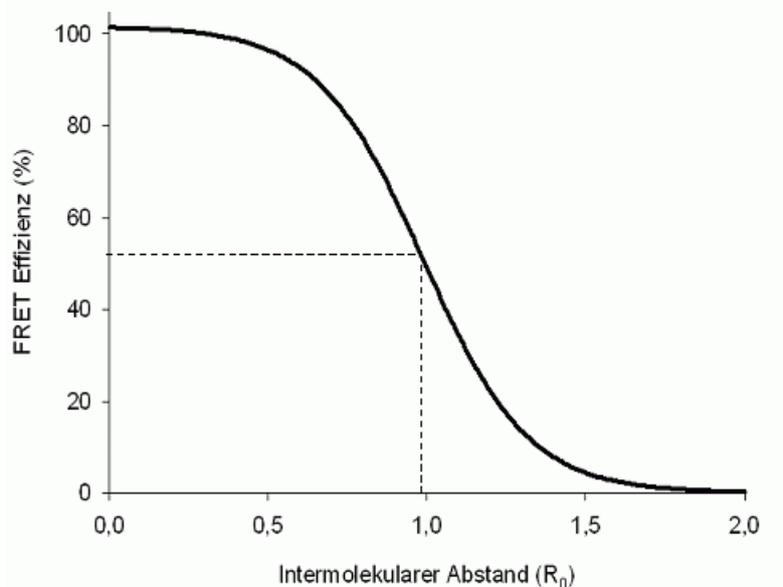
Der Förster-Resonanz-Energietransfer genannte Effekt wurde erstmals von Theodor Förster beschrieben (Förster 1948). Seit den 1970er Jahren ist FRET eine häufig verwendete und weit verbreitete Technik in den modernen Biowissenschaften, mit der sich beispielsweise Strukturänderungen und Wechselwirkungen von Makromolekülen sehr gut untersuchen lassen (Stryer 1978). Es ist eines der wenigen vorhandenen Werkzeuge zur Messung von Abständen im Nanometerbereich und von Abstandsänderungen *in vivo* und *in vitro*.

FRET beschreibt einen Weg, wie Energie von einem Fluorophor mittels induzierter Dipol-Dipol-Wechselwirkung strahlungslos auf ein anderes Fluorophor übertragen werden kann. In der Theorie werden die beiden Fluorophore als oszillierende Dipole beschrieben, welche dieselbe Resonanzfrequenz besitzen (Clegg 1992).

Wird ein Donor Fluorophor durch eingestrahktes Licht angeregt und die Energie auf einen benachbarten Akzeptor im einstelligen Nanometerbereich übertragen, spricht man von FRET. Dies führt zu einer Verringerung der Intensität der Donor Fluoreszenz, einer verringerten Lebensdauer des angeregten Zustandes und einem Anstieg der Emissionsintensität des Akzeptors (Förster 1959). Förster zeigte, dass die Effizienz dieses Prozesses (E) abhängig vom inversen Radius (R) der sechsten Potenz zwischen Donor und Akzeptor ist (Gleichung 2-4).

$$E = \frac{1}{\left(1 + \frac{R}{R_0}\right)^6} \quad \text{Gleichung 2-4}$$

Die starke Abstandsabhängigkeit der Energieübertragung zur sechsten Potenz ist direkt auf die Dipol-Dipol-Wechselwirkung zurückzuführen.  $R_0$  ist der Försterradius und bezeichnet laut Definition den Abstand zwischen Donor und Akzeptor (R) mit einer Transfereffizienz von 50% (Abbildung 2.4-1). Stryer und Haugland zeigten, dass dies als spektroskopischer Maßstab verwendet werden kann (Stryer und Haugland 1967). Durch Messung von E und  $R_0$  kann der Abstand zwischen den Fluorophoren bestimmt werden.



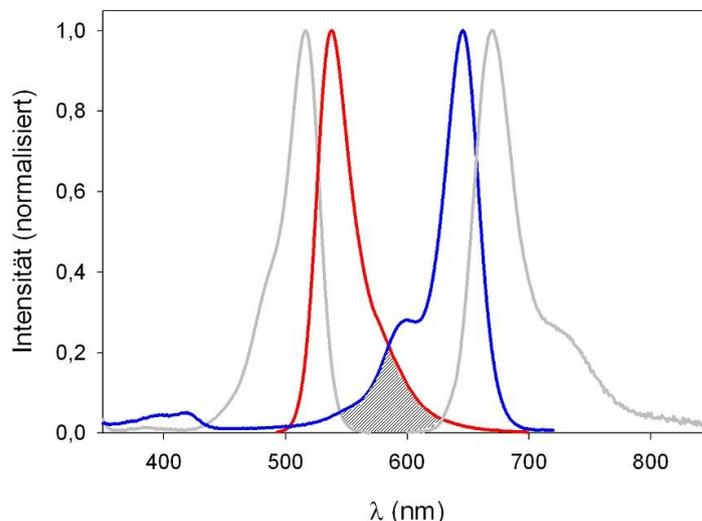
**Abbildung 2.4-1: Abhängigkeit der FRET-Effizienz vom intermolekularen Abstand der Fluorophore. Der dem Halbmaximum der FRET-Effizienz entsprechende Abstand wird als Förster-Radius  $R_0$  bezeichnet.**

Da viele biologische Prozesse im Bereich von wenigen Nanometern ablaufen, und somit genau in der Größenordnung des Försterradius (3 – 8 nm) liegen, ist FRET in der Biophysik ein höchst präzises Werkzeug zur Abstandsbestimmung im Nanometerbereich. FRET wird zum Beispiel zur Untersuchung der Rotation der ATP-Synthase (Börsch 2011), der Faltung von Proteinen (Schuler und Eaton 2008) oder der Protein-Lipid Interaktion wie z.B. von M13 procoat Protein mit markierten Liposomen (Eisenhawer et al. 2001) verwendet. Der Försterradius  $R_0$  lässt sich aus der spektralen Charakteristik der Farbstoffe und ihrer relativen Orientierung zueinander nach Gleichung 2-5 berechnen:

$$R_0 = \left( \frac{9000 \cdot \ln 10 \cdot \kappa^2 \cdot 2Q_D}{(128\pi^5 \cdot N_A \cdot n^4) J(\lambda)} \right)^{\frac{1}{6}} \quad \text{Gleichung 2-5}$$

$Q_D$  ist die Quantenausbeute des Donors ohne den Akzeptor,  $N_A$  die Avogadrokonstante und  $n$  der Brechungsindex des umgebenden Mediums, i.a. wässriger Puffer. Der Faktor  $\kappa^2$  beschreibt die relative Orientierung der Übergangsdipolmomente vom Donor und Akzeptor zueinander.  $\kappa^2$  kann Werte zwischen 0 und 4 annehmen. Für ein Ensemble von Donor-Akzeptor-Paaren mit hoher Mobilität variieren die Orientierungen der Dipole sehr schnell, so dass auf der Zeitskala für FRET oft ein Mittelwert von  $2/3$  verwendet wird. Dieser Wert kann durch Anisotropiemessungen verifiziert werden. Das Überlappungsintegral  $J$  ergibt sich aus den überlappenden Spektren von Donoremission und Akzeptorabsorption (Abbildung 2.4-2, schraffierte Fläche). Aus den gemessenen Fluoreszenzintensitäten kann die

Effizienz des Energietransfers ( $E_{\text{FRET}}$ ) vom Donor zum Akzeptor berechnet werden (Gleichung 2-6) und damit Werte von 0 (kein Energietransfer) bis 1 (vollständiger Energietransfer) annehmen.



**Abbildung 2.4-2: Absorptions- und Emissionsspektren der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe Atto520 (rot) und Atto647N (blau) mit der überlappenden Fläche der Spektren zur Bestimmung des Überlappungsintegrals  $J$ .**

Zudem lässt sich aus  $E_{\text{FRET}}$  der Abstand der Fluorophore von Donor und Akzeptor ( $R_{\text{DA}}$ ) berechnen nach:

$$E_{\text{FRET}} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R_{\text{DA}}^6} = \frac{I_A}{\gamma \cdot I_D + I_A} \quad \text{Gleichung 2-6}$$

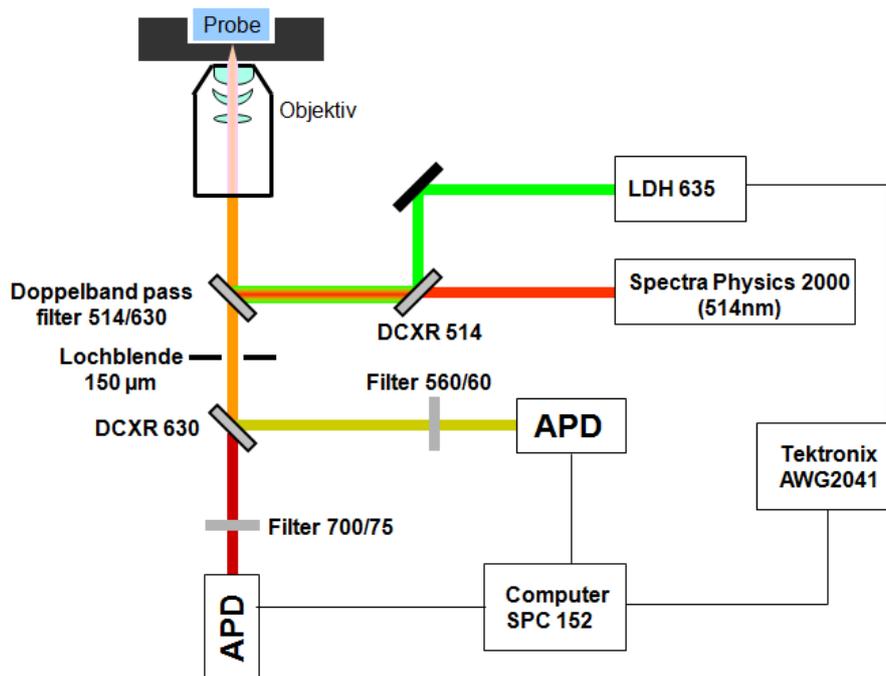
Dabei sind  $I_A$  und  $I_D$  die Fluoreszenzintensitäten von Akzeptor bzw. Donor und  $\gamma$  ist ein Korrekturfaktor, welcher Intensitätsverluste durch die Filter und APDs berücksichtigt. Die theoretische Stärke des zu detektierenden Lichtes vom Donor bzw. Akzeptor wird durch die Linsen und Filter des Setups vermindert. Der Gammafaktor berechnet sich nach Gleichung 2-7:

$$\gamma = \frac{\eta_A \cdot \varphi_A}{\eta_D \cdot \varphi_D} \quad \text{Gleichung 2-7}$$

wobei  $\eta_A$  und  $\eta_D$  die Detektionseffizienzen des Akzeptors (0,39) bzw. Donors (0,33) darstellen und  $\varphi_A$  und  $\varphi_D$  die Quantenausbeuten des Akzeptors (65%) bzw. Donors (90%) sind. Für das beschriebene Setup (Abbildung 2.4-3) wurde ein Gamma Faktor von 0,85 berechnet.

### 2.4.3 FRET-Messungen

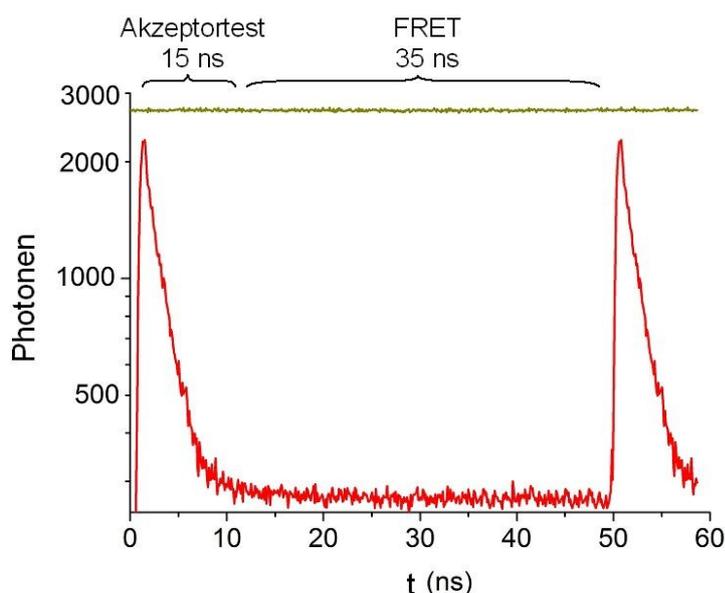
Der für die FRET Messungen verwendete Aufbau (Düser et al. 2009) um das konfokale Fluoreszenzmikroskop ist schematisch in Abbildung 2.4-3 gezeigt.



**Abbildung 2.4-3: Experimenteller Aufbau für die Einzelmolekülmessungen.** (DCXR-dichroider Langpassfilter mit erweiterter Reflexion, APD-Avalanche Photo Diode; LDH-Laser-Diode-Heads; SPC-Einzel-Photonen Zähler)

Die Anregung des Donors Atto520 erfolgte durch einen Argon-Ionen Laser (Series 2000, Spectra Physics, Santa Clara, CA, US) bei 514 nm mit kontinuierlicher Leistung von 100 µW und die Anregung des Akzeptors Atto647N durch einen mit 20 MHz gepulsten Dioden Laser (LDH 635B, Sepia, PicoQuant, Berlin) bei 635 nm und einer Leistung von 30 µW. Die Laserstrahlen wurden durch spezielle Linsenpaare (514 nm: 150/50; 635 nm: 250/80) komprimiert, um das für die Messungen notwendige Fokalvolumen von ca. 10 fl zu erhalten. Mittels eines Dualband Spiegels (514 nm/635 nm), welcher nur die angegebenen Wellenlängen passieren lässt, wurden die Laserstrahlen in das Objektiv des Mikroskops eingekoppelt. Der Laserstrahl dringt durch die Linsen des Objektivs und fokussiert sich 100 µm in der Probe. Das Fluoreszenzlicht passiert das Objektiv, den Dualband Filter und anschließend eine Lochblende von 150 µm Durchmesser. Die Lochblende lässt nur Licht aus dem Fokalvolumen passieren. Anschließend wird der Strahl durch einen dichroiden Filter (DCXR 630) geteilt. Dabei wird Licht mit einer Wellenlänge unter 630 nm reflektiert, durch einen Filter (560/60) geleitet und von einer APD (Avalanche Photodiode, AHF) detektiert. Licht mit einer höheren Wellenlänge als 630 nm passiert hingegen den dichroiden Filter, durchtritt einen weiteren Filter (700/75) und wird von einer weiteren APD detektiert. Die APDs sind an einen Computer mit 2 synchronisierten TCSPC (*time-correlated single photon counting*, Becker&Hickl SPC

152) Karten angeschlossen. Die von den APDs detektierten Einzelphotonen werden auf der jeweiligen TCSPC Karte zeitaufgelöst gespeichert. Für die FRET-Messungen wurde neben dem Donor auch der Akzeptor zeitweise angeregt. Der damit erhaltene Akzeptortest sollte die Identifizierung echter FRET-Ereignisse ermöglichen. Abbildung 2.4-4 zeigt das Anregungsschema für den Versuch, welches in zwei Zeitfenster unterteilt ist. Während des 50 ns dauernden Intervalls war der 514 nm Laser (Donor) kontinuierlich in Betrieb. Für den Akzeptortest wurde der 635 nm Laser in Pulsen einer Frequenz von 20 MHz aktiviert. Das Zeitfenster des Akzeptortest von 15 ns beinhaltet die Lebensdauer des Farbstoffs. Im zweiten Zeitfenster mit den verbleibenden 35 ns zwischen den Akzeptorimpulsen konnten mögliche FRET-Signale detektiert werden.

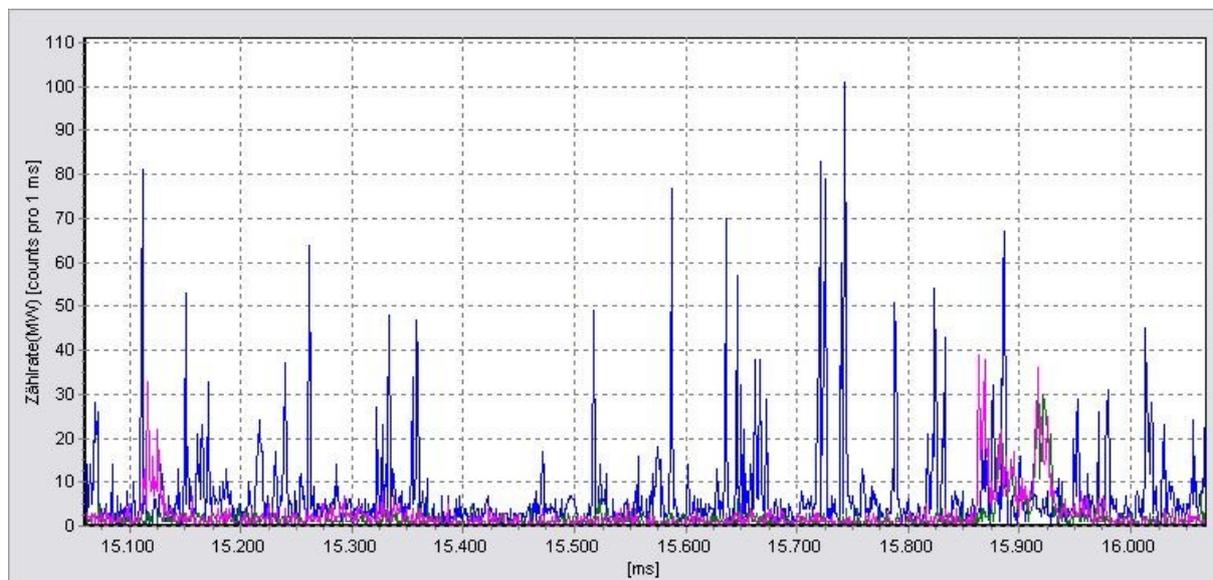


**Abbildung 2.4-4: Anregungsschema der Fluoreszenzfarbstoffe durch den kontinuierlich aktivierten Donor-Laser (514 nm, 100  $\mu$ W; grün) und den gepulsten Akzeptor-Laser (635 nm, 30  $\mu$ W, 20 MHz; rot).**

Vorbereitend für die Messungen wurden zunächst Proteoliposomen und das Substrat separat gemessen, um die Anzahl der Moleküle im Fokus zu überprüfen. Das Substrat wurde soweit mit Pf3-Puffer verdünnt, sodass gegenüber den Proteoliposomen etwa 100 mal mehr Moleküle in der Probe waren. Für die FRET-Messungen wurden 20  $\mu$ l Proteoliposomen mit markiertem YidC auf den Objektträger vorgelegt und der Laserstrahl 100  $\mu$ m vom Objektiv entfernt fokussiert, so dass sich das Fokolvolumen von ca. 10 fl im Inneren des Tropfens befand. Anschließend wurden 20  $\mu$ l verdünntes Substrat zugegeben und gemischt. Vom Mischen auf dem Objektträger bis zum Starten der Messung vergingen etwa 5 s. Jede Probe wurde für 420 s und jede Bedingung 10 mal gemessen. Als Hintergrundkorrektur dienten Messungen des verwendeten Puffers. Die Daten jeder Messbedingung wurden anschließend in den „Burst-Analyzer“ eingeladen (Zarrabi 2010). Mit Hilfe dieses

Programms ist es möglich, die synchronisierten Daten der TCSPC-Karten zu bearbeiten. Dazu wurden die gezählten Photonen vom Donor, FRET-Signal und Akzeptortest zusammengelegt. Anschließend kann über das Programm automatisch nach Photonen-Bursts, einer Ansammlung von Photonen innerhalb einer bestimmten Zeitspanne, gesucht werden.

Abbildung 2.4-5 zeigt beispielhaft die Photonen-Spuren einer Messung mit den Signalen vom Donor (blau), FRET (grün) und Akzeptortest (rot).

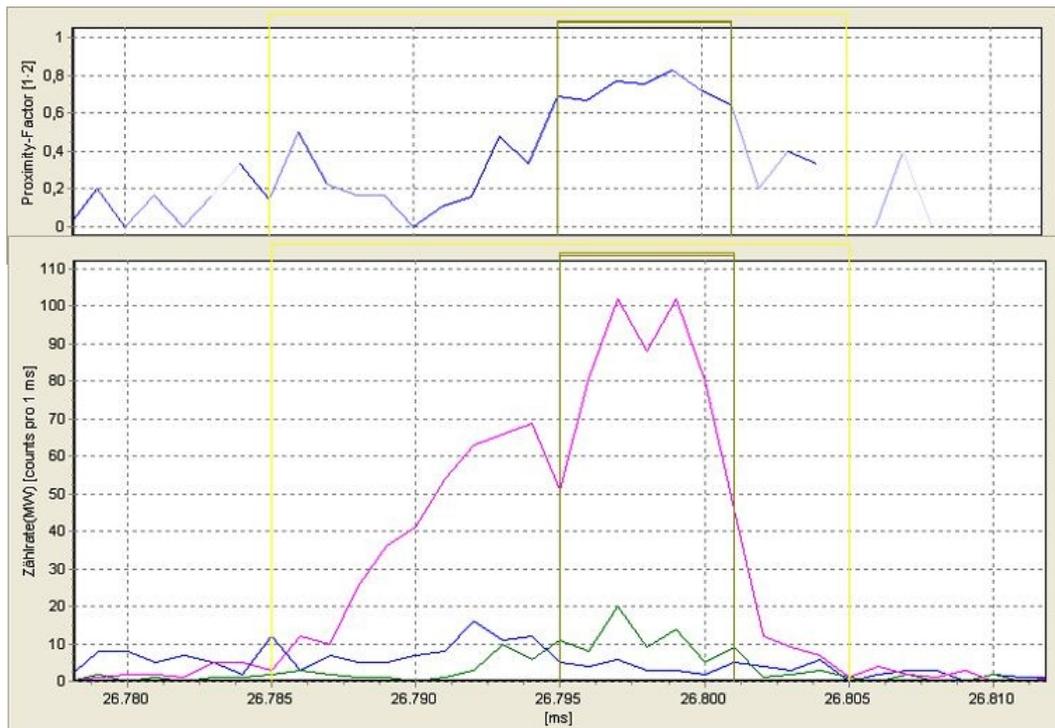


**Abbildung 2.4-5: Photonenspur der Einzelmolekülmessungen mit dem Signal des Donors (Pf3 coat:Atto520 – blau), dem Akzeptortest (YidC:Atto647N – rot) und dem FRET-Signal (grün).**

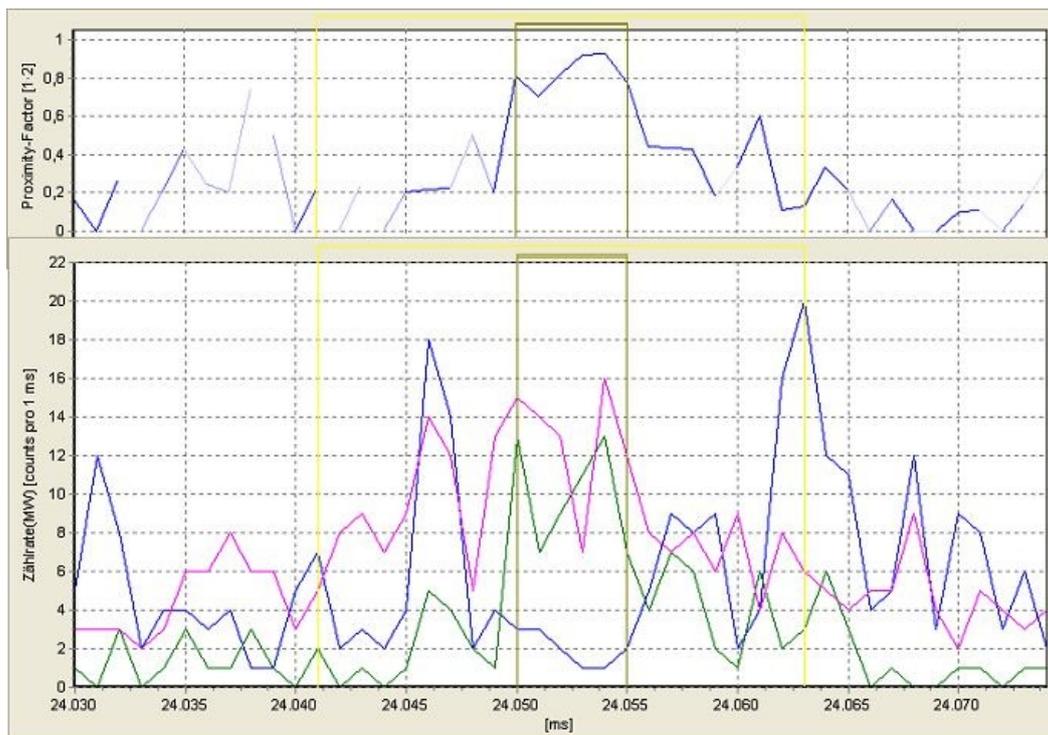
Mit Hilfe des „Burst-Analyzer“ wurden die 420 s langen Zeitspuren in 30 s Abschnitte unterteilt. Vor der automatischen Burstsuche wurde der Untergrund mit dem gemessenen Puffer korrigiert. Zudem wurde das Donor-Signal durch den Gamma-Faktor korrigiert. Anschließend wurden die Bursts nach folgenden Kriterien markiert. Das FRET-Signal und der Akzeptortest mussten eine Zählrate zwischen 10 und 100 counts/ms aufweisen. Zudem wurde die Burstlänge auf den Bereich von 14 bis 60 ms limitiert, was aus den Ergebnissen der FCS-Messungen resultierte (Abschnitt 3.7.1). Mit diesen Einstellungen wurden die Bursts automatisch gesucht und die Kriterien erfüllenden Bursts markiert. Anschließend wurde die FRET-Effizienz ( $E_{\text{FRET}}$ , entspricht dem Proximity Faktor in Abbildung 2.4-6, Abbildung 2.4-7 und Abbildung 2.4-8) in den markierten Bursts analysiert. Es wurden nur Bursts ausgewertet, welche  $E_{\text{FRET}}$  zeigten. Bursts, welche nur ein Akzeptortestsignal, aber kein  $E_{\text{FRET}}$  zeigten wurden nicht ausgewertet. Die Kriterien erfüllenden Bursts wurden in zwei Klassen unterteilt. Zum einen solche, die keine Änderung von  $E_{\text{FRET}}$  über die Zeit zeigten (Abbildung 2.4-6) und solche, die eine Änderung zeigten (Abbildung 2.4-7 und Abbildung 2.4-8).



**Abbildung 2.4-6:** Einzel-Photonen-Burst mit den Donor- (blau), FRET- (grün) und Akzeptortest-Signalen (rot). Im oberen Teil der Abbildung ist der aus den FRET-Signalen berechnete Proximity Faktor ( $E_{\text{FRET}}$ ) abgebildet.



**Abbildung 2.4-7:** Einzel-Photonen-Burst mit den Signalen vom Donor- (blau), FRET (grün) und Akzeptortest (rot). Im oberen Teil der Abbildung ist der aus den FRET-Signalen berechnete Proximity Faktor ( $E_{\text{FRET}}$ ) abgebildet. Der Endzustand von  $E_{\text{FRET}}$  wurde hier für die Auswertung berücksichtigt.



**Abbildung 2.4-8: Einzel-Photonen-Burst mit den Signalen vom Donor- (blau), FRET (grün) und Akzeptortest (rot). Im oberen Teil der Abbildung ist der aus den FRET-Signalen berechnete Proximity Factor ( $E_{\text{FRET}}$ ) abgebildet. Bei dem hier gezeigten Insertionsprozess wurde der Maximalwert von  $E_{\text{FRET}}$  für die Auswertung herangezogen.**

Trat innerhalb eines Bursts eine Änderung von  $E_{\text{FRET}}$  auf, z.B. von niedrigen zu hohen  $E_{\text{FRET}}$ -Werten (Abbildung 2.4-7), so wurde der  $E_{\text{FRET}}$ -Wert des Endzustandes im Burst herangezogen. Bei  $E_{\text{FRET}}$ -Werten welche zunächst eine Zunahme und anschließend eine Abnahme zeigten (Abbildung 2.4-8), wurde der Maximalwert von  $E_{\text{FRET}}$  zur Auswertung herangezogen. Die so ermittelten  $E_{\text{FRET}}$ -Werte für jeden Burst wurden in einem Histogramm dargestellt, wobei die Anzahl der Bursts über die FRET-Effizienz aufgetragen wurde.

### Temperaturabhängigkeit der Insertion

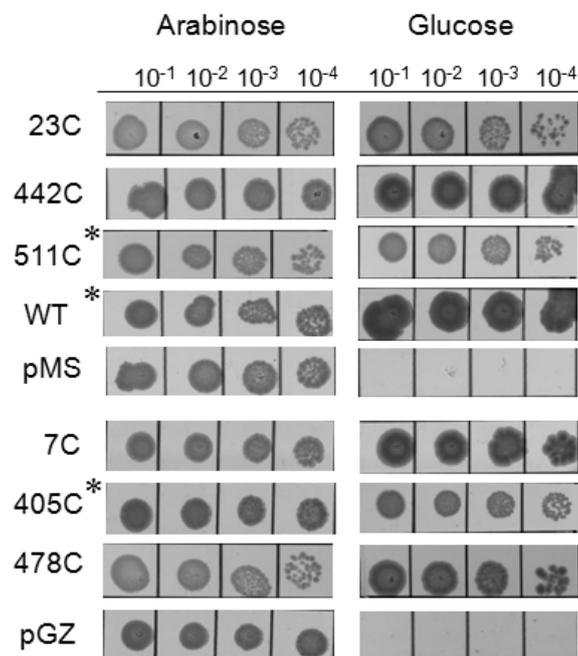
Für die Messungen zur Bestimmung der Temperaturabhängigkeit wurde eine Heizkammer über dem Objektiv platziert. Durch zwei eingebaute Peltier-Elemente konnte die aus Kupfer bestehende Kammer sowohl gekühlt als auch beheizt werden. Die Temperatur wurde dabei durch Messfühler am Kupfer und in der Luft im Inneren der Kammer überprüft und verfügte somit über einen aktiven Regelkreis. Damit die Temperatur während der Messung annähernd konstant war, wurden die Proben vortemperiert. Die Durchführung der Messungen erfolgte wie zuvor beschrieben.



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Komplementation

Mit Hilfe des Komplementationstests wurde zunächst die Funktionalität der verwendeten Cystein Mutanten von YidC überprüft (Abschnitt 2.2.1). Abbildung 3.1-1 zeigt, dass in Anwesenheit von Arabinose die Zellen aller Konstrukte Wachstum zeigen, auch die mit dem leeren Vektor transformierten Zellen. Dies ist auf die Induktion des chromosomal-codierten YidC in Anwesenheit von Arabinose zu erklären. Bei zusätzlichem Vorhandensein von IPTG zeigten einige Mutanten jedoch nur ein stark verringertes Wachstum (Daten nicht gezeigt). Dies kann durch eine letale Überexpression der plasmid-codierten Gene zu erklären sein. Durch lange Inkubationszeiten in Anwesenheit von IPTG wird YidC in toxischen Mengen gebildet, was in stark gehemmtem Wachstum der Bakterien resultiert (Wagner et al. 2007).



**Abbildung 3.1-1 Komplementationstest der Einzel-Cystein Mutanten von YidC mit den Kontrollen YidC WT sowie den leere Vektoren pMS119EH und pGZ119EH. Bei Konstrukten mit \*Markierung trat nur Wachstum auf Glucose in Anwesenheit von IPTG auf.**

In Anwesenheit von Glucose zeigten die mit leerem Plasmid transformierten Zellen kein Wachstum. Dies ist auch zu erwarten, da zum einen das chromosomale YidC durch die Glucose reprimiert wird und zum anderen kein plasmid-codiertes YidC für die Komplementation zur Verfügung steht. Die YidC-Mutanten sowie die Positivkontrolle zeigten hingegen Wachstum auf Glucose in Anwesenheit (\* Markierung)

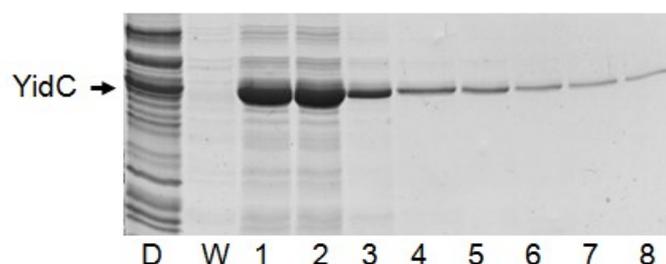
und tw. Abwesenheit von IPTG. Das Wachstum auf Glucose in Abwesenheit von IPTG ist auf den *tac*-Promotor der Plasmide zurückzuführen, welcher ein Hybrid aus dem *trp*- und dem *lac*-Promotor ist. Dieser Promotor besitzt eine Basalaktivität, wodurch er ‚undicht‘ ist und daher auch ohne IPTG induziert werden kann. Diese Basalaktivität entsteht durch die ineffiziente Suppression des *lac*-Promotors. Für die Reprimierung sind 4 Suppressoren, in Form eines Tetramers nötig. Da oftmals nicht genug dieser Suppressoren zur Verfügung stehen, kommt es zu einer basalen Aktivierung und damit zur Expression des dahinter liegenden Gens. In Anwesenheit von Glucose und IPTG wird das chromosomale YidC durch die Glucose reprimiert, aber das plasmid-codierte YidC wird mittels IPTG induziert und komplementiert das chromosomale YidC. Einige Mutanten zeigten jedoch mit IPTG nur teilweise Wachstum. Auch hier ist dieser Effekt auf die letale Überexpression durch lange Inkubationszeiten mit IPTG zurückzuführen. Das Wachstum unter Glucose bei chromosomal reprimiertem YidC zeigt jedoch, dass die plasmid-codierten YidC-Mutanten den YidC WT funktionell ersetzen können.

## 3.2 Reinigung von YidC und Pf3 coat Protein

### 3.2.1 Reinigung der Einzel-Cystein Mutanten von YidC

Die Reinigung der über einen C-terminalen His<sub>10</sub>-tag verfügenden Mutanten erfolgte durch Metall-Affinitätschromatografie (Abschnitt 2.2.2).

Die Elution der Proteine von der Ni-NTA Matrix erfolgte in Anwesenheit von  $\approx 1$  mM DDM, was der ca. 6 fachen kritischen Mizellenkonzentration (cmc: 0,17 mM) entspricht, sowie 0,5 mM TCEP. Durch das TCEP liegen die Thiolgruppen der Cysteinreste im reduzierten Zustand vor, was zum einen die Dimer- bzw. Oligomerbildung verhindert und zum anderen wichtig für die spätere Fluoreszenzmarkierung ist. Abbildung 3.2-1 zeigt beispielhaft ein mit Coomassie gefärbtes SDS-Gel beladen mit den Fraktionen der Reinigung.



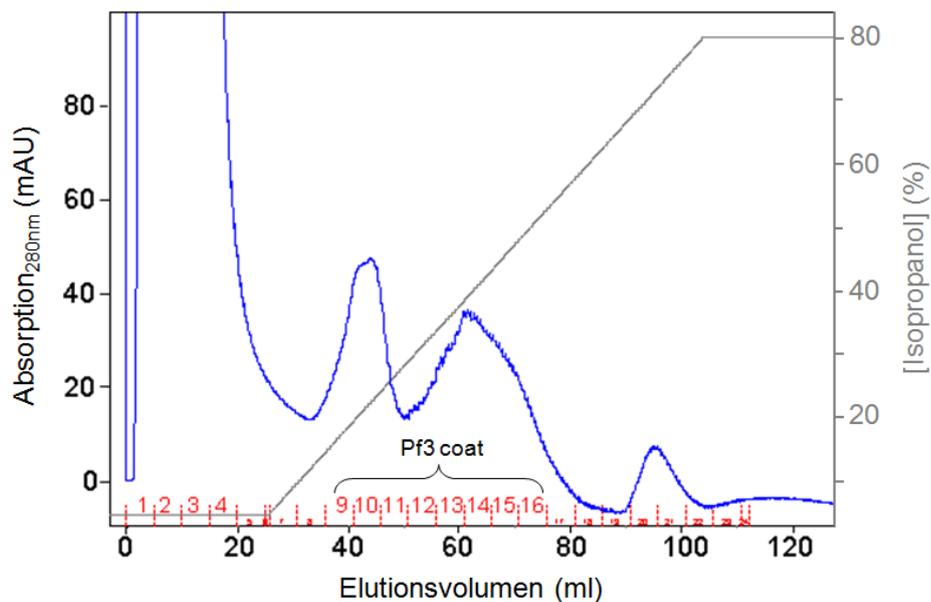
**Abbildung 3.2-1: Coomassie-gefärbtes 12% SDS-Gel nach Ni-NTA Reinigung von YidC-7C mit den Fraktionen: D-Durchlauf, W-Waschschrift und den Elutionsfraktionen 1-8.**

Die Proteinkonzentration der Elutionsfraktionen wurde nach der Methode von Lowry & Peterson bestimmt (Abschnitt 2.2.2). Die Elutionsfraktionen 1 bis 3 wurden für die

Fluoreszenzmarkierung verwendet. Enthaltene Verunreinigungen konnten durch die an die Fluoreszenzmarkierung anschließende Gelfiltration abgetrennt werden (Abschnitt 3.6).

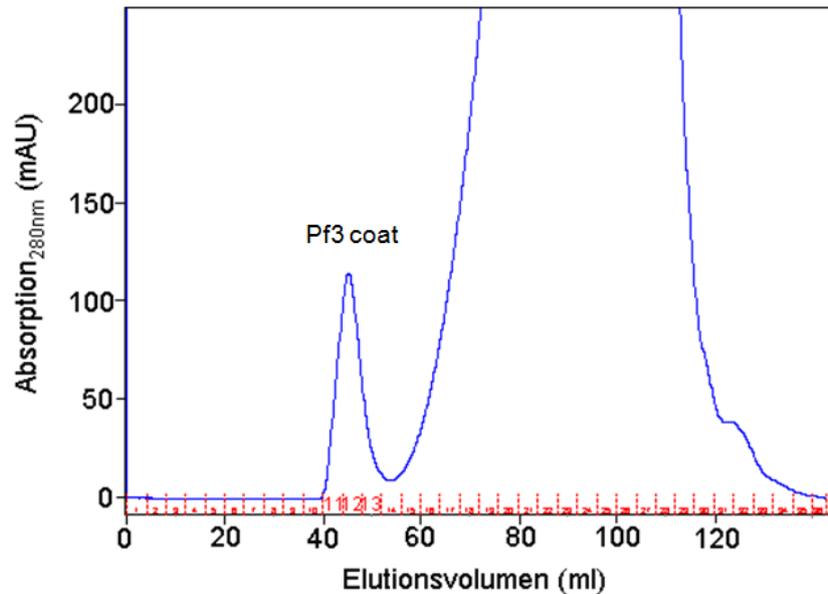
### 3.2.2 Reinigung Einzel-Cystein Mutanten von Pf3 coat

Die Cystein Mutanten Pf3-16C coat, Pf3-48C coat sowie Pf3-19A16C coat wurden mittels FPLC über 3 Chromatografie-Schritte aus dem Rohextrakt gereinigt (Abschnitt 2.2.2). Die Detektion der Proteine während der FPLC-Läufe erfolgte über die Absorption bei 280 nm. Zunächst wurde das Protein mit Hilfe einer Umkehrphasen-Chromatografie vorgereinigt (Abbildung 3.2-2). Die große Menge an überexprimiertem Pf3 coat überstieg die Kapazität der Säule, wodurch ein Teil des Proteins im Durchlauf zu finden war (Fraktionen 1-4). Daher wurde die Reinigung auch mit diesen Fraktionen fortgesetzt. Gebundenes Protein eluierte in dem anschließenden Isopropanol-Gradienten bei ca. 40% (v/v) Isopropanol (Fraktionen 9-16).



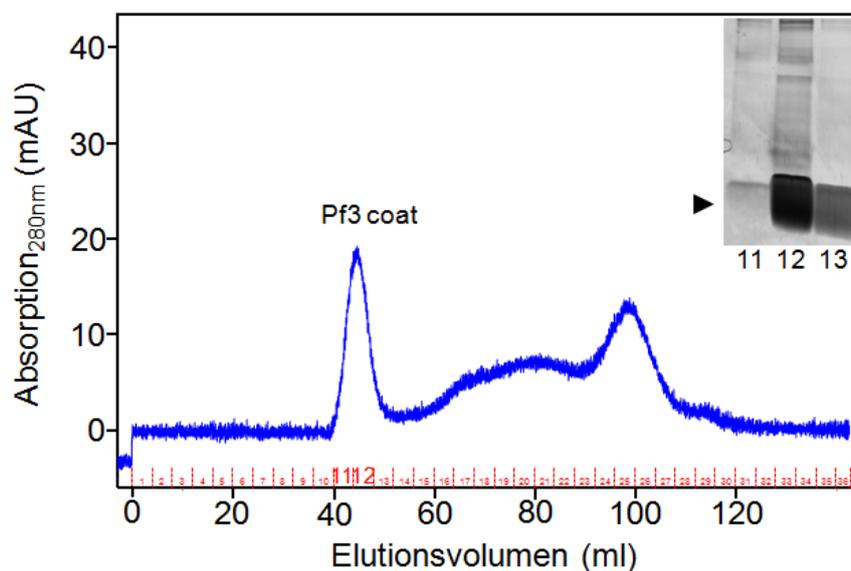
**Abbildung 3.2-2: Chromatogramm der Reinigung von Pf3-16C coat über eine Umkehrphasen-Chromatographiesäule. Für weitere Reinigungsschritte wurden die Fraktionen 1-4 sowie 9-16 verwendet.**

Nach Aufbereitung der Elutionsfraktionen wurde das Protein über eine Superdex 200 16/60 Säule von weiteren Verunreinigungen befreit (Abbildung 3.2-3). Dabei eluierte das Pf3 coat in einem schmalen Peak über 3 Fraktionen (11-13). Die Protein-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und auf 5 ml konzentriert und anschließend mittels einer Superdex 75 16/60 Säule aufgetrennt. Das Pf3 coat eluierte auch hier in einem schmalen Peak über 3 Fraktionen (11-13). Das Ergebnis der Reinigung von Pf3-16C coat wurde durch Auftrennung der Proteine über eine SDS-Tricin-PAGE und anschließender Silberfärbung visualisiert (Abbildung 3.2-4).



**Abbildung 3.2-3: Chromatogramm der Reinigung von Pf3-16C coat über eine Superdex 200 16/60 Säule.**

Die Protein enthaltenden Fraktionen 12 und 13 der Superdex 75 Säule wurden anschließend jeweils in 2 ml Glasgefäße überführt und bis zur Fluoreszenzmarkierung bei 4°C gelagert.

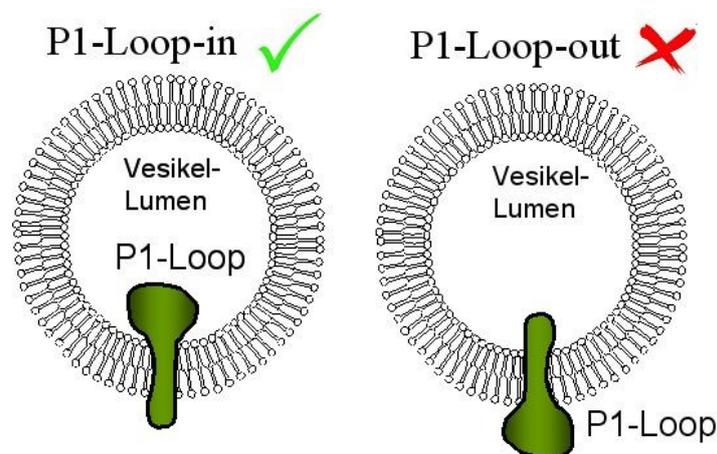


**Abbildung 3.2-4: Chromatogramm der Reinigung von Pf3-16C über eine Superdex 75 16/60 Säule und Silber-gefärbtes 15% SDS-Tricin-Gel mit den Elutionsfraktionen 11-13.**

Sowohl bei der Superdex 200 wie auch der Superdex 75 Säule eluierte das Pf3 coat Protein bereits nach ca. 40 ml. Mit einer Größe von lediglich 5 kDa würde man die Elution des Proteins aber erst am Ende des Laufs bei ca. 110 ml erwarten, da bei der Größenausschlusschromatografie große globuläre Proteine zuerst und kleine Proteine zuletzt eluieren. Die beobachtete Diskrepanz lässt sich mit der Form des Pf3 coat Proteins erklären (siehe Abschnitt 4.2).

### 3.3 Topologiebestimmung von YidC-Proteoliposomen

Für die Durchführung von *in vitro* Versuchen zur Interaktion des Pf3 coat Proteins mit der Insertase YidC war es notwendig, das in Detergenz gereinigte YidC in Liposomen definierter Größe zu rekonstituieren. Die Rekonstitution erfolgte entweder durch die Biobeads-Methode (Rigaud et al. 1997) oder durch Extrudieren (Abschnitt 2.2.5). Die Topologie des rekonstituierten Proteins wurde anschließend durch einen Trypsin-Verdau überprüft, wobei die der *in vivo* Topologie entsprechenden Orientierung im Proteoliposom („Loop-in“ Konformation, Abbildung 3.3-1) ein charakteristisches Bandenmuster erzeugt (Serek et al. 2004; Abschnitt 2.2.6). Dieses umfasst die ersten beiden Transmembrandomänen sowie den ins Innere des Vesikels gerichteten P1-Loop und hat eine Größe von 42 kDa und kann mittels Western Blot und einem gegen den P1-Loop gerichteten Antikörper nachgewiesen werden.

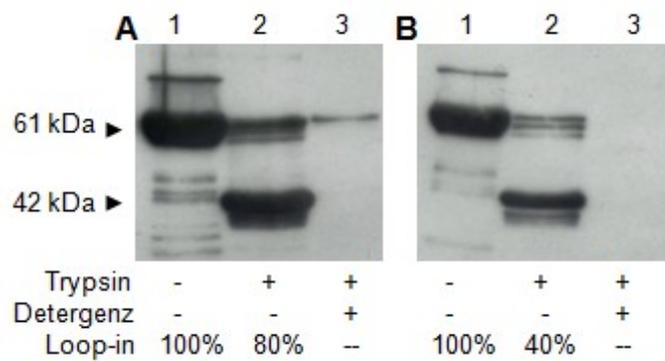


**Abbildung 3.3-1: Orientierungen des rekonstituierten YidC in semisynthetischen Liposomen. Die Loop-in Konformation, bei der sich der P1-Loop im Vesikellumen befindet, entspricht der funktionalen Topologie.**

#### 3.3.1 YidC WT rekonstituiert in Liposomen

Das YidC WT Protein wurde mittels der Biobeads-Methode rekonstituiert und die Topologie bestimmt. Die erhaltenen Banden wurden mit Hilfe der Kodak 1D Image Analysis Software quantifiziert (Version 3.5; Kodak Rochester, NY, USA).

Abbildung 3.3-2 zeigt die Analyse der Topologie des rekonstituierten YidC WT durch Trypsinverdau und Visualisierung im Western Blot. In YidC:DOPC Proteoliposomen waren ca. 80% der Proteine in der Loop-in Konformation vorhanden (A). Im Gegensatz dazu wurden lediglich rund 40% des YidC WT in YidC:PE/PG-Proteoliposomen in der Loop-in Konformation detektiert (B). Damit konnte das Ergebnis aus einer früheren Diplomarbeit bestätigt werden (Stiegler 2004, Diplomarbeit).

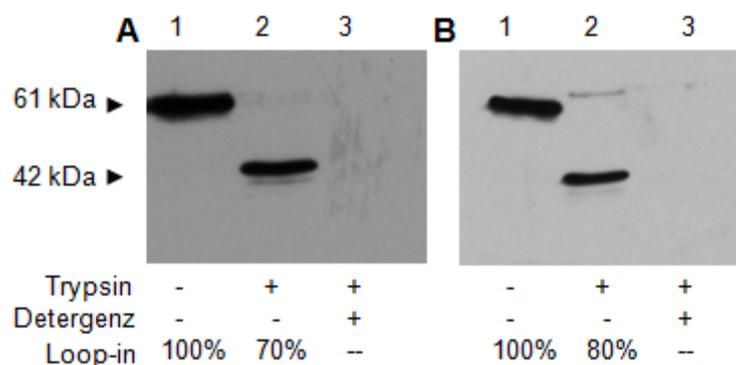


**Abbildung 3.3-2: Western Blot mit einem Antikörper gegen den P1-Loop nach Trypsinverdau von YidC WT rekonstituiert in (A) DOPC- und (B) PE/PG (75%/25%)-Liposomen zur Topologiebestimmung.**

Bei nicht korrektem Einbau ist die Funktionalität des YidC Proteins nicht gegeben, da sich die Substratbindestelle auf der cytoplasmatischen Seite von YidC befindet und damit nicht für das Substrat zugänglich ist.

### 3.3.2 Einzel-Cystein Mutanten von YidC rekonstituiert in DOPC-Liposomen

Da bereits anhand des YidC WT gezeigt wurde, dass nur in DOPC Liposomen rekonstituiertes YidC WT die korrekte Loop-in Konformation aufwies, wurden für die Rekonstitutionen der Mutanten ausschließlich DOPC Liposomen verwendet. Die Einzel-Cystein Mutanten von YidC wurden sowohl mit Hilfe der Biobeads- wie auch der Extruder-Methode rekonstituiert. Die anschließende Topologiebestimmung mittels Trypsinverdau ergab für die YidC-23C und YidC-478C Mutanten Werte von 70% und 80% in der Loop-in Konformation (Abbildung 3.3-3).



**Abbildung 3.3-3: Western Blot mit einem Antikörper gegen den P1-Loop nach Trypsinverdau von (A) YidC-23C und (B) YidC-478C rekonstituiert in DOPC-Liposomen zur Topologiebestimmung.**

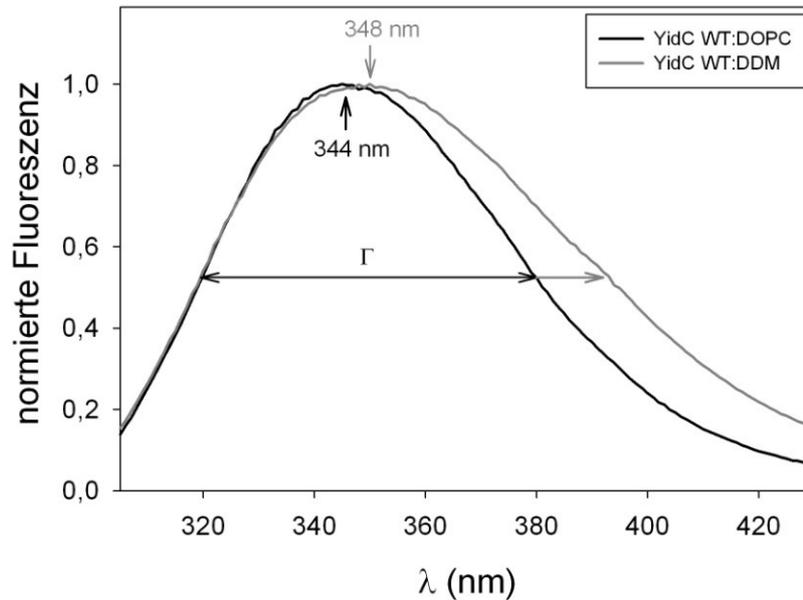
Es wurde somit dieselbe Orientierung der Mutanten erhalten wie beim YidC WT. Dies deutet darauf hin, dass die Mutanten funktional in die Vesikel rekonstituiert werden konnten. Diese Werte wurden sowohl für rekonstituierte Proteine durch Extrudieren wie auch durch die Biobeads-Methode erhalten.

Für die Einzelmolekülmessungen musste die Rekonstitutionsmethode des Extrudierens verwendet werden, um Liposomen definierter Größe mit einer schmalen Verteilung zu erhalten. Nach dem Extrudieren wurde die Größe der Proteoliposomen mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung bestimmt. Es wurden Proteoliposomen mit einem durchschnittlichen hydrodynamischen Radius von  $R_H = (122 \pm 21)$  nm erhalten.

### 3.4 Tryptophanfluoreszenz und Linienprofil

Die intrinsische Proteinfluoreszenz wird verursacht durch die drei aromatischen Aminosäuren Tryptophan (Trp), Phenylalanin und Tyrosin. Diese verfügen durch ihre aromatische Struktur über ein ausgedehntes  $\pi$ -Elektronensystem, was die fluoreszierenden Eigenschaften dieser Aminosäuren bedingt. Trp besitzt das stärkste Fluoreszenzsignal durch Anregung bei 295 nm. Dabei ist die Trp-Fluoreszenz stark abhängig von der Polarität der lokalen Umgebung des Indolrings sowie von der Flexibilität innerhalb der Polypeptidkette. Somit können Struktur- und Konformationsänderungen, bedingt durch Substratbindung, Assoziationen mit Untereinheiten oder Denaturierungen in der Änderung des Emissionsspektrums beobachtet werden (Lakowicz 2006, Demchenko et al. 1986, Eftink et al. 1994).

Freies Trp absorbiert im Vergleich zu den anderen aromatischen Aminosäuren bei der längsten Wellenlänge (ca. 280 nm) und emittiert über einen weit größeren Bereich mit einem Maximum um 350 nm. Durch Anregung bei 295 nm wird ausschließlich die Fluoreszenz von Trp angeregt, nicht aber die von Phenylalanin und Tyrosin, was die Auswertung der Emissionsspektren vereinfacht. Da das Emissionsmaximum stark abhängig von der Polarität der lokalen Umgebung ist, kann die Lage des Fluoreszenzmaximums als Indikator für die Umgebung des Trp-Restes genutzt werden (Burstein et al. 1973). Je polarer die Umgebung des Indolrings ist, umso mehr ist das Maximum zu kürzeren Wellenlängen verschoben. Über die Trp-Fluoreszenz können so Konformationsänderungen innerhalb eines Proteins (z.B. YidC) während der Interaktion mit anderen Proteinen (z.B. Pf3 coat) beobachtet und darüber die Stärke der Bindung bestimmt werden (Gerken et al. 2008; Abschnitt 3.5). YidC besitzt 11 Tryptophane, welche sich alle auf der periplasmatischen Seite des Proteins befinden (Abbildung 2.3-2, Abschnitt 2.3.2). Dabei sind alle bis auf die im P1-Loop lokalisierten Trp-Reste gleich Lösungsmittel-exponiert (Imhof et al. 2011). Das Fluoreszenzspektrum von in Detergenz solubilisiertem YidC WT zeigt ein Maximum bei 348 nm. Liegt YidC WT jedoch in Proteoliposomen rekonstituiert vor, so verschiebt sich das Fluoreszenzmaximum um  $\Delta\lambda = -4$  nm auf 344 nm (Abbildung 3.4-1). Dieser Wert ist bezeichnend für eine vorrangige Lage der Tryptophanreste an der Membran/Wasser Phase von YidC (Vivian et al. 2001, Burstein et al. 1973) und



**Abbildung 3.4-1: Vergleich der Tryptophan-Fluoreszenzspektren von solubilisiertem YidC WT in DDM (graue Linie) mit in DOPC rekonstituiertem YidC WT (schwarze Linie).**

liefert einen spektroskopischen Anhaltspunkt für eine erfolgreiche Rekonstitution des YidC Proteins. Ein weiterer Parameter, welcher Auskunft über die Konformation des Proteins gibt und aus den Emissionsspektren bestimmt werden kann, ist die spektrale Breite  $\Gamma$ , welche auch als Halbwertsbreite (HWB) bezeichnet wird. Sie definiert sich als die volle Breite des Spektrums, welche bei halbmaximaler Fluoreszenz auftritt. Die HWB lässt sich durch Anpassung des Spektrums mit der Log-Normal Verteilung (Gleichung 3-1) berechnen (Ladokhin et al. 2000).

$$F(\lambda)_{\log-normal} = F_0 \exp\left(-\frac{\ln 2}{\ln^2 \rho} \ln^2 \left[1 + \frac{(\lambda - \lambda_{max})(\rho^2 - 1)}{\rho \Gamma}\right]\right) \quad \text{Gleichung 3-1}$$

Dabei ist  $F_0$  das Fluoreszenzmaximum bei  $\lambda_{max}$ ,  $\Gamma$  die Halbwertsbreite (HWB) und  $\rho$  der Profil-Assymetrieparameter. Die HWB variiert zwischen 60 und 70 nm. Im Vergleich zu solubilisiertem YidC WT zeigt das rekonstituierte Protein eine deutlich verringerte HWB (siehe Abbildung 3.4-1). Diese Ergebnisse decken sich mit der Idee, daß der laterale Druck der Membran die Dynamik und den Konformationsraum eines Membranproteins beeinflussen (Gerken et al. 2003).

### 3.5 Titration von YidC Proteoliposomen mit Pf3 coat Protein

Für die Charakterisierung der Bindung von Pf3 coat an rekonstituiertes YidC wurden Fluoreszenz-Titrationsmessungen durchgeführt (Abschnitt 2.3.2). Dabei wurde die intrinsische Trp-Fluoreszenz des YidC Proteins gemessen. Als Substrat diente eine Trp-freie Mutante von Pf3 coat (Pf3W0 coat). Zunächst wurde die Änderung des Fluoreszenzmaximalwertes nach jedem Titrationsschritt nach Gleichung 3-2 bestimmt,

$$\Delta F_i = |F_i \cdot (1 + V_i / V_0) - F_0| \text{ Gleichung 3-2}$$

wobei  $F_i$  den Fluoreszenzwert beim  $i$ -ten Titrationsschritt und  $F_0$  den Ausgangsfluoreszenzwert von YidC ohne Substrat angibt. Durch das zunehmende Probenvolumen während der Titration wurden die Fluoreszenzwerte durch den Faktor  $(1+V_i/V_0)$ , mit dem zugegebenen Volumen beim  $i$ -ten Titrationsschritt  $V_i$  und dem Ausgangsvolumen  $V_0$  korrigiert. Aus den so ermittelten Maximalwerten der Fluoreszenzspektren sowie der zutitrierten Pf3 coat Konzentration wurde eine Bindungskurve erstellt. Ausgehend von der Annahme, dass YidC über eine Substratbindestelle verfügt, erfolgte die Anpassung der Bindungskurve mit der hyperbolischen Gleichung:

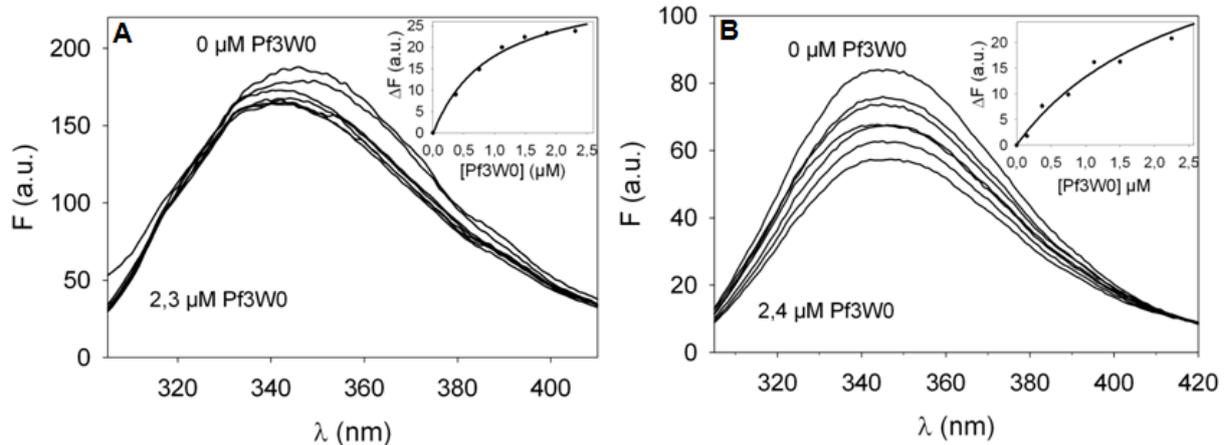
$$\Delta F = \Delta F_{\max} \frac{[Pf3]}{[Pf3] + K_D} \text{ Gleichung 3-3}$$

wobei  $\Delta F_{\max}$  die Änderung der Fluoreszenz bei Sättigung und  $K_D$  die Dissoziationskonstante ist. Somit konnte die Dissoziationskonstante  $K_D$  berechnet werden (Gerken et al. 2008). Es wurden jeweils die  $K_D$ -Werte aus 2 unabhängigen Messungen gemittelt.

#### 3.5.1 YidC WT-Proteoliposomen titriert mit Pf3W0 coat und Pf3-19A coat

Zu 0,2  $\mu\text{M}$  YidC rekonstituiert in DOPC bzw. PE/PG Liposomen wurde Pf3W0 coat bis 2,5  $\mu\text{M}$  titriert. Abbildung 3.5-1 zeigt die erhaltenen Fluoreszenzspektren und die aus den Maximalwerten bei 345 nm erstellten Bindungskurven für (A) YidC:DOPC sowie (B) YidC:PE/PG Proteoliposomen. Für YidC:DOPC Proteoliposomen wurde mittels Gleichung 3-3 ein  $K_D$ -Wert von  $(0,7 \pm 0,06) \mu\text{M}$  ermittelt. Die berechnete Dissoziationskonstante für YidC:PE/PG Proteoliposomen betrug hingegen  $K_D = (1,79 \pm 0,34) \mu\text{M}$ . Für die Fluoreszenzspektren des YidC konnten für beide Lipidsysteme gleiche HWB nach Gleichung 3-1 von  $\Gamma = 63 \text{ nm}$  berechnet werden.

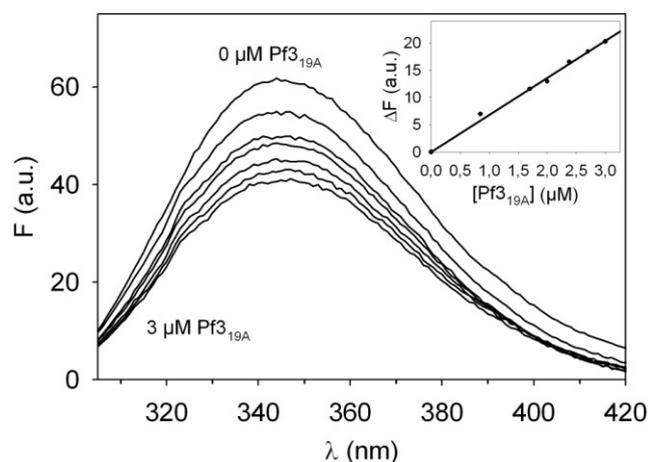
Im Fall von YidC:PE/PG Proteoliposomen musste zum Erhalt einer auswertbaren Bindungskurve mit einer NaCl-Konzentration von 250 mM gearbeitet werden (siehe Diskussion, Abschnitt 4.1).



**Abbildung 3.5-1: Fluoreszenzspektren und daraus kalkulierte Bindungskurven nach Titration von Pf3W0 coat zu (A) YidC WT:DOPC mit errechnetem  $K_D = 0,7 \mu\text{M}$  und (B) YidC WT:PE/PG Proteoliposomen mit errechnetem  $K_D = 1,79 \mu\text{M}$ .**

Als Kontrolle für die beobachtete Bindung von Pf3 coat an YidC WT wurde die Alanin-Mutante Pf3-19A coat zu YidC Proteoliposomen titriert. Bei dieser Mutante ist der hydrophobe Membrananker gegen 19 Alanin-Reste ausgetauscht. Bereits *in vivo* wurde gezeigt, daß dieses Substrat nicht mehr in YidC enthaltene Vesikel inseriert werden konnte (Xie et al. 2007).

Nach Titration von Pf3-19A coat zu YidC:DOPC Proteoliposomen wurde eine Bindungskurve in Form einer Gerade erhalten (Abbildung 3.5-2), was auf eine unspezifische Bindung dieser Pf3 coat Mutante an die YidC:DOPC Proteoliposomen hinweist.

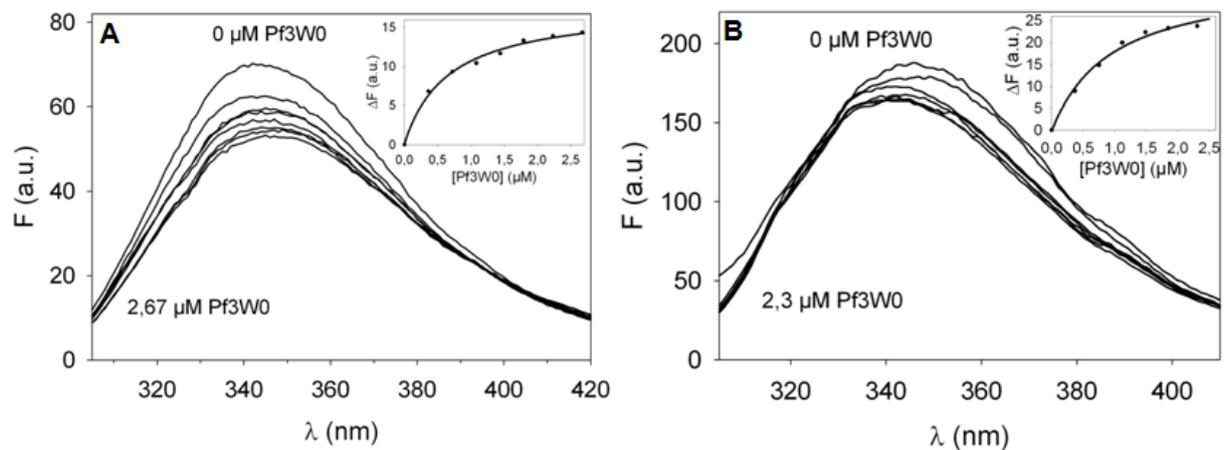


**Abbildung 3.5-2: Fluoreszenzspektren und daraus kalkulierte Bindungskurve nach Titration von Pf3-19A coat zu YidCWT:DOPC Proteoliposomen.**

Das gleiche Experiment wurde mit YidC:PE/PG Proteoliposomen durchgeführt, jedoch konnten keine auswertbaren Resultate erzielt werden. Erst in Anwesenheit von 300 mM NaCl wurde eine Bindungskurve erhalten, welche jedoch nur sehr schlecht gefittet werden konnte (Daten nicht gezeigt).

### 3.5.2 DOPC-Proteoliposomen von YidC Mutanten titriert mit Pf3W0 coat

Die Einzel-Cystein Mutanten von YidC wurden ebenfalls durch Titration von Pf3W0 coat auf ihre Fähigkeit der Substratbindung getestet. Um einen Vergleich zu den Daten des YidC WT zu erhalten, wurden die Mutanten ebenfalls mittels der Biobeads Methode rekonstituiert. Es wurden Proteoliposomen mit 0,2  $\mu\text{M}$  rekonstituiertem YidC-23C bzw. YidC-478C in eine Küvette vorgelegt und steigende Konzentrationen an Pf3W0 coat zutitriert. Die Dissoziationskonstante  $K_D$  wurde anschließend aus den erstellten Bindungskurven nach Gleichung 3-3 berechnet. Für die YidC-23C Proteoliposomen wurde ein  $K_D$ -Wert von  $(0,78 \pm 0,1) \mu\text{M}$  erhalten (Abbildung 3.5-3, A) und für die YidC-478C Proteoliposomen betrug der ermittelte  $K_D$ -Wert  $(0,97 \pm 0,17) \mu\text{M}$  (Abbildung 3.5-3, B). Damit wiesen die getesteten Mutanten wie der WT einen  $K_D$ -Wert von ca. 1  $\mu\text{M}$  auf.

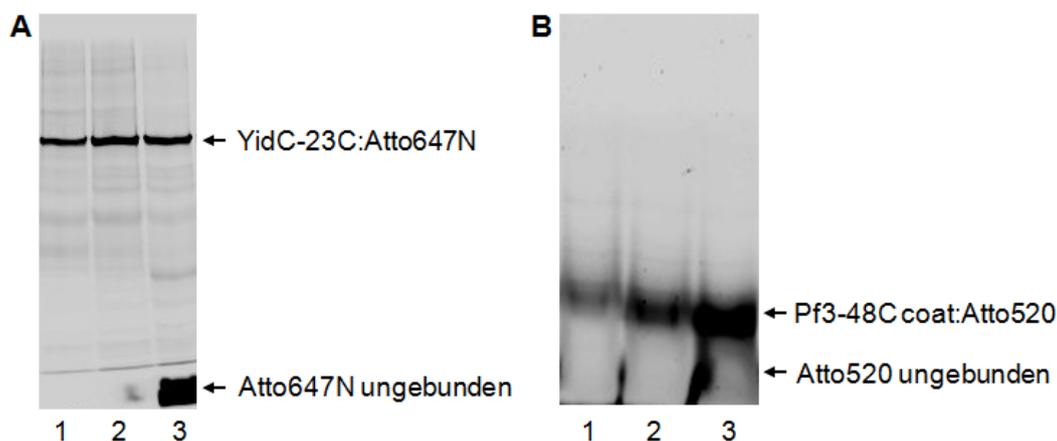


**Abbildung 3.5-3: Fluoreszenzspektren und daraus kalkulierte Bindungskurven nach Titration von Pf3W0 coat zu (A) YidC-23C:DOPC Proteoliposomen mit einem ermittelten  $K_D = 0,78 \mu\text{M}$  und (B) YidC-478C:DOPC Proteoliposomen mit einem ermittelten  $K_D = 0,97 \mu\text{M}$ .**

Die Fluoreszenzmaxima der rekonstituierten YidC Mutanten befanden sich wie beim YidC WT bei 345 nm. Ebenso wurden dem YidC WT entsprechende HWB von  $\Gamma = 65$  nm erhalten. Die Daten zeigen deutlich, dass die YidC Mutanten erfolgreich rekonstituiert werden konnten. Die ermittelten Dissoziationskonstanten zeigten zudem, dass sich die YidC Mutanten bei der Substratbindung wie der YidC WT verhalten. Anhand der beobachteten Trp-Fluoreszenzlöschung nach Zugabe von Pf3W0 coat und der Lage der Trp Reste in YidC wurde gezeigt, dass die Substratbindungsstelle, welche sich an der cytoplasmatischen Seite der Insertase befindet, konformationell mit der periplasmatischen Region gekoppelt ist. Es konnte gezeigt werden, daß alle periplasmatischen Regionen von der Konformationsänderung betroffen sind (Imhof et al. 2010).

### 3.6 Fluoreszenzmarkierung von Einzel-Cystein Mutanten

Für die Interaktionsstudien von YidC mit seinem Substrat Pf3 coat im Einzelmolekül-experiment, wurden beide Interaktionspartner spezifisch mit Fluoreszenzfarbstoffen, welche ein FRET-Paar bilden, markiert (Abschnitt 2.2.3). Nach erfolgter Markierung der YidC Einzel-Cystein Mutanten mit Atto647N Maleimid und Abtrennung freien Farbstoffs durch eine Gelfiltration wurden die Proben über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mittels eines Fluoreszenzscanners (Typhoon Trio+) visualisiert. Abbildung 3.6-1 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer Markierung von YidC-23C mit Atto647N (A) sowie einer Markierung von Pf3-48C coat mit Atto520 (B).



**Abbildung 3.6-1:** Fluoreszenzbild eines A) 12% SDS-Gels beladen mit markiertem YidC-23C:Atto647N und Visualisierung der Elutionsfraktionen 1-3 erfolgte durch den Typhoon-Scanner ( $\lambda_{\text{ex}} = 635 \text{ nm}$ , Emissionsfilter: BP 670/20). In B) ist das Fluoreszenzbild eines 15% SDS-Tricin-Gels beladen mit markiertem Pf3-48C coat:Atto520 und Visualisierung der Elutionsfraktionen 1-3 durch den Typhoon-Scanner ( $\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$ , Emissionsfilter: BP 555/30) dargestellt.

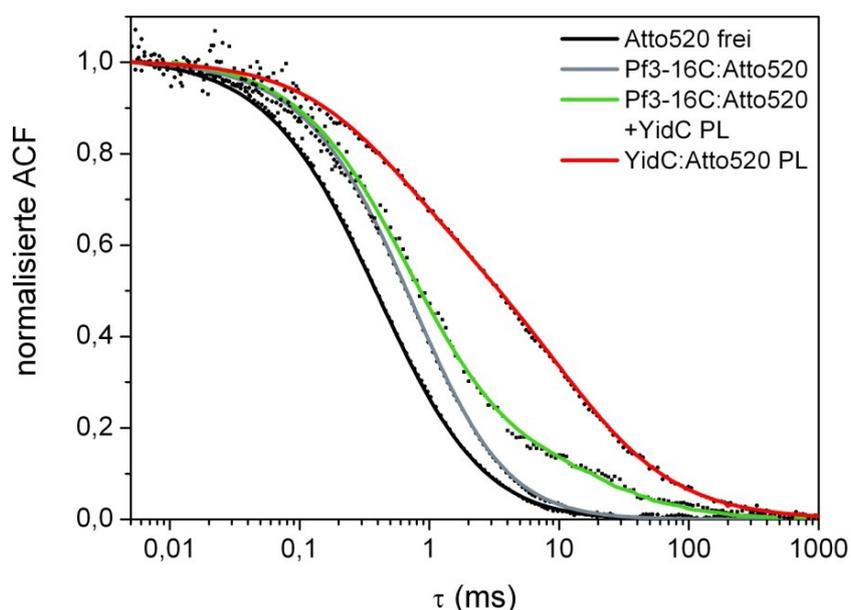
Es ist deutlich die erfolgreiche Fluoreszenzmarkierung beider Proteine zu erkennen. Der ungebundene Farbstoff konnte effizient von markiertem Protein abgetrennt werden. Von den Fraktionen ohne freien Farbstoff wurde die Markierungseffizienz bestimmt (Abschnitt 2.2.3). Für die YidC Mutanten wurde eine durchschnittliche Markierungseffizienz von 14% ermittelt. Die Bestimmung der Markierungseffizienz gestaltete sich schwierig, da durch die Farbstoffabtrennung über die Gelfiltrationssäule eine sehr große Verdünnung des Proteins stattfand und Pf3 coat nur über einen Trp-Rest verfügt, welcher durch die Absorption bei 280 nm detektiert werden kann. Die ermittelte Markierungseffizienz für Pf3 coat:Atto520 lag bei ca. 1%.

### 3.7 Einzelmolekülexperimente zur Interaktion von YidC mit Pf3 coat

Mit Hilfe der Einzelmolekülmessungen können Interaktionen zwischen zwei fluoreszenzmarkierten Proteinen im Detail untersucht werden. In der hier vorliegenden Arbeit wurden die durch ein FRET-Paar markierten Proteine, Pf3 coat:Atto520 (Donor) und YidC:Atto647N (Akzeptor), auf Einzelmolekülniveau untersucht. Der Försterradius dieses FRET-Paares ist mit 5,3 nm angegeben (Atto-Tec). Die Experimente erfolgten in Zusammenarbeit mit dem 3. Physikalischen Institut der Universität Stuttgart (Michael Börsch, Stefan Ernst).

#### 3.7.1 Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie (FCS)

Mittels FCS-Messungen ist es möglich, die Diffusionszeit von Molekülen zu bestimmen. Durch Brown'sche Molekularbewegung diffundieren die Moleküle durch das von einem fokussierten Laser erzeugte konfokale Anregungsvolumen. Die Diffusionszeit, die Zeit in der das Molekül das angeregte Konfokalvolumen durchquert, ist dabei abhängig von der Größe bzw. Masse des Moleküls und das durch den optischen Aufbau definierte Anregungsvolumen.



**Abbildung 3.7-1: Normierte Autokorrelationsfunktionen (ACF) von freiem Atto520 (schwarz), freiem Pf3-16C:Atto520 (dunkelgrau), YidC-23C:Atto520 Proteoliposomen (rot) sowie inseriertem Pf3-16C:Atto520 (grün) in YidC Proteoliposomen.**

Abbildung 3.7-1 zeigt die normierten Autokorrelationsfunktionen (ACF) der gemessenen Proben, berechnet nach Gleichung 2-3 (Abschnitt 2.4.1). Zunächst wurde freier Atto520 Farbstoff gemessen (schwarze ACF). Dafür wurde eine Farbstofflösung soweit verdünnt, dass ca. 1 bis 2 Teilchen gleichzeitig im Focus angeregt wurden. Danach wurde, wie eben beschrieben, die markierte Pf3 coat

Mutante Pf3-16C coat:Atto520 gemessen (dunkelgraue ACF). Zur Bestimmung der Diffusionszeit von inseriertem Pf3 coat wurden zunächst DOPC-Proteoliposomen mit nicht markiertem YidC WT hergestellt. Anschließend wurden die Proteoliposomen mit Pf3-16C:Atto520 5 min inkubiert, damit genug Pf3 coat inserieren konnte. Somit wurde gewährleistet, dass ausreichend Pf3 coat in Proteoliposomen vorlag, um eine eindeutige Population an inseriertem Pf3 coat zu erhalten (grüne ACF). Um sicherzustellen, dass die so bestimmte Diffusionszeit auch von Pf3 coat enthaltenen Proteoliposomen stammte, und nicht von der Oligomerisierung des Pf3 coat Proteins herrührte, wurde die YidC Mutante YidC-23C mit Atto520 markiert. Anschließend wurden damit Proteoliposomen hergestellt und diese in gleicher Weise wie die anderen Ansätze gemessen (rote ACF). In Tabelle 3-1 sind die für die verwendeten Moleküle gemessenen Diffusionszeiten aufgelistet.

Probe	Diffusionszeit $\tau_D$ (ms)	Diffusionskoeffizient $D$ ( $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )
Atto520 frei	0,405	$2,93 \pm 0,1 \cdot 10^{-6}$
Pf3-16C:Atto520	1,096	$1,2 \pm 0,1 \cdot 10^{-6}$
YidC:Atto520 Proteoliposomen	29,425	$4,2 \pm 0,3 \cdot 10^{-8}$
Pf3-16C:Atto520 + YidC Proteoliposomen	31,076	$3,8 \pm 0,3 \cdot 10^{-8}$

**Tabelle 3-1: Auflistung der über FCS-Messung bestimmten Diffusionszeiten sowie der daraus errechneten Diffusionskoeffizienten.**

Mit Hilfe der ermittelten Diffusionszeit ist es möglich nach Gleichung 3-4 den Diffusionskoeffizienten  $D$  der einzelnen Proben zu berechnen.

$$\tau_D = \frac{\omega_0^2}{4 \cdot D} \quad \text{Gleichung 3-4}$$

Dabei ist  $\tau_D$  die gemessene Diffusionszeit des Fluorophors und  $\omega_0^2$  der radiale Durchmesser ( $1/e^2$ -Wert) des durch den Laser erzeugten Fokalvolumens.

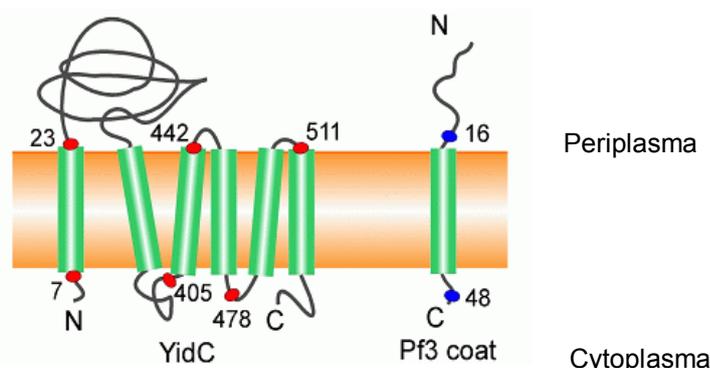
Der ermittelte Diffusionskoeffizient des freien Farbstoffs deckt sich mit dem bereits bekannten Diffusionskoeffizienten von Rhodamin 110 ( $D = 2,8 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ; Pristiniski et al. 2005). Rhodamin 110 wurde an jedem Messtag zur Bestimmung des konvokalen Volumens  $\omega_0$  benutzt (Gleichung 3-4). Aus dem so berechneten  $\omega_0$  konnte nun der Diffusionskoeffizient für den Atto520 Farbstoff berechnet werden. Damit wurde sichergestellt, dass stets die gleichen Messbedingungen vorherrschten und die Ergebnisse damit vergleichbar waren.

Im Vergleich zu freiem Farbstoff ( $\tau_D = 0,405$  ms) weist markiertes Pf3 coat eine mehr als doppelt so hohe Diffusionszeit auf ( $\tau_D = 1,096$  ms). Dies ist zu erwarten, da Pf3 coat mit 5 kDa deutlich größer ist als der Farbstoff (ca. 0,5 kDa) und damit langsamer diffundiert. In Proteoliposomen inseriertes Pf3 coat zeigte zwei Diffusionszeiten (grüne ACF). Die aus dem oberen Bereich der ACF ermittelte Diffusionszeit lag wie bei freiem Pf3 coat im Bereich von 1 ms und resultiert aus freiem, nicht inseriertem Pf3 coat. Die ermittelte Diffusionszeit im unteren Bereich der ACF lag dagegen bei 31 ms und zeigte damit die Population an inseriertem Pf3 coat. Die zwei verschiedenen Diffusionszeiten rührten von einem 2-Komponenten-fit der Autokorrelationsfunktion her. Da Pf3 coat bei den Messungen im Überschuß gegenüber den YidC-Proteoliposomen vorlag, wurden nicht alle Pf3 coat Proteine in die Liposomen inseriert und daher musste der 2-Komponenten-fit angewendet werden, um die Diffusionszeit der kleineren Population an inseriertem Pf3 coat ermitteln zu können.

Als Kontrolle wurde die Diffusionszeit von Proteoliposomen mit Atto520 markiertem YidC-23C bestimmt und dabei eine vergleichbare Diffusionszeit ermittelt ( $\tau_D = 29,425$  ms). Diese Kontrolle diente dem zweifelsfreien Nachweis, dass die erhaltene Diffusionszeit des inserierten Pf3 coat in Proteoliposomen herrührte und nicht von aggregiertem Pf3 coat in Lösung stammte. Auf der von Proteoliposomen mit inseriertem Pf3 coat ermittelten Diffusionszeit von 31 ms basierend, wurden für die späteren FRET-Auswertungen nur Ereignisse mit einer Dauer im Bereich von 14 – 60 ms untersucht.

### 3.7.2 Bestimmung der FRET-Effizienzen aus YidC – Pf3 coat Interaktionen

Um ein möglichst genaues Bild über die Interaktion von Pf3 coat mit YidC zu erhalten, wurden Einzelmolekülmessungen durchgeführt. Dabei ist es möglich Einzelereignisse, wie z.B. die Insertion von Pf3 coat in YidC Proteoliposomen mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Proteinen zu verfolgen (siehe Abschnitt 2.4.3).



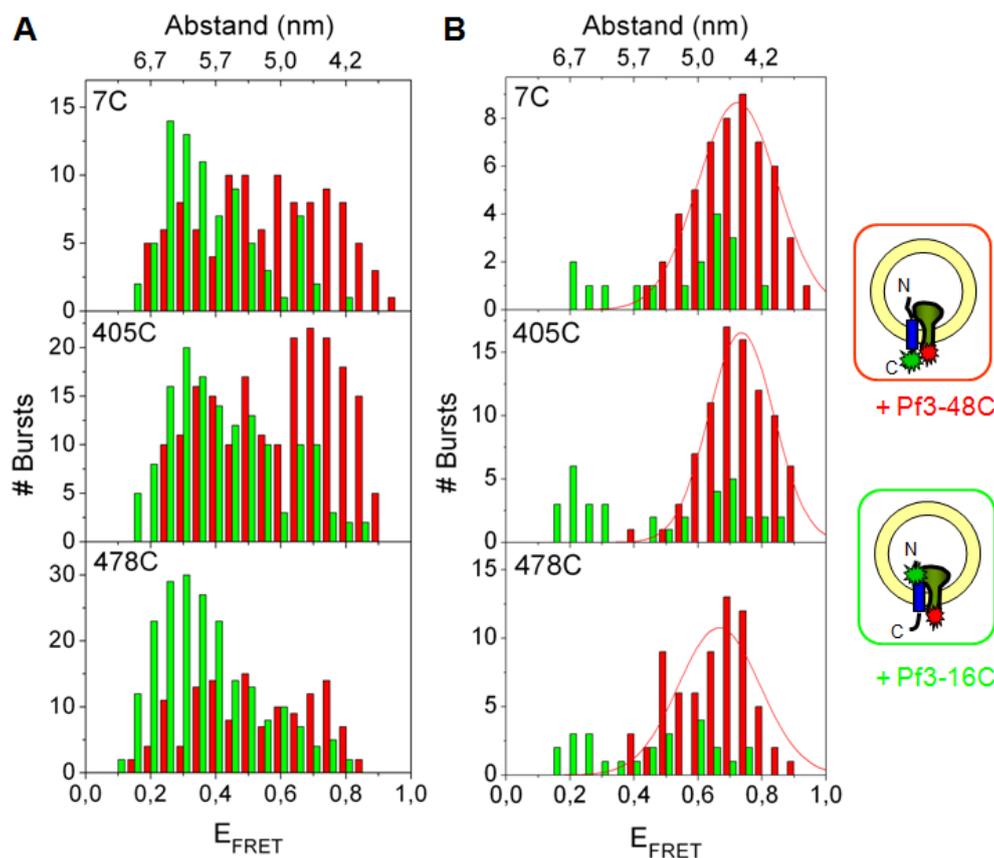
**Abbildung 3.7-2: Schematische Darstellung der Cystein-Reste in YidC (links) und Pf3 coat (rechts) zur spezifischen Markierung.**



Bei Betrachtung aller FRET-Ereignisse (A) zeigten sich zwei Verteilungen, abhängig davon wie die Fluorophore an den Proteinen zueinander orientiert vorlagen. Waren die Fluorophore über die Membran getrennt, wurden hauptsächlich FRET-Effizienzen ( $E_{\text{FRET}}$ ) im niedrigen Bereich erhalten (rote Verteilung). Bei gleich orientierter Lage der Fluorophore zueinander wurden hingegen vorrangig hohe  $E_{\text{FRET}}$ -Werte erhalten (grüne Verteilung). Durch Selektierung jener Bursts, welche eine Änderung von  $E_{\text{FRET}}$  zeigten und damit einen aktiven Transport des Pf3 coat darstellten, reduzierte sich die Anzahl der Bursts (B). Damit verdeutlichte sich auch die Lage der Verteilungen der jeweiligen Orientierung der Fluorophore zueinander. Die aus den Maxima der Verteilungen erhaltenen  $E_{\text{FRET}}$ -Werte konnten mittels Gleichung 2-6 zur Berechnung der Abstände der Fluorophore während des Transportvorganges verwendet werden (Abschnitt 3.7.3). Man erkennt deutlich, dass bei den periplasmatisch markierten YidC Mutanten mit Pf3-16C coat eine Verteilung im Bereich hoher  $E_{\text{FRET}}$ -Werte auftrat, was mit kleineren Abständen der Farbstoffe zueinander korrelierte (grüne Verteilung). Der mittlere Abstand der Fluorophore lag dabei im Bereich von  $(4,5 \pm 0,5)$  nm (grüne Kurve). Im Gegensatz dazu wurden für die periplasmatisch markierten YidC Mutanten mit Pf3-48C coat Verteilungen mit niedrigen  $E_{\text{FRET}}$ -Werten und korrelierenden großen Abständen der Fluorophore zueinander erhalten (rote Verteilung). Der aus dem  $E_{\text{FRET}}$  Maximum errechnete Abstand lag im Bereich von  $(6,5 \pm 0,5)$  nm, was durch die räumliche Trennung der Fluorophore über die Membran zu erklären ist (siehe Diskussion, Abschnitt 4.3).

### **Cytoplasmatisch markiertes YidC in Anwesenheit von Pf3 coat**

Die Analyse der Daten von den drei cytoplasmatisch markierten YidC Mutanten mit Pf3-16C coat sowie Pf3-48C coat ergab hingegen Histogramme mit entgegengesetzten Verteilungen (Abbildung 3.7-4). Die Histogramme aller detektierten FRET-Ereignisse der drei cytoplasmatisch markierten YidC Mutanten (A) zeigten ebenfalls zwei Verteilungen, abhängig davon wie die Fluorophore an den Proteinen zueinander orientiert vorlagen. Bei entgegengesetzt orientierten und damit über die Membran getrennt vorliegenden Fluorophoren wurden hauptsächlich niedrige  $E_{\text{FRET}}$ -Werte erhalten (grüne Verteilung). Bei gleich orientierter Lage der Fluorophore zueinander, wurden hingegen vorrangig hohe  $E_{\text{FRET}}$ -Werte erhalten (rote Verteilung). Nach Selektierung jener Bursts, welche eine Änderung von  $E_{\text{FRET}}$  zeigten und damit einen aktiven Transport von Pf3 coat, minimierte sich die Anzahl der Ereignisse (B), wobei sich jedoch auch hier die Lage der Verteilungen verdeutlichte. In Anwesenheit von Pf3-48C coat wurden nun  $E_{\text{FRET}}$ -Werte im hohen Bereich und damit korrelierenden niedrigen Abständen der Fluorophore zueinander detektiert (rote Verteilung). Dies war durch die gleiche Orientierung der Fluorophore bedingt und es konnte ein mittlerer Abstand von  $(4,5 \pm 0,5)$  nm ermittelt werden.

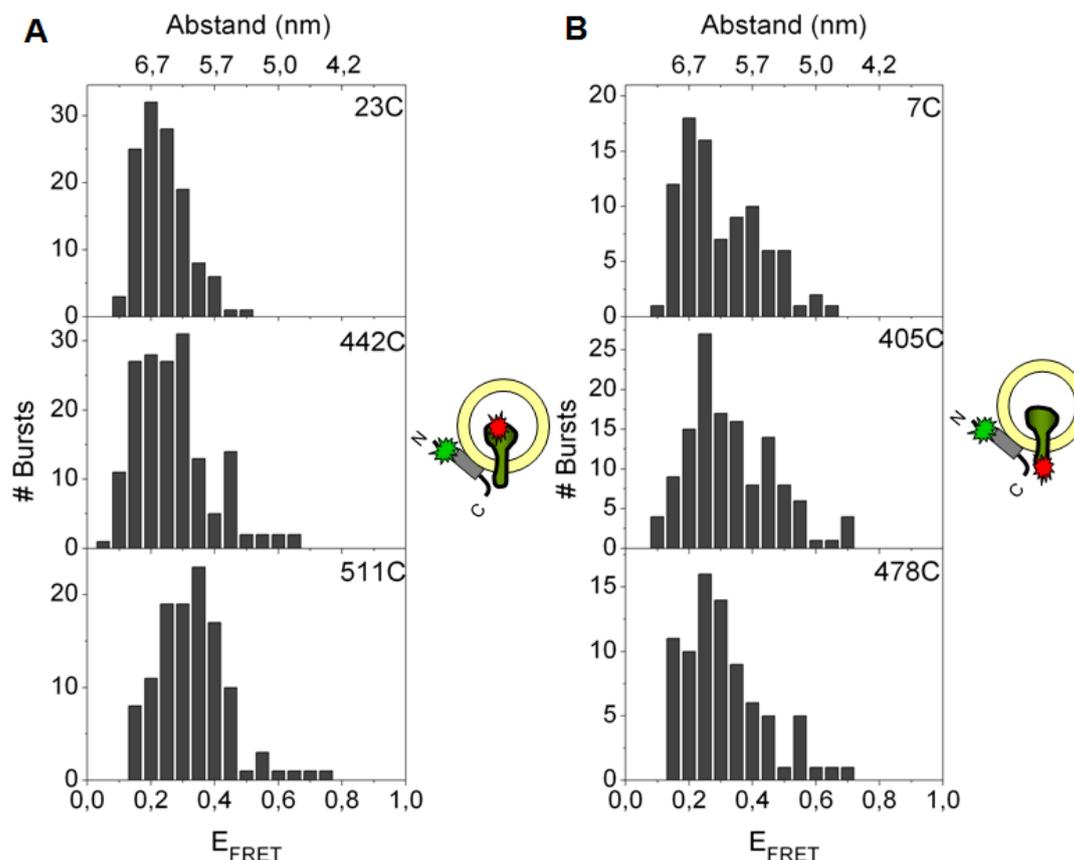


**Abbildung 3.7-4:** Histogramme der FRET-Effizienzen (A) aller analysierten FRET-Ereignisse zwischen cytoplasmatisch markiertem YidC und Pf3 coat und (B) nach Selektion der Bursts, welche eine Änderung von  $E_{\text{FRET}}$  und damit aktiven Transport zeigten.

Im Gegensatz dazu lag das Maximum der Verteilungen in Anwesenheit von Pf3-16C coat nun bei niedrigen  $E_{\text{FRET}}$ -Werten (grüne Verteilung) und damit korrelierenden großen Abständen der Fluorophore, welche mit  $(6,7 \pm 0,5)$  nm ermittelt wurden. Dies war mit der entgegengesetzten Orientierung der Fluorophore zu erklären (siehe Diskussion, Abschnitt 4.3).

#### Kontrolle mit markierten YidC Mutanten in Anwesenheit von Pf3-19A16C coat

Als Kontrolle wurden dieselben Experimente mit einer Alanin Mutante von Pf3 coat durchgeführt. Diese Mutante, Pf3-19A16C coat, ist aufgrund des fehlenden hydrophoben Membranankers nicht mehr in der Lage an YidC zu binden (siehe Abschnitt 3.5.1) und in YidC-Proteoliposomen zu inserieren (Xie et al. 2007). Abbildung 3.7-5 verdeutlicht, dass sowohl für die drei periplasmatisch (A) wie auch die drei cytoplasmatisch (B) markierten YidC Mutanten nur Ereignisse mit geringen  $E_{\text{FRET}}$ -Werten detektiert wurden. Dies bestätigt, dass diese Mutante nicht mehr in der Lage ist in YidC Proteoliposomen zu inserieren.

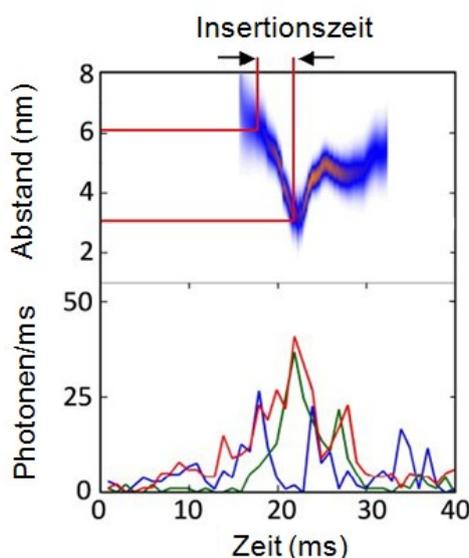


**Abbildung 3.7-5: Histogramme von FRET-Effizienzen der analysierten FRET-Ereignissen von A) periplasmatisch und B) cytoplasmatisch markierten YidC Mutanten in Anwesenheit einer Alanin-Mutante von Pf3 coat, Pf3-19A16C.**

Im Vergleich zu den periplasmatisch markierten YidC Mutanten waren die Verteilungen der cytoplasmatisch markierten YidC Mutanten breiter. Dies ist mit der gleichen Orientierung der Fluorophore zueinander zu erklären. Auch bei unspezifischer Bindung der Pf3 Mutante an YidC bzw. zufällige Anlagerung des Pf3 coat über hydrophobe Wechselwirkungen an die Proteoliposomen können geringere Abstände zwischen den Fluorophoren erhalten werden, als wenn diese über die DOPC-Doppelschicht getrennt wären. Dennoch zeigten sowohl die Maxima der Verteilungen der cytoplasmatisch markierten YidC Mutanten wie auch die periplasmatisch markierten YidC Mutanten hauptsächlich Ereignisse mit niedrigen  $E_{\text{FRET}}$ -Werten. Die damit korrelierenden großen Abstände der Fluorophore zueinander (im Bereich von 6,7 nm) waren unabhängig davon, wo sich am YidC das Fluorophor befand. Somit konnten die aus den Fluoreszenz-Titrationsmessungen erhaltenen Ergebnisse auch auf Einzelmolekülebene bestätigt werden.

### 3.7.3 Einzel-Photonen-Bursts zeigen den aktiven Transport von Pf3 coat in YidC Proteoliposomen

Mit Hilfe der Einzelmolekülmessungen ist es möglich den Insertionsprozess von Pf3 coat in YidC-Proteoliposomen zeitaufgelöst in Form von Einzel-Photonen Bursts zu verfolgen. Solch ein Einzel-Photonen-Burst ist in Abbildung 3.7-6 exemplarisch dargestellt. Damit kann zum einen die Abstandsänderung der beiden Fluorophore während des Insertionsprozesses wie auch die Dauer dieses Insertionsprozesses genauer bestimmt werden. Der zeitliche Verlauf der Abstandsänderung kann aus der FRET-Effizienz nach Gleichung 2-6 (Abschnitt 2.4.2) bestimmt werden.



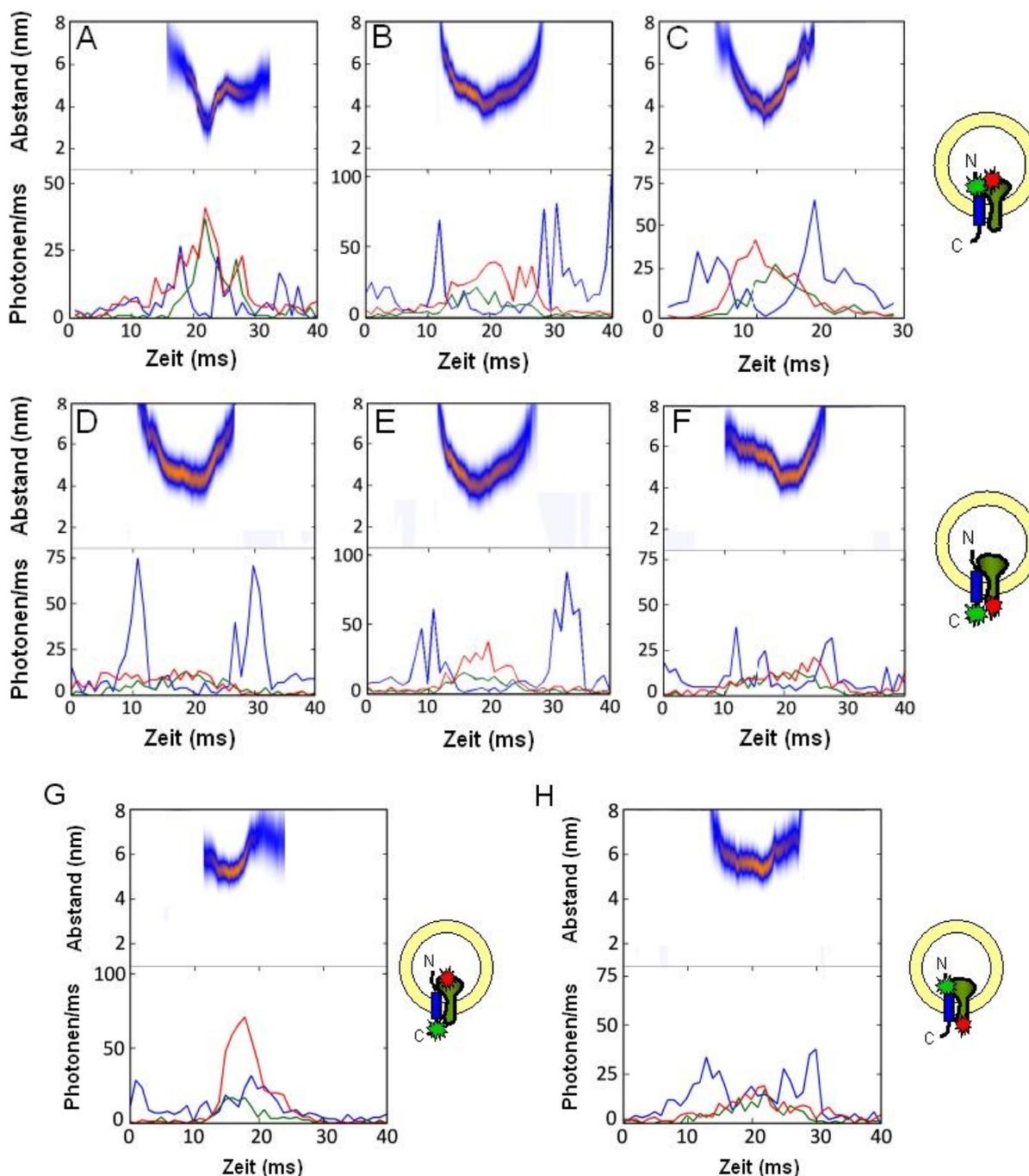
**Abbildung 3.7-6: Einzel-Photonen-Burst des aktiven Transports eines Pf3-16C coat Proteins in ein YidC-23C Proteoliposom. Der untere Teil der Abbildung zeigt die Signale des Donors (blau), Akzeptortests (rot) sowie das FRET-Signal (grün). Im oberen Teil der Abbildung ist der aus den FRET-Signalen ermittelte Abstand der Fluorophore mit farblich kodierter Wahrscheinlichkeit dargestellt (orange: hohe Wahrscheinlichkeit).**

Zunächst näherten sich beide Fluorophore bis auf wenige Nanometer an. Diese Annäherung zeigt vermutlich den Insertionsprozeß des Pf3 coat in die Membran. Die Dauer dieses Prozessabschnittes konnte dabei mit einer Zeitauflösung von 1 ms bestimmt werden. Nach kurzer Verweildauer beider Fluorophore mit diesem geringen Abstand entfernten sich beide Fluorophore wieder. Dies stellt vermutlich die laterale Entlassung des nun membranständigen Pf3 coat in die Membran dar.

In Abbildung 3.7-7 sind Einzel-Photonen-Bursts aller verwendeten YidC-Mutanten mit beiden Pf3 coat Mutanten dargestellt, welche den gesamten Insertionsprozess zeigen.

Bei gleicher Orientierung der Fluorophore von YidC und Pf3 coat (A-C - periplasmatisch markiertes YidC in Anwesenheit von Pf3-16C coat und D-F - cytoplasmatisch markiertes YidC in Anwesenheit von Pf3-48C coat) wurde jeweils

eine Annäherung der Fluorophore während der Insertion von Pf3 coat in die Membran auf unter 4 nm beobachtet.

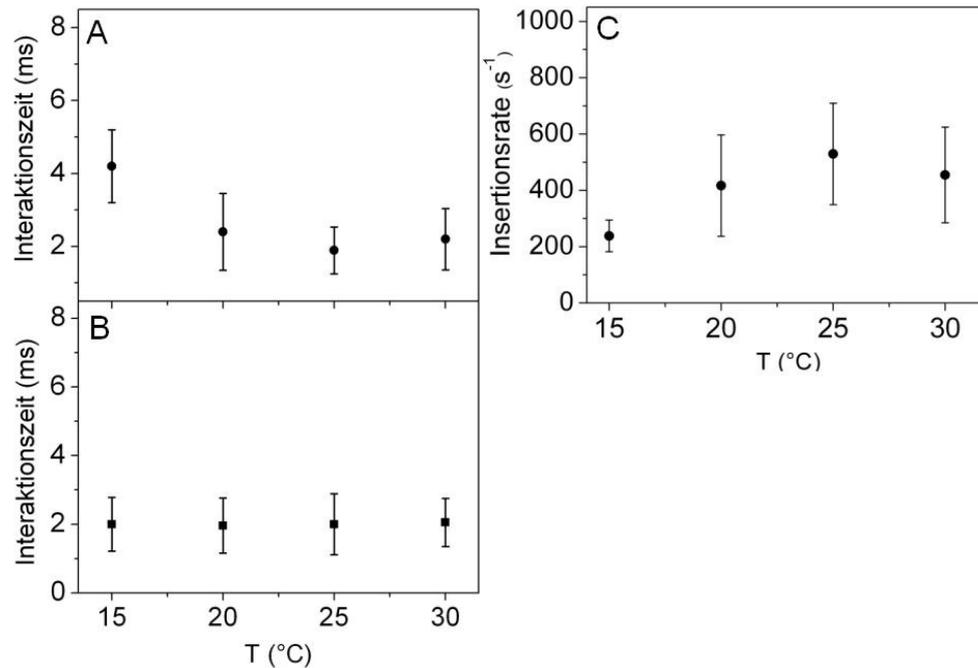


**Abbildung 3.7-7: Einzel-Photonen-Bursts des aktiven Transports der periplasmatisch markierten YidC Mutanten (A-23C; B-442C; C-511C) mit Pf3-16C coat sowie der cytoplasmatisch markierten YidC Mutanten (D-7C; E-405C; F-478C) mit Pf3-48C coat. G zeigt YidC-7C mit Pf3-16C coat und H zeigt YidC-23C mit Pf3-48C coat. Der obere Teil jeder einzelnen Abbildung zeigt die aus den FRET-Signalen ermittelten Abstände mit farblich kodierter Wahrscheinlichkeit (orange: hohe Wahrscheinlichkeit).**

Der zeitliche Verlauf dieses Prozesses wurde mit 2 – 4 ms bestimmt. Nach einer kurzen Verweildauer der Fluorophore mit diesem geringen Abstand zueinander (bis zu 10 ms), konnte die laterale Freisetzung des Pf3 coat nach erfolgter Insertion des Pf3 coat anhand der Abstandszunahme der Fluorophore beobachtet werden (bis auf über 6 nm). Bei entgegengesetzt orientierten Fluorophoren hingegen (G – YidC-23C in Anwesenheit von Pf3-48C coat und H – YidC-7C in Anwesenheit von Pf3-16C coat) blieb der Abstand während der Insertion dagegen bei über 5 nm, was auf die räumliche Trennung der Fluorophore über die Membranbreite hindeutet, welche für DOPC-Lipide mit 5 nm bestimmt wurde (Darkes and Bradshaw 2000; siehe Diskussion, Abschnitt 4.3).

### 3.7.4 Temperaturabhängigkeit des Insertionsprozesses

Da es sich bei dem Insertionsprozess um eine enzymatisch katalysierte Reaktion handelt, wurde deren Temperaturabhängigkeit untersucht. Dazu wurde die Insertion bei vier verschiedenen Temperaturen (15, 20, 25 und 30°C) mit YidC-23C:DOPC-Proteoliposomen und Pf3-16C coat sowie mit YidC-405C:DOPC-Proteoliposomen und Pf3-48C coat gemessen. Bei der Analyse der Meßdaten wurden nur Ereignisse berücksichtigt, die eine Änderung der FRET-Effizienz ( $E_{\text{FRET}}$ ) und damit des Abstandes von niedrigen  $E_{\text{FRET}}$ - (ca. 0,2  $\cong$  6 nm) zu hohen  $E_{\text{FRET}}$ -Werten (ca. 0,8  $\cong$  3,5 nm) zeigten. Für die Auswertung wurde die Dauer dieses Übergangs in ms bestimmt (siehe Abbildung 3.7-6). Von den ermittelten Daten wurde der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt. Werte außerhalb der Standardabweichung wurden anschließend aus der Betrachtung gestrichen und von den nun korrigierten Werten nochmals die Standardabweichung des Insertionsprozesses bestimmt. Zur grafischen Darstellung wurden die ermittelten Werte gegen die Temperatur aufgetragen (Abbildung 3.7-8, A – YidC-23C mit Pf3-16C coat und B – YidC-405C mit Pf3-48C coat). Die Insertionsrate, dargestellt in Abbildung 3.7-8 C, berechnet sich als reziproker Wert der Interaktionszeit aus Abbildung 3.7-8 A in  $\text{s}^{-1}$ . Dabei konnte mit den YidC-23C Proteoliposomen die Insertionszeit des Pf3-16C coat ermittelt werden, da bei dieser Pf3 coat Mutante der markierte N-Terminus über die Membran transloziert wurde. Bei den YidC-405C Proteoliposomen wurde hingegen die Interaktionszeit mit Pf3-48C coat bestimmt, da der markierte C-Terminus der Pf3 coat Mutante nicht transloziert wird. Die Insertion konnte somit nur indirekt beobachtet werden. Zur Ermittlung der Insertionsrate von Pf3-16C coat in YidC-23C Proteoliposomen wurde der reziproke Wert der Insertionszeit (Abbildung 3.7-8, A) gegen die Temperatur aufgetragen (Abbildung 3.7-8, C).



**Abbildung 3.7-8: Temperaturabhängigkeit der Insertionszeit von Pf3-16C coat in (A) periplasmatisch markierte YidC-23C-Proteoliposomen, die Temperaturabhängigkeit der Interaktionszeit von Pf3-48C coat mit cytoplasmatisch markierten YidC-405C-Proteoliposomen (B) sowie den aus (A) berechneten Insertionsraten (C).**

Bei Erhöhung der Temperatur von 15°C auf 20°C konnte eine Halbierung der Insertionszeit von 4 auf 2 ms beobachtet werden (A). Damit einhergehend zeigte sich eine Verdopplung der Insertionsrate von  $(238 \pm 84) \text{ s}^{-1}$  auf  $(417 \pm 185) \text{ s}^{-1}$  (C). Zwischen 20°C und 30°C waren die Änderungen weniger drastisch. Dennoch zeigte sich ein Maximum der Insertionsrate von  $(529 \pm 184) \text{ s}^{-1}$  bei 25°C, was auf ein Temperaturoptimum der durch die Insertase YidC vermittelten Insertion von Pf3 coat in die Proteoliposomen hindeuten könnte. Im Gegensatz zur Insertion sollte die Bindung von Pf3 coat an die YidC Proteoliposomen weitgehend unabhängig von der Temperatur sein. Dazu wurden Messungen mit cytoplasmatisch markiertem YidC-405C Proteoliposomen in Anwesenheit von Pf3-48C coat durchgeführt. Dabei befanden sich beide Fluorophore außerhalb des Vesikels und zeigten somit die Interaktion beider Proteine während des Insertionsvorganges. Bei allen vier gemessenen Temperaturen wurde eine gleichbleibende Interaktionszeit von  $(2 \pm 0,4) \text{ ms}$  gemessen. Damit konnte die vermutete Unabhängigkeit von der Temperatur bei der Bindung zwischen Pf3 coat und YidC Proteoliposomen bestätigt werden.



## 4 Diskussion

Das Phagenhüllprotein Pf3 coat ist das wohl am besten untersuchte Substrat des YidC-only Insertionsweges. Die bisherigen Erkenntnisse erlaubten einen groben Überblick über den Ablauf des Insertionsvorganges. Bisherige Untersuchungen *in vitro* zeigten den initialen Bindungsschritt des Pf3 coat Proteins an YidC. Dabei wurde die Bindung von Pf3 coat an Detergenz-solubilisiertes YidC mittels Fluoreszenz-Titrationsmessungen charakterisiert (Gerken et al. 2008). An diese bisherigen Ergebnisse anknüpfend wurde nun zunächst die Bindung von Pf3 coat an YidC-Proteoliposomen untersucht und mittels fluoreszenzspektroskopischer Methoden näher charakterisiert. Außerdem wurde der gesamte Insertionsprozess mit Hilfe von Einzelmolekülmessungen detailliert untersucht. Es konnte erstmals die Insertion eines einzelnen Pf3 coat Moleküls in YidC enthaltende Vesikel zeitaufgelöst dargestellt und dabei die Abstände beider Proteine während des Prozesses ermittelt werden.

### 4.1 Bindung von Pf3 coat an YidC-Proteoliposomen

Der erste Schritt bei der Insertion von Pf3 coat in die Membran ist die spezifische Bindung des Substrates an YidC. Dieser initiale Bindungsschritt wurde mittels Fluoreszenz-Titrationsmessungen näher charakterisiert. Dabei wurde die Änderung der intrinsischen Trp-Fluoreszenz von YidC nach Substratbindung gemessen. Als Substrat diente die Trp-freie Pf3 coat Mutante, Pf3W0 coat.

#### YidC WT-Proteoliposomen

Durch Titration von YidC WT-Proteoliposomen mit Pf3W0 coat konnte mit den erhaltenen Fluoreszenzspektren eine Bindungskurve erstellt werden (Abschnitt 3.5.1). Nach Anpassung der Kurve mit der hyperbolen Gleichung 3-3 wurde die Dissoziationskonstante  $K_D$  bestimmt. Der ermittelte  $K_D$ -Wert der Bindung von Pf3W0 coat an YidC WT:DOPC-Proteoliposomen lag mit  $K_D = (0,7 \pm 0,06) \mu\text{M}$  im Bereich von dem bereits zuvor erhaltenen Wert von  $K_D = 1 \mu\text{M}$ , gemessen mit solubilisiertem, ANS-markiertem YidC WT (Gerken et al. 2008). Somit konnte die Stärke der Bindung zwischen YidC und seinem Substrat Pf3 coat auf zwei Arten bestimmt und verifiziert werden. Bereits anhand der Lage des Fluoreszenzmaximums sowie der Spektrenbreite konnte gezeigt werden, dass solubilisiertes sowie rekonstituiertes YidC die gleiche Konformation aufweist. Daraus lässt sich schließen, dass die Bindung des Pf3W0 coat an solubilisiertes sowie rekonstituiertes YidC vergleichbar ist, was mit den Titrationsmessungen und den daraus erhaltenen  $K_D$ -Werten bestätigt wurde.

Im Gegensatz dazu wurde für das Membransystem 75% DOPE / 25% DOPG (PE/PG) ein  $K_D$ -Wert von  $(1,79 \pm 0,34) \mu\text{M}$  erhalten. Da es sich hierbei um eine andere Lipidzusammensetzung der Membran handelt, ist eine Abweichung in der Dissoziationskonstante möglich. Dennoch könnten andere Effekte dabei eine Rolle spielen. So konnte eine eindeutige Bindungskurve für PE/PG-Proteoliposomen erst in Gegenwart von 250 mM NaCl bestimmt werden. Dieser Umstand könnte mit der Ladungsverteilung des Pf3 coat Proteins und den geladenen Phospholipid - Kopfgruppen von DOPG erklärbar sein. Pf3 coat hat 2 positive Ladungen in der C-terminalen Region, über welche die Bindung an die innere Membran von *E. coli* für die Insertion erfolgt (Gallusser und Kuhn 1990, Kiefer et al. 1997, Chen et al. 2002). Die Kopfgruppen der DOPG-Lipide in den PE/PG-Proteoliposomen ergeben eine ähnliche Ladungsverteilung wie sie in der inneren Bakterienmembran auftritt, wodurch Pf3 coat elektrostatisch an die Membranoberfläche bindet. Die Ladung der PE/PG-Liposomen, hervorgerufen durch die DOPG Kopfgruppe, erfordert somit die Anwesenheit höherer Salzkonzentrationen für eine Substratbindung, da durch das Salz diese ungewollten elektrostatischen Interaktionen unterdrückt werden. Allerdings konnte bei Fluoreszenz-Titrationsmessungen mit solubilisiertem YidC eine hydrophobe Interaktion zwischen Pf3 coat und YidC bei der Substratbindung gezeigt werden (Gerken et al. 2008). Vielleicht spielen die elektrostatischen Wechselwirkungen nur eine Rolle bei der Anlagerung an die Proteoliposomen und die Substratbindung beruht hingegen gänzlich auf hydrophoben Wechselwirkungen. Je nachdem welche der Wechselwirkungen zwischen YidC und Pf3 coat bei der Substratbindung überwiegt, könnte dies den Effekt der höheren Dissoziationskonstante für das Membransystem PE/PG erklären. Eventuell beeinflusst die andere Zusammensetzung der Membran auch die Affinität des Pf3 coat zur Substratbindestelle von YidC. Für das Membransystem PE/PG wurden nur etwa 40% der YidC Moleküle in der funktionalen ‚P1-Loop-in‘ Topologie detektiert (Abschnitt 3.3.1 und Stiegler 2004, Diplomarbeit). Die Substratbindestelle am YidC befindet sich wahrscheinlich auf der cytoplasmatischen Seite und die ‚P1-Loop-out‘ Topologie verhindert damit eine spezifische Bindung des Pf3W0 coat an YidC. Da jedoch mit diesen Fluoreszenz-Titrationsmessungen nur intramolekulare Quenching Ereignisse des YidC Proteins aufgrund einer Konformationsänderung nach Substratbindung gemessen werden, spielt die nicht-funktionale ‚P1-Loop-out‘ Topologie keine Rolle. Da in diesem Fall das Substrat nicht an die Substratbindestelle von YidC binden kann, erfolgt auch keine Konformationsänderung und somit kann kein  $K_D$ -Wert bestimmt werden. Daher erklärt auch die vorwiegend nicht-funktionale ‚P1-Loop-out‘ Topologie nicht die um den Faktor zwei schwächere Bindung.

Daß der höhere  $K_D$ -Wert nicht an fehlerhaft gefaltetem YidC Protein liegt, konnte mit CD Messungen gezeigt werden (Winterfeld et al. 2009). In PE/PG rekonstituiertes

YidC weist die gleichen Verhältnisse an Sekundärstrukturanteilen auf wie in DOPC rekonstituiertes sowie in DDM solubilisiertes YidC.

Als Kontrolle dienten Messungen mit einer Alanin-Mutante von Pf3 coat, Pf3-19A coat (Abschnitt 3.5.1). Bei dieser Mutante wurde der hydrophobe membranständige Bereich gegen 19 Alanine ausgetauscht, was zu einer nicht-inserierbaren Pf3 coat Mutante führte (Xie et al. 2007). Nach Titration von YidC WT:DOPC-Proteoliposomen mit Pf3-19A coat wurde eine Bindungskurve in Form einer Geraden erhalten. Dies deutet auf eine unspezifische Bindung des Pf3-19A coat an YidC hin. Bei Durchführung derselben Messungen mit YidC WT:PE/PG-Proteoliposomen konnte auch in Anwesenheit von 300 mM NaCl keine Bindungskurve erhalten werden.

### YidC Einzel-Cystein Mutanten rekonstituiert in DOPC-Liposomen

Für die spätere Charakterisierung der Substratbindung von YidC über Einzelmolekülmessungen, wurde zunächst die Substratbindung einiger verwendeter Einzel-Cystein Mutanten von YidC untersucht. Durch Fluoreszenz-Titrationsmessungen mit der Trp-freien Pf3 coat Mutante Pf3W0, wurde die Dissoziationskonstante  $K_D$  bestimmt. Da bereits mit dem YidC WT gezeigt wurde, dass YidC in DOPC-Proteoliposomen vorrangig die funktionale ‚P1-Loop-in‘ Topologie aufwies, lagen die für die Titrationsmessungen verwendeten Mutanten nur in DOPC-Liposomen vor. Für die rekonstituierten YidC Mutanten YidC-23C und YidC-478C konnten jeweils Dissoziationskonstanten von  $K_D \approx 1 \mu\text{M}$  ermittelt werden (Abschnitt 3.5.2). Somit zeigte sich, dass die verwendeten Einzel-Cystein Mutanten im Vergleich zum YidC WT ein ähnliches Substratbindungsverhalten aufwiesen und damit eine dem YidC WT entsprechende Funktionalität zugrunde lag. Auch anhand der Position der Fluoreszenzmaxima und der Spektrenbreiten konnte gezeigt werden, dass die in DOPC rekonstituierten YidC Mutanten die gleiche Konformation wie der YidC WT aufwiesen.

Die Kenntnis des  $K_D$ -Wertes für den initialen Bindungsschritt erlaubt es, eine Abschätzung für die Bestimmung der Geschwindigkeitsrate des Insertionsereignisses zu geben. Die Dissoziationskonstante  $K_D$  setzt sich aus den Assoziations- und Dissoziationsraten zusammen. Daher kann der gesamte Prozeß folgendermaßen beschrieben werden (aus Winterfeld et al. 2009):



wobei  $k_1$  die Assoziations- und  $k_{-1}$  die Dissoziationsrate darstellt und  $k_2$  die Insertionsrate repräsentiert. Der in diesem Schema beschriebene Assoziationsprozess  $k_1$  wird als diffusionskontrolliert und der Insertionsprozess  $k_2$  als irreversibel angenommen. Die Größenordnung der Assoziationsrate  $k_1$  kann mit der

Smolukowski-Gleichung für bimolekulare Kollisionen (Gleichung 4-1) geschätzt werden.

$$k_1 = 4\pi \cdot N_A \cdot (R_{Pf3} + R_{PL})(D_{Pf3} + D_{PL}) \quad \text{Gleichung 4-1}$$

Dabei ist  $N_A$  die Avogadrozahl,  $R_{Pf3}$  und  $R_{PL}$  sind die angenommenen molekularen Kollisionsradien von Pf3 coat und den Proteoliposomen (der Radius zwischen beiden Molekülen während der Interaktion) und  $D_{Pf3}$  und  $D_{PL}$  sind die Diffusionskoeffizienten von Pf3 coat und den Proteoliposomen. Als Summe der molekularen Kollisionsradien wurde eine Größenordnung von 1 nm angenommen (Lakowicz 2006) und die Summe der ermittelten Diffusionskoeffizienten betrug  $1 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  (Abschnitt 3.7.1). Es wurde eine Assoziationsrate von  $k_1 = 7,57 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  abgeschätzt. Mit der Gleichung  $1 \mu\text{M} \approx K_D = k_{-1}/k_1$  wurde eine Größenordnung der Dissoziationsrate  $k_{-1}$  des YidC: Pf3 Komplexes von  $k_{-1} = 10^2 \text{ s}^{-1}$  erhalten. Dieser hohe Wert von  $k_{-1}$  lässt vermuten, dass die Insertionsrate *in vivo* eine Größenordnung höher ist, z.B.  $k_2 \approx 10^3 \text{ s}^{-1}$ . Dieser Wert ist vergleichbar mit den Umsatzraten der Enzyme Fumarase und  $\beta$ -Lactamase (Fersht 1985).

## 4.2 Das Diffusionsverhalten von Pf3 coat gibt Aufschluss über dessen Form

Mit Hilfe von Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) Messungen war es möglich, die Diffusionszeit von Pf3 coat in verschiedenen Konformationen (frei in Lösung bzw. inseriert in Proteoliposomen) zu messen. Ausgehend von der gemessenen Diffusionszeit des in wässriger Lösung vorliegenden Pf3-16C:Atto520, konnte der Diffusionskoeffizient  $D$  berechnet werden (Abschnitt 3.7.1). Mit Kenntnis von  $D$  kann nun der hydrodynamische Radius  $R_H$  (auch Stokes Radius genannt) des Proteins nach der Einstein'schen Gleichung 4-2 berechnet werden.

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad \text{Gleichung 4-2}$$

Dabei sind  $k_B$  die Boltzmannkonstante,  $T$  die absolute Temperatur in Kelvin (293,15 K) und  $\eta$  die dynamische Viskosität des Mediums. Für den verwendeten wässrigen Puffer wurde der Wert für Wasser bei 20°C verwendet ( $\eta = 1 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ ). Unter den beschriebenen Versuchsbedingungen wurde für Pf3-16C coat ein hydrodynamischer Radius von  $R_H = 2,0 \text{ nm}$  errechnet. Dieser Wert deckt sich mit dem von Zagrovic et al. ermittelten Wert für eine 44 Aminosäure umfassende  $\alpha$ -Helix von  $R_H = 2,2 \text{ nm}$  (Zagrovic et al. 2005).

Um die Form von Pf3 coat in wässriger Umgebung bestimmen zu können, wurde neben dem experimentell bestimmten auch der theoretisch bestimmte Diffusionskoeffizienten benötigt. Dafür wurde zunächst der theoretische

hydrodynamische Radius von wildtypischem Pf3 coat Protein berechnet, wobei einige Annahmen zu berücksichtigen sind. Für die Berechnung des Radius eines 44 Aminosäuren umfassenden Proteins wird zunächst von einer globulären Form des Proteins ausgegangen. Da jedes Protein eine Hydrathülle besitzt, muss diese bei der Berechnung von  $R_H$  berücksichtigt werden. Die Ausdehnung einer Wasserhülle wurde experimentell mit ca. 2,5 – 3 Å ermittelt (Chen et al. 2008). Ausgehend von der Annahme, dass Pf3 coat nur von einer einzigen Hydrathülle umgeben ist, wird zu dem Radius ein Wert von 2,8 Å addiert. Der Radius eines hydratisierten Pf3 coat Moleküls wurde zu  $R_H = 13,8$  Å berechnet. Der theoretische Diffusionskoeffizient bei 20°C konnte anschließend mittels der Einstein'schen Gleichung berechnet werden,

$$D_{\text{theo}} = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H}$$

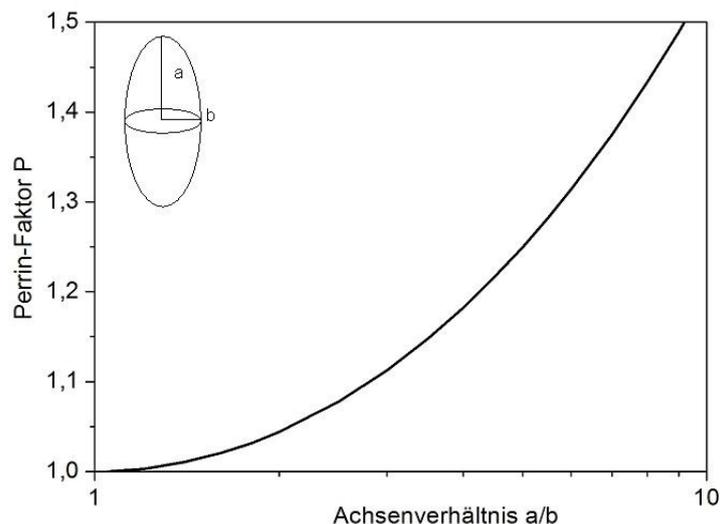
und es wurde ein Wert von  $D_{\text{theo}} = 1,55 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  für ein globuläres Protein mit 44 Aminosäuren erhalten. Der experimentell bestimmte Diffusionskoeffizient liegt hingegen bei  $D_{\text{exp}} = 1,2 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ . Demnach beobachtet man mit dem theoretisch berechneten Diffusionskoeffizienten eine schnellere Diffusion als mit den experimentellen Daten tatsächlich erhalten wurde.

Aus dem Verhältnis des theoretisch und experimentell bestimmten D-Wertes, dem sogenannten Perrin-Faktor P, kann die Form bzw. die Abweichung von der Kugelgestalt berechnet werden (Gleichung 4-3). Mit dem theoretisch berechneten  $D_{\text{theo}} = 1,55 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  und dem experimentell bestimmten  $D_{\text{exp}} = 1,2 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  ergibt sich für den Perrin-Faktor:

$$P = \frac{D_{\text{theo}}}{D_{\text{exp}}} \quad \text{Gleichung 4-3}$$

ein Wert von  $P = 1,29$ .

Unter der Annahme, dass es sich bei Pf3 coat um ein prolates Ellipsoid handelt, ergibt sich eine Abhängigkeit des Perrin-Faktors vom Achsenverhältnis  $a/b$  wie in Abbildung 4.2-1 gezeigt (Elias 2008). Für das hier betrachtete Pf3 coat Molekül ergibt sich somit ein Achsenverhältnis von  $\approx 6:1$ . Damit kann eine Stäbchenform des Pf3 coat angenommen werden, so wie sie bereits von Thiaudière gezeigt wurde (Thiaudière et al. 1993). Diese lang gestreckte Form erfährt bei der Rotation in Lösung einen größeren Widerstand als ein kugelförmiges Protein, was die abweichenden Diffusionskoeffizienten erklärt.



**Abbildung 4.2-1: Darstellung des Perrin-Faktors  $P$  zur Bestimmung des Achsenverhältnisses eines prolates Ellipsoids.**

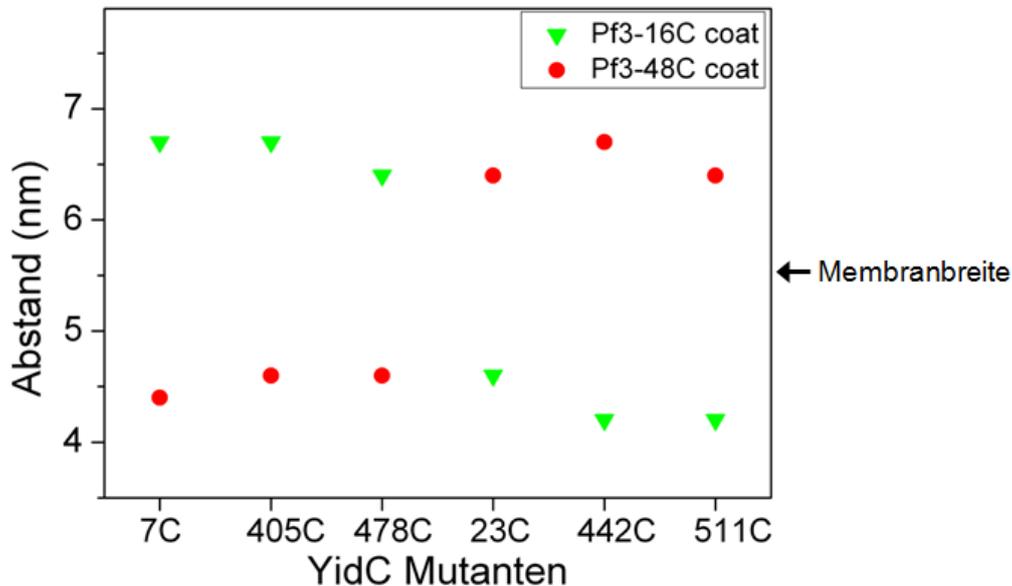
Damit kann auch das veränderte Laufverhalten des Pf3 coat bei der Größenausschlusschromatografie erklärt werden (siehe Abschnitt 3.2.2). Durch seine lang gestreckte Form und die aus der Rotation resultierenden voluminösen Ausdehnung während der Gelchromatografie erklärt, warum das Pf3 coat so zeitig von der Säule eluiert.

### 4.3 Zeitaufgelöste Insertion von Pf3 coat in YidC-Proteoliposomen durch Einzelmolekülmessungen

Durch Einzelmolekülmessungen konnte der initiale Bindungsprozess auch auf Einzelmolekülebene näher untersucht werden (Ernst et al. 2011). Da jedoch nur mit einem Fluoreszenzfarbstoff gearbeitet wurde, konnten keine Erkenntnisse über den gesamten Insertionsprozess von Pf3 coat in YidC-Proteoliposomen gewonnen werden. Zur näheren Charakterisierung des Insertionsprozesses wurde daher in dieser Arbeit mit fluoreszenzmarkierten YidC und Pf3 coat Proteinen gearbeitet. Die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, welche ein FRET-Paar bilden, ermöglichte es, den Prozess der Insertion mittels FRET zeitaufgelöst zu verfolgen. Die Methode des FRET eignet sich dafür besonders, da es als molekulares Lineal zur Bestimmung von Abständen verwendet werden kann (Stryer und Haugland 1967).

Die Einzel-Cystein Mutanten von Pf3 coat wurden mit dem Donor Farbstoff Atto520 und die YidC Mutanten mit dem Akzeptor Farbstoff Atto647N markiert. Diese beiden Farbstoffe bilden zusammen ein FRET-Paar mit einem Förster-Radius von 5,3 nm (Atto-Tec). Nach Auswertung von jeweils 10 FRET-Messungen konnten statistisch relevante Verteilungen von Ereignissen mit FRET-Effizienzen erstellt werden.

In Abbildung 4.3-1 sind die aus den Maxima der Verteilungen (Abschnitt 3.7.2, Abbildung 3.7-3 und Abbildung 3.7-4) ermittelten Abstände der verschiedenen YidC- und Pf3 coat Mutanten dargestellt.



**Abbildung 4.3-1: Ermittelte Abstände zwischen den markierten YidC Mutanten und Pf3-16C coat (grün) bzw. Pf3-48C coat (rot) aus den Maxima der  $E_{\text{FRET}}$ -Verteilungen (Abschnitt 3.7.2).**

Waren die Fluorophore beider Proteine zur gleichen Seite der Lipiddoppelschicht orientiert (periplasmatisch markierte YidC Mutanten 23C, 442C, 511C mit Pf3-16C coat sowie cytoplasmatisch markierte YidC Mutanten 7C, 405C, 478C mit Pf3-48C coat) wurden Abstände um die 4,5 nm bestimmt. Bei entgegengesetzter Orientierung der Fluorophore zueinander (periplasmatisch markierte YidC Mutanten 23C, 442C, 511C mit Pf3-48C coat sowie cytoplasmatisch markierte YidC Mutanten 7C, 405C, 478C mit Pf3-16C coat) wurden hingegen Abstände um die 6,5 nm erhalten. Damit waren die Fluorophore bei entgegengesetzter Orientierung deutlich über die DOPC-Doppelschicht getrennt, welche eine Dicke von 5 – 5,5 nm aufweist, was durch NMR-Studien bestimmt wurde (Darkes und Bradshaw 2000). Bei gleicher Orientierung der Fluorophore lag der Abstand dagegen deutlich unter eben genannter Breite der DOPC-Doppelschicht. Damit konnte gezeigt werden, dass sich Pf3 coat bei der Insertion in YidC-Proteoliposomen bis auf wenige Nanometer dem YidC nähert.

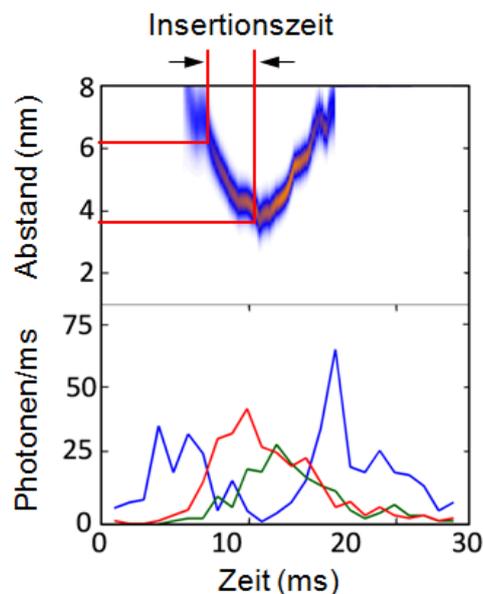
Bei Betrachtung der mittleren Abstände aus den  $E_{\text{FRET}}$ -Verteilungen konnte jedoch keine besondere Präferenz des Substrates zu einer der YidC Mutanten beobachtet werden. Zwar wurden für die periplasmatisch markierten Mutanten YidC-442C und YidC-511C die niedrigsten Abstände zwischen den Fluorophoren von Pf3 coat und YidC beobachtet, dennoch ist der Unterschied zu den übrigen YidC Mutanten nicht signifikant. Klenner et al. zeigten durch Crosslink-Studien eine bevorzugte Interaktion von Pf3 coat mit der dritten Transmembrandomäne des YidC (Klenner et al. 2008).

Dabei wurde eine mögliche Substratbindungstasche zwischen Transmembrandomäne 1 und 3 postuliert. Am ehesten hätte man daher für die Mutanten YidC-7C, YidC-23C, YidC-405C sowie YidC-442C, welche beide genannten Transmembranbereiche flankieren, eine deutlich geringere Distanz der Fluorophore bei der Insertion von Pf3 coat erwartet.

Zwar konnten für einzelne FRET-Ereignisse Abstände von 3,5 - 4 nm beobachtet werden, doch wegen sterischer Behinderungen der verwendeten Fluorophore aufgrund deren molekularer Struktur, ist eine Abstandsbestimmung unter 3 nm nicht möglich. Mit Hilfe kleinerer Fluorophore, wie z.B. DBO (2,3-diazabicyclo[2.2.2]oct-2-ene) mit einem Försterradius von 1 nm wäre eine Abstandsbestimmung unter 3 nm möglich (Sahoo et al. 2006). Allerdings wäre es auch möglich, dass sich beide Proteine ebenfalls aus sterischen Gründen nicht auf unter 3 nm annähern können. Daher konnte keine klare Aussage über die bevorzugte Beteiligung einzelner Transmembranbereiche von YidC bei der Insertion von Pf3 coat getroffen werden.

Als Kontrolle kam eine Pf3 coat Mutante zum Einsatz, welche aufgrund der Substitution des hydrophoben Membransegmentes gegen 19 Alanine (Pf3-19A16C coat) nicht mehr in der Lage ist spezifisch an YidC zu binden und zu inserieren (Xie et al. 2007). Mit Hilfe von Fluoreszenz-Titrationsmessungen wurde bereits gezeigt, daß diese Mutante nur unspezifisch an YidC bindet (Abschnitt 3.5.1). Bei allen sechs YidC Mutanten wurden ausschließlich FRET-Verteilungen im Bereich niedriger FRET-Effizienzen und daraus resultierenden großen Abständen der Fluorophore erhalten (Abschnitt 3.7.2). Dabei spielte es keine Rolle, wo sich das Fluorophor am YidC Protein befand. Aus den Maxima der Verteilungen wurde der Abstand zwischen den Fluorophoren berechnet. Die unspezifische Bindung der Pf3-19A16C coat Mutante an YidC konnte damit bestätigt werden, da die ermittelten Abstände von 6,7 nm auch bei cytoplasmatisch markiertem YidC bestimmt wurden. Außerdem implizierten die großen Abstände die Unfähigkeit der Insertion dieser Mutante, da die Fluorophore stets einen Abstand aufwiesen, der eine Trennung über die Lipid-Doppelschicht entsprach. Dies bestätigte die Ergebnisse der Titration auch auf Einzelmolekülebene und verdeutlichte, dass diese Mutante keine spezifische Bindung an YidC zeigt und nicht inseriert werden kann.

Aus den untersuchten Einzelereignissen der Insertion (Abschnitt 3.7.3) konnte neben dem Abstand der Fluorophore auch die Dauer des Insertionsprozesses beobachtet werden (Abbildung 4.3-2). Die Abstandstrajektorie (oberes Bild) zeigt den Abstand der Fluorophore während der Translokation der fluoreszenzmarkierten N-terminalen Region von Pf3 coat über die Lipiddoppelschicht. Dabei wurde bei allen analysierten Bursts die zeitliche Abstandsänderung von 6 auf 3,5 nm bestimmt.



**Abbildung 4.3-2: Einzelmolekülspur von Atto647N markierten YidC-23C Proteoliposomen in Anwesenheit von Pf3-16C:Atto520.** Das untere Bild zeigt die zeitlich aufgelösten Signale vom Donor (blau), Akzeptor (rot) und FRET (grün) und im oberen Bild sind die aus der FRET-Effizienz kalkulierten Abstände der Fluorophore mit farblich kodierter Wahrscheinlichkeit (orange=hohe Wahrscheinlichkeit) dargestellt.

Nach einer kurzen Verweildauer bei kleinem Abstand entfernten sich beide Fluorophore wieder voneinander. Ob diese kurze Verweildauer bei geringem Abstand mit der Chaperonaktivität von YidC zu erklären wäre, ist fraglich (van Bloois et al. 2008). Zwar konnte für YidC in *E. coli* eine Funktion als Faltungshelfer am Beispiel der Lactose-Permease LacY gezeigt werden (Nagamori et al. 2004), da es sich bei Pf3 coat aber um ein kleines und fast vollständig  $\alpha$ -helikales Protein handelt, ist die Rolle von YidC als Faltungshelfer in diesem Fall eher unwahrscheinlich. Es wäre aber interessant zu untersuchen, ob bei der Insertion von LacY eine längere Verweildauer an YidC zu beobachten wäre. Dies könnte die Chaperonaktivität von YidC bestätigen und Einblicke in den Mechanismus gewähren. Die Zunahme des Abstandes nach erfolgter Insertion zeigt den Prozeß der lateralen Entlassung des nun membranständigen Pf3 coat in die Lipiddoppelschicht. Was genau der Auslöser für die laterale Entlassung und des damit verbundenen Interaktionsverlustes von Pf3 coat und YidC ist, kann in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Auch *in vivo* konnte dazu noch kein Mechanismus identifiziert werden. Eventuell ändert sich mit der transmembranen Topologie des Pf3 coat Proteins die Affinität zum YidC. Mittels NMR-Studien wurde gezeigt, dass die N-terminale Region beim membranständigen Pf3 coat zum Teil parallel zur Membran ausgerichtet ist (Aisenbrey et al. 2006), bevor die  $\alpha$ -Helix abknickt und die Membran durchspannt. Diese parallele Ausrichtung der N-terminalen Region könnte eine Verringerung der Affinität von Pf3

coat zur Insertase YidC erklären, da die Affinität zur Lipidschicht mit Ausrichtung des N-Terminus steigt.

Durch die Einzelmolekülmessungen konnte somit erstmals die Insertion von Pf3 coat in YidC-Proteoliposomen im Detail untersucht werden. Ergänzend zu den bisherigen Erkenntnissen aus den Ensemble- und Einzelmolekülmessungen, bei denen der initiale Bindungsschritt detailliert beschrieben wurde (Gerken et al. 2008, Ernst et al. 2011), konnte in dieser Arbeit die gesamte Insertion mit allen Teilschritten zeitaufgelöst dargestellt werden. Zum einen wurde so der bisher vermutete Ablauf der Insertion (Bindung, Insertion, laterale Entlassung) bestätigt und zum anderen konnten die Zeitverläufe der einzelnen Schritte verfolgt werden. Bisher vermutete man die Dauer des Insertionsprozesses im Bereich von Sekunden (Kiefer und Kuhn 1999). Durch die Einzelmolekülmessungen wurden hingegen Zeiträume von ca. 20 ms für den gesamten Insertionsprozess beobachtet. Außerdem wurden erstmals die Abstände beider Proteine während des Insertionsvorganges gezeigt. Mit einer Annäherung auf weniger als 4 nm konnte der intensive Kontakt zwischen Enzym und Substrat verdeutlicht werden. Aufgrund der sterischen Beschaffenheit der Fluorophore konnte allerdings kein absoluter Abstand zwischen den Proteinen bestimmt werden und somit auch nicht die von Klenner et al. für YidC postulierte Substratbindungstasche bestätigt werden (Klenner et al. 2008). Durch Verwendung kleinerer Fluorophore könnte möglicherweise eine Präferenz des Substrates für einen Transmembranbereich im YidC nachgewiesen werden.

#### 4.4 Temperaturabhängigkeit der Insertion

Die Insertion von Pf3 coat kann als dreistufiger Prozess beschrieben werden. Zunächst bindet das Protein lateral an die Membranoberfläche, anschließend inseriert der hydrophobe Membrananker sowie die hydrophile N-terminale Region in die Lipidschicht und schließlich kommt es zur Freisetzung der N-terminalen Region ins Periplasma. Der Transport der hydrophilen N-terminalen Region über die Membran erfordert viel Energie. Die Insertase YidC vermittelt dabei enzymatisch die Insertion von Pf3 coat in die Membran. Diese enzymatische Aktivität wurde durch Messung der Insertionsrate bei verschiedenen Temperaturen belegt.

Die Temperaturabhängigkeit der Insertion von Pf3-16C coat in YidC-23C Proteoliposomen wurde bei vier verschiedenen Temperaturen untersucht (Abschnitt 3.7.4). Die Messungen zeigten eine Verdopplung der Insertionsraten bei einer Temperaturerhöhung von 15°C auf 20°C. Mit einer Insertionsrate von 530 s<sup>-1</sup> wurde eine Rate im Bereich des durch die Titrationsmessungen abgeschätzten Wertes von  $t_2 = 10^3 \text{ s}^{-1}$  für den irreversiblen Insertionsschritt ermittelt (Abschnitt 4.1). Dieser Anstieg könnte damit zu erklären sein, dass die Reaktionsgeschwindigkeit der Insertase YidC temperaturabhängig ist. Zwischen 20°C und 30°C änderten sich die

Insertionsraten dagegen kaum. Die höchste Rate wurde bei 25°C ermittelt, was auf ein Temperaturoptimum hindeutet. Ein solches Temperaturoptimum bei 25°C konnte auch experimentell bei der YidC vermittelten Insertion des M13 procoat in *E. coli* Liposomen beobachtet werden (Serek 2005, Dissertation).

Daß die Verdopplung der Insertionsrate, also der Interaktions- bzw. Insertionsdauer, tatsächlich die Temperaturabhängigkeit der Insertasefunktion von YidC darstellt, zeigten Interaktionsmessungen mit Atto647N markiertem YidC-405C Proteoliposomen und Pf3-48C:Atto520 coat, bei denen sich beide Fluorophore auf der Außenseite der Vesikel befanden. In diesem Fall zeigt die Annäherung der Fluorophore die initiale Bindung des Pf3 coat an YidC. Dieser Schritt sollte Temperatur-unabhängig sein, da er durch die Brown'sche Molekularbewegung getrieben wird. Zwischen 15°C und 20°C ist weder die Liquidität der Lipiddoppelschicht noch die Viskosität des wässrigen Puffers so verändert, dass dies Grund für eine verringerte Interaktionsdauer sein dürfte. Wie erwartet, trat keine Änderung der Interaktionsdauer zwischen YidC-405C und Pf3-48C coat auf. Mit 2 ms wurde bei allen vier gemessenen Temperaturen eine konstante Interaktionsdauer ermittelt, was die zuvor beschriebenen Annahmen bestätigte.

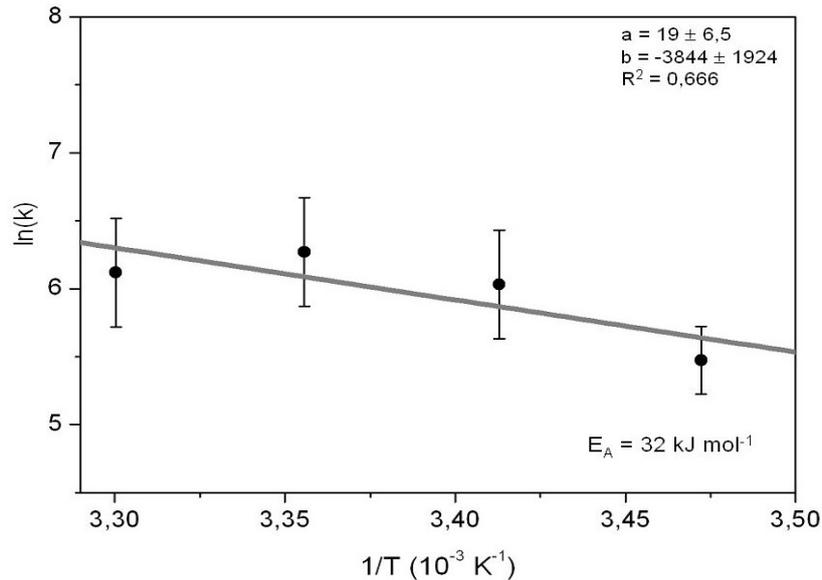
#### 4.4.1 Berechnung der Transferenergie für die Insertion von Pf3 coat

Wie bereits erwähnt vermittelt YidC enzymatisch die Insertion von Pf3 coat in die Membran. Ein Enzym wirkt als Katalysator indem es die Energiebarriere senkt. In diesem Fall sollte YidC demnach die Transferenergie für den Transport der hydrophilen N-terminalen Region von Pf3 coat über die Membran senken.

Aus den ermittelten Insertionsraten (Abbildung 3.7-8, C) konnte mittels des Arrhenius-Plot die Aktivierungsenergie (= Transferenergie) für die Insertion des Pf3 coat in die YidC-Proteoliposomen berechnet werden. Der Arrhenius-Plot wird genutzt, um den Effekt der Temperatur auf die Raten chemischer Reaktionen zu analysieren. Damit kann u. a. die Aktivierungsenergie einer enzymatisch katalysierten Reaktion bestimmt werden. Der Arrhenius-Plot ist eine grafische Darstellung des natürlichen Logarithmus der gemessenen Reaktionsraten, aufgetragen gegen die reziproke Temperatur in Kelvin und wird anschließend mit Gleichung 4-4 angepasst (Abbildung 4.4-1). Somit wird die Funktion linearisiert und der Arrhenius-Plot für einzelne Moleküle kann beschrieben werden als:

$$\ln(k) = -\frac{E_A}{k_B} \cdot \frac{1}{T} + const. \quad \text{Gleichung 4-4}$$

wobei  $k$  die Insertionsrate,  $E_A$  die Aktivierungsenergie,  $k_B$  die Boltzmann-Konstante und  $T$  die absolute Temperatur in Kelvin ist.



**Abbildung 4.4-1: Arrhenius-Plot zur Ermittlung der Aktivierungsenergie des Insertionsprozesses mit Anpassung nach Gleichung 4-4. Aus dem Anstieg der Geraden wurde die Aktivierungsenergie ( $E_A$ ) des Insertionsprozesses berechnet.**

In dem hier betrachteten Fall ist die Aktivierungsenergie als die Energie definiert, welche aufgebracht werden muss, damit die hydrophile N-terminale Region des Pf3 coat die hydrophobe DOPC-Doppelschicht überqueren kann und wird daher nachfolgend als Transferenergie bezeichnet. Gleichung 4-4 entspricht einer Geradengleichung der Form  $y = a + b \cdot x$  mit dem Anstieg

$$b = -\frac{E_A}{k_B}$$

Der Funktionswert  $y = \ln(k)$  ist per Definition dimensionslos. Der Anstieg hat somit die Dimension Kelvin. Zur Berechnung der Transferenergie  $E_A$  für ein Molekül wurde die Steigung zunächst mit der Boltzmann-Konstante multipliziert.

$$\frac{E_A}{k_B} \cdot k_B = 3843,91 \text{ K} \cdot 1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} = 5,31 \cdot 10^{-20} \text{ J/Molekül}$$

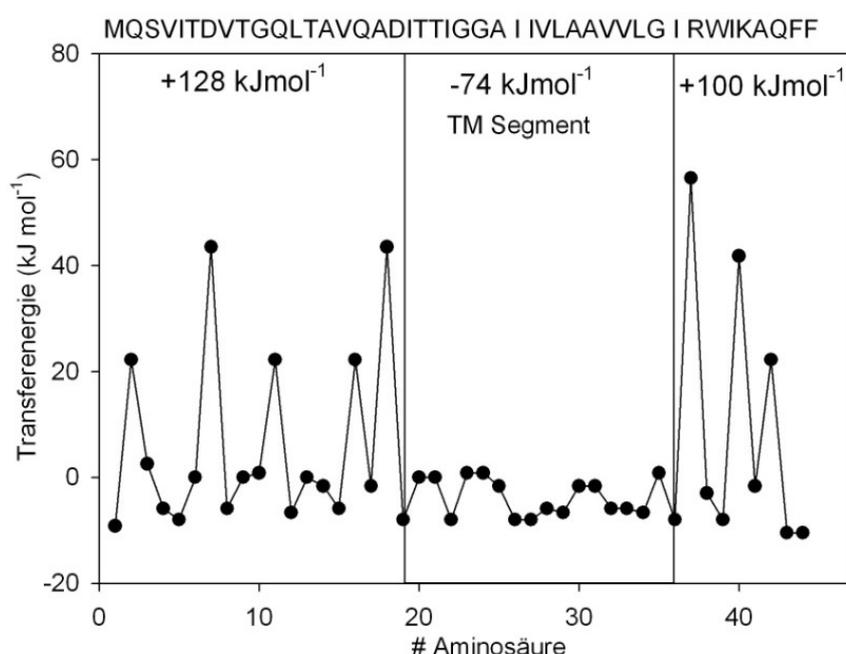
Um die Transferenergie pro mol zu berechnen, wurde mit der Avogadrozahl multipliziert.

$$E_A \cdot N_A = 5,31 \cdot 10^{-20} \text{ J} \cdot 6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1} = 31977 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Somit konnte für die Insertion von Pf3-16C coat in YidC-23C Proteliposomen eine Transferenergie von  $32 \pm 16 \text{ kJ mol}^{-1}$  berechnet werden.

Um den so ermittelten Wert der Transferenergie einordnen zu können, wurde die Transferenergie der N-terminalen Region, des Transmembranbereiches wie auch der C-terminalen Region von Pf3 coat WT mittels der GES-Skala (Engelman et al. 1986)

ermittelt. In der GES-Skala wird jeder proteinogenen Aminosäure eine bestimmte Transferenergie zugewiesen, welche benötigt wird um von einer hydrophilen in eine hydrophobe Phase zu wechseln. Da neben den Seitenketten der Aminosäuren auch das Peptidrückgrat in die hydrophobe Phase wechselt, wurden die Werte der GES-Skala mit dem von Ben-Tal et al. bestimmten Mittelwert von  $5 \text{ kJ mol}^{-1}$  addiert (Ben-Tal et al. 1996, White und Wimley 1999). Zudem benötigt der geladene N-Terminus des Pf3 coat zusätzlich Energie um in die Lipiddoppelschicht wechseln zu können. Die dafür benötigte Energie wurde mit  $18 \text{ kJ mol}^{-1}$  berechnet (Kiefer und Kuhn 1999). Die so korrigierten Transferenergien der einzelnen Aminosäuren des Pf3 coat WT sind in Abbildung 4.4-2 dargestellt.



**Abbildung 4.4-2: GES-Skala des Pf3 coat WT mit den Transferenergien der jeweiligen Aminosäurereste beim Übergang von einer hydrophilen in eine hydrophobe Phase.**

Die N-terminale Region (AS 1-18) weist durch eine Transferenergie von  $+128 \text{ kJ mol}^{-1}$  einen hydrophilen Charakter auf, wohingegen der Transmembranbereich (AS 19-36) mit  $-74 \text{ kJ mol}^{-1}$  einen stark hydrophoben Charakter zeigt. Die C-terminale Region von Pf3 coat (AS 37-44) ist wie die N-terminale Region mit  $+100 \text{ kJ mol}^{-1}$  hydrophil. Aus der GES-Skala geht damit hervor, dass die N-terminale Region von Pf3 coat zusätzliche Energie benötigt, um die Lipiddoppelschicht passieren zu können. Obwohl der Transmembranbereich mit einer Transferenergie von  $-74 \text{ kJ mol}^{-1}$  autonom über hydrophobe Interaktionen in die Membran inseriert, reicht dies nicht aus um die N-terminale Region über die Lipiddoppelschicht zu transportieren. Für den Transport der hydrophilen N-terminalen Region über die Membran muss somit eine zusätzliche Transferenergie von ca.  $+54 \text{ kJ mol}^{-1}$  aufgebracht werden (Kiefer und Kuhn 1999). Für die YidC vermittelte Insertion von Pf3 coat in YidC-

Proteoliposomen wurde hingegen eine Transferenergie von  $+32 \pm 16 \text{ kJ mol}^{-1}$  experimentell ermittelt (Abbildung 4.4-1). Da die Insertion von Pf3 coat in Liposomen nur in Anwesenheit von YidC erfolgt (Serek 2004) kann mit der verringerten Transferenergie die katalytische Wirkung der Insertase YidC vermutet werden. Die durch YidC um ca.  $20 \text{ kJ mol}^{-1}$  gesenkte Transferenergie erlaubt der hydrophilen N-terminalen Region die Lipiddoppelschicht passieren zu können. Kiefer und Kuhn (1999) zeigten mit einer Mutante von Pf3 coat, welche über drei zusätzliche Leucine im hydrophoben Membranbereich verfügt, dass diese unabhängig von YidC in die Membran inseriert. Die ermittelte Transferenergie des hydrophoben Transmembranbereiches verringerte sich durch die zusätzlichen Leucine um  $20 \text{ kJ mol}^{-1}$  von  $-74$  auf  $-94 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Auch in diesem Fall reichte die Verringerung der Transferenergie um ca.  $20 \text{ kJ mol}^{-1}$ , um den hydrophilen N-terminalen Bereich unabhängig von YidC über die Membran zu schleusen (Kiefer und Kuhn 1999).

Es konnte bereits zuvor durch Einzelmolekülexperimente gezeigt werden, dass die Verlängerung des hydrophoben Membranbereiches von Pf3 coat um zwei bis drei Aminosäuren hydrophoben Charakters die Fähigkeit der spontanen Insertion fördert. Durch Einfügen von 3 Leucinen (3L-Pf3) bzw. die Substitution von zwei Alaninen gegen 2 Phenylalanine (2F-Pf3) konnte die spontane Insertion sowohl *in vitro* wie auch *in vivo* beobachtet werden (Ernst et al. 2011). Die Verlängerung des Transmembranbereiches senkt demnach die Transferenergie soweit, dass der hydrophile N-terminale Bereich in Abwesenheit von YidC über die Lipiddoppelschicht transportiert werden kann.

Scheinbar verringert YidC die Transferenergie für den Pf3 coat WT gerade soweit, dass die Transferenergie des hydrophoben Bereiches genügt um die hydrophile N-terminale Region über die Lipiddoppelschicht zu transportieren. Auch wenn die Insertion der 3L- und 2F-Pf3 coat Mutanten in Abwesenheit von YidC erfolgte, so wurde *in vitro* für Pf3 coat in Anwesenheit von YidC eine Stimulierung der Insertion beobachtet (Ernst et al. 2011). Dies könnte auf die zusätzliche Verringerung der Transferenergie zurückzuführen sein. Auch wäre es möglich, dass die Anwesenheit von YidC die Ausbildung der transmembranen Konformation begünstigt und daher die erhöhte Insertionsrate beobachtet wurde. Damit konnte die katalytische Wirkung von YidC experimentell durch die Verringerung der Transferenergie angedeutet werden. Durch weitere Messungen mit anderen Substraten könnte die katalytische Wirkung von YidC geprüft und eine Allgemeingültigkeit der erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden. Auch wäre es interessant zu untersuchen, ob die Verringerung der Transferenergie proportional zur Länge und Ladung des hydrophilen terminalen Bereiches steigt bzw. welchen Einfluß die Länge und Ladung des hydrophoben Membranbereiches auf die Verringerung der YidC-induzierten Transferenergie hat.

## 5 Zusammenfassung

Die bakterielle Insertase YidC von *Escherichia coli* spielt eine essentielle Rolle bei der Insertion diverser Proteine, sowohl im Komplex mit der Sec-Translokase als auch als eigenständiges Protein (YidC-only). Das am besten untersuchte Substrat des YidC-only Weges ist das Haupthüllprotein des filamentösen Phagen Pf3, Pf3 coat. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Insertionsprozess von Pf3 coat in YidC-Proteoliposomen *in vitro* mit Hilfe von fluoreszenzspektroskopischen Methoden untersucht. Neben der Charakterisierung der Bindung von Pf3 coat an YidC durch Fluoreszenz-Titrationsmessungen, konnte mit Hilfe der Einzelmolekülspektroskopie der Mechanismus des Insertionsprozesses näher untersucht werden. Durch Verwendung von Einzel-Cystein Mutanten sowohl von YidC als auch Pf3 coat wurden spezifisch fluoreszenzmarkierte Proteine für diese Interaktionsstudie eingesetzt. Die Funktionalität der verwendeten Einzel-Cystein Mutanten von YidC konnte durch einen Komplementationstest gezeigt werden.

Sowohl die YidC- als auch die Pf3 coat Mutanten wurden erfolgreich gereinigt und fluoreszenzmarkiert. YidC wurde in Liposomen unterschiedlicher Zusammensetzung rekonstituiert und die Topologie biochemisch nachgewiesen. Das beste Ergebnis wurde dabei mit 100% DOPC-Liposomen erhalten. Mittels Fluoreszenz-Titrationsmessungen wurde zunächst die Bindung von Pf3 coat an YidC-Proteoliposomen durch Bestimmung der Dissoziationskonstante  $K_D$  charakterisiert. Für die Einzel-Cystein Mutanten von YidC wurden dem WT entsprechende  $K_D$ -Werte von ca. 1  $\mu$ M erhalten. Damit konnten frühere Messungen mit solubilisiertem YidC bestätigt werden.

Über die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie konnte die Insertion von Pf3 coat in YidC-Proteoliposomen nachgewiesen und mittels des Diffusionsverhaltens von freiem Pf3 coat die Form von Pf3 coat in wässriger Lösung berechnet werden. Pf3 coat liegt in Lösung als Monomer und in Form eines Stäbchens vor.

Einzelmolekül-FRET Messungen ermöglichten die detaillierte Aufklärung der einzelnen Schritte bei der Insertion von Pf3 coat in YidC-Proteoliposomen. Damit konnten die Abstände der Proteine während des Insertionsprozesses detailliert bestimmt und die Dauer dieses Prozesses analysiert werden. Auf diese Weise konnte erstmals die Abstandsänderung zwischen Enzym und Substrat während der Insertion auf Einzelmolekülebene zeitaufgelöst dargestellt werden.



## 6 Summary

The bacterial insertase YidC of *Escherichia coli* plays an essential role in insertion of various proteins either in concert with the Sec-translocase or on its own (YidC-only). The best characterized substrate of this YidC-only pathway is the major coat protein of the filamentous phage Pf3, Pf3 coat. In this work the insertion process of Pf3 coat into YidC proteoliposomes was analyzed with fluorescence spectroscopic methods *in vitro*. Besides the characterization of the binding of Pf3 coat to YidC by fluorescence titration experiments the mechanism of the insertion process was determined in detail by single-molecule spectroscopy. By using single-cysteine mutants of YidC and Pf3 coat, respectively, specific fluorescently labeled proteins were used for the interaction study. The functionality of the single-cysteine mutants of YidC could be shown by a complementation assay.

The YidC mutants as well as the Pf3 coat mutants were purified and fluorescently labelled. YidC was reconstituted into liposomes of different compositions and the topology was proven biochemically. The best result was received with 100% DOPC liposomes. Firstly, through fluorescence titration measurements the binding of Pf3 coat to YidC proteoliposomes was characterized by determination of the dissociation constant  $K_D$ . For the single-cysteine mutants of YidC a  $K_D$  value in the range of wildtype YidC of approximately 1  $\mu\text{M}$  was obtained. This way earlier measurements with solubilized YidC were confirmed.

By means of fluorescence correlation spectroscopy the insertion of Pf3 coat in YidC proteoliposomes was demonstrated. By diffusion behaviour of free Pf3 coat the shape of Pf3 coat in aqueous solutions was estimated. In solution Pf3 coat was monomeric and rod-shaped.

Single-molecule FRET measurements allowed the detailed observation of the single steps during the insertion process of Pf3 coat into YidC proteoliposomes. With this method the distance changes between enzyme and substrate during the insertion process was demonstrated for the first time in a time-resolved manner on the single-molecule level.



## 7 Literaturverzeichnis

**Aisenbrey** C, Harzer U, Bauer-Manz G, Bär G, Chotimah IN, Bertani P, Sizun C, Kuhn A, Bechinger B. Proton-decoupled <sup>15</sup>N and <sup>31</sup>P solid-state NMR investigations of the Pf3 coat protein in oriented phospholipid bilayers. *FEBS J.* **2006** Feb;273(4):817-28.

**Akiyama** Y, Kihara A, Ito K. Subunit a of proton ATPase F<sub>0</sub> sector is a substrate of the FtsH protease in Escherichia coli. *FEBS Lett.* **1996** Dec 9;399(1-2):26-8.

**Alami** M, Lüke I, Deitermann S, Eisner G, Koch HG, Brunner J, Müller M. Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in Escherichia coli. *Mol Cell.* **2003** Oct;12(4):937-46.

**Altamura** N, Capitanio N, Bonnefoy N, Papa S, Dujardin G. The Saccharomyces cerevisiae OXA1 gene is required for the correct assembly of cytochrome c oxidase and oligomycin-sensitive ATP synthase. *FEBS Lett.* **1996** Mar 11;382(1-2):111-5.

**Ames** BN. Assay of inorganic phosphates, total phosphate and phosphatase. *Methods Enzymol* **1966** (8), 115-118

**Andersson** H. und von Heijne G. Sec dependent and sec independent assembly of E. coli inner membrane proteins: the topological rules depend on chain length. *EMBO J.* **1993** Feb;12(2):683-91.

**Angelini** S., Deitermann S. und Koch HG. FtsY, the bacterial signal-recognition particle receptor, interacts functionally and physically with the SecYEG translocon. *EMBO Rep.* **2005** May;6(5):476-81.

**Bauer** M., Behrens M., Esser K., Michaelis G. und Pratje E. PET1402, a nuclear gene required for proteolytic processing of cytochrome oxidase subunit 2 in yeast. *Mol Gen Genet* **1994** Nov 1;245(3):272-8.

**Beck** K., Eisner G., Trescher D., Dalbey RE., Brunner J. und Müller M. YidC, an assembly site for polytopic Escherichia coli membrane proteins located in immediate proximity to the SecYE translocon and lipids. *EMBO Rep.* **2001** Aug;2(8):709-14.

**Bellafiore** S, Ferris P, Naver H, Göhre V, Rochaix JD. Loss of Albino3 leads to the specific depletion of the light-harvesting system. *Plant Cell.* **2002** Sep;14(9):2303-14

**Benz** M., Bals T., Gügel I.L., Piotrowski M., Kuhn A., Schünemann D., Soll J., Ankele E. Alb4 of Arabidopsis promotes assembly and stabilization of a non chlorophyll-binding photosynthetic complex, the CF<sub>1</sub>CF<sub>0</sub>-ATP synthase. *Mol Plant.* **2009** Nov;2(6):1410-24.

**Bessonneau** P, Besson V, Collinson I, Duong F. The Sec YEG preprotein translocation channel is a conformationally dynamic and dimeric structure. *EMBO J.* **2002** Mar 1;21(5):995-1003.

**Bogsch** E, Brink S, Robinson C. Pathway specificity for a delta pH-dependent precursor thylakoid lumen protein is governed by a 'Sec-avoidance' motif in the transfer peptide and a 'Sec-incompatible' mature protein. *EMBO J.* **1997** Jul 1;16(13):3851-9.

**Bolhuis** A, Mathers JE, Thomas JD, Barrett CM, Robinson C. TatB and TatC form a functional and structural unit of the twin-arginine translocase from Escherichia coli. *J Biol Chem.* **2001** Jun 8;276(23):20213-9.

- Bonnefoy** N, Chalvet F, Hamel P, Slonimski PP, Dujardin G. OXA1, a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene whose sequence is conserved from prokaryotes to eukaryotes controls cytochrome oxidase biogenesis. *J Mol Biol.* **1994** Jun 3;239(2):201-12.
- Bonnefoy** N, Fiumera HL, Dujardin G, Fox TD. Roles of Oxa1-related inner-membrane translocases in assembly of respiratory chain complexes. *Biochim Biophys Acta.* **2009** Jan;1793(1):60-70.
- Börsch** M. Single-molecule fluorescence resonance energy transfer techniques on rotary ATP synthases. *Biol Chem.* **2011** Jan;392(1-2):135-42. Review.
- Burstein** EA, Vedenkina NS, Ivkova MN. Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules. *Photochem Photobiol.* **1973** Oct;18(4):263-79.
- Cao** G, Cheng S, Whitley P, von Heijne G, Kuhn A, Dalbey RE. Synergistic insertion of two hydrophobic regions drives Sec-independent membrane protein assembly. *J Biol Chem.* **1994** Oct 28;269(43):26898-903.
- Casadaban** MJ, Cohen SN Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* **1980** 138:179-207
- Celebi** N., Yi L., Facey SJ., Kuhn A. und Dalbey RE. Membrane biogenesis of subunit II of cytochrome bo oxidase: contrasting requirements for insertion of N-terminal and C-terminal domains. *J Mol Biol.* **2006** Apr 14;357(5):1428-36.
- Chen** M, Samuelson JC, Jiang F, Muller M, Kuhn A, Dalbey RE. Direct interaction of YidC with the Sec-independent Pf3 coat protein during its membrane protein insertion. *J Biol Chem.* **2002** Mar 8;277(10):7670-5.
- Chen** M, Xie K, Nouwen N, Driessen AJ, Dalbey RE Conditional lethal mutants separate the M13 procoat and Pf3 coat functions of YidC: different YidC structural requirements for membrane protein insertion. *Biol Chem.* **2003** Jun 27;278(26):23295-300.
- Chen** M., Xie K., Yuan J., Yi L., Facey SJ., Pradel N., Wu LF., Kuhn A. und Dalbey RE. Involvement of SecDF and YidC in the membrane insertion of M13 procoat mutants. *Biochemistry* **2005** Aug 9;44(31):10741-9.
- Chen** X., Weber I. und Harrison RW Hydration water and bulk water in proteins have distinct properties in radial distributions calculated from 105 atomic resolution crystal structures. *J Phys Chem B.* **2008** Sept 25 112(38) 12073-12080
- Clegg** RM. Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids. *Methods Enzymol.* **1992**;211:353-88.
- Cristóbal** S, de Gier JW, Nielsen H, von Heijne G. Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **1999** Jun 1;18(11):2982-90.
- Dalbey** RE, Kuhn A. Evolutionarily related insertion pathways of bacterial, mitochondrial, and thylakoid membrane proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **2000**;16:51-87
- Dalbey** RE, Kuhn A. YidC family members are involved in the membrane insertion, lateral integration, folding, and assembly of membrane proteins. *J Cell Biol.* **2004** Sep 13;166(6):769-74.

- Dalbey** RE, Wang P, Kuhn A. Assembly of bacterial inner membrane proteins. *Annu Rev Biochem.* **2011** Jun 7;80:161-87.
- Daley** DO, Rapp M, Granseth E, Melén K, Drew D, von Heijne G. Global topology analysis of the Escherichia coli inner membrane proteome. *Science.* **2005** May 27;308(5726):1321-3.
- Darkes** MJ und Bradshaw JP Real-time swelling-series method improves the accuracy of lamellar neutron-diffraction data. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **2000** Jan;56(Pt 1):48-54.
- Darwin** A.J. The phage-shock-protein response. *Mol Microbiol.* **2005** Aug;57(3):621-8.
- Date** T, Goodman JM, Wickner WT. Procoat, the precursor of M13 coat protein, requires an electrochemical potential for membrane insertion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1980** Aug;77(8):4669-73.
- Datsenko** KA und Wanner BL One-step inactivation of chromosomal genes in E. coli K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000** Jun 6; 97 (12) 6640-5
- Day** LA, Marzec CJ, Reisberg SA, Casadevall A. DNA packing in filamentous bacteriophages. *Annu Rev Biophys Biophys Chem.* **1988**;17:509-39.
- De Boer** HA., Comstock LJ. Und Vasser M. The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1983** Jan;80(1):21-5.
- De Buck** E, Lammertyn E, Anné J. The importance of the twin-arginine translocation pathway for bacterial virulence. *Trends Microbiol.* **2008** Sep;16(9):442-53.
- de Gier** JW, Mansournia P, Valent QA, Phillips GJ, Luirink J, von Heijne G. Assembly of a cytoplasmic membrane protein in Escherichia coli is dependent on the signal recognition particle. *FEBS Lett.* **1996** Dec 16;399(3):307-9.
- de Gier** JW, Scotti PA, Sääf A, Valent QA, Kuhn A, Luirink J, von Heijne G. Differential use of the signal recognition particle translocase targeting pathway for inner membrane protein assembly in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1998** Dec 8;95(25):14646-51.
- Demchenko** AP. Fluorescence analysis of protein dynamics. *Essays Biochem.* **1986**;22:120-57.
- Deville** K, Gold VA, Robson A, Whitehouse S, Sessions RB, Baldwin SA, Radford SE, Collinson I. The oligomeric state and arrangement of the active bacterial translocon. *J Biol Chem.* **2011** Feb 11;286(6):4659-69.
- Driessen** AJ, Manting EH, van der Does C. The structural basis of protein targeting and translocation in bacteria. *Nat Struct Biol.* **2001** Jun;8(6):492-8.
- Driessen** AJ, Nouwen N. Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu Rev Biochem.* **2008**;77:643-67.
- Du Plessis** DJ., Nouwen N. und Driessen AJ. Subunit a of cytochrome o oxidase requires both YidC and SecYEG for membrane insertion. *J Biol Chem.* **2006** May 5;281(18):12248-52.
- Düser** MG, Zarrabi N, Cipriano DJ, Ernst S, Glick GD, Dunn SD, Börsch M. 36 degree Stepp size of proton-driven c-ring rotation in FoF1-ATP synthase. *EMBO J.* **2009** Sep 16;28(18):2689-96.

- Economou A**, Wickner W. SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. *Cell*. **1994** Sep 9;78(5):835-43.
- Eftink MR**. The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins. *Biophys J*. **1994** Feb;66(2 Pt 1):482-501.
- Eisenhawer M**, Cattarinussi S, Kuhn A, Vogel H. Fluorescence resonance energy transfer shows a close helix-helix distance in the transmembrane M13 procoat protein. *Biochemistry*. **2001** Oct 16;40(41):12321-8.
- Elias HG** *Macromolecules: Volume 3: Physical Structure and Properties*. Wiley-YCH Verlag (**2008**)
- Engelmann DM**, Steitz TA and Goldman A Identify nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins *Ann Rev Biophys Chem* **1986** 15 321-53
- Ernst S**, Schönbauer AK, Bär G, Börsch M, Kuhn A. YidC-driven membrane insertion of single fluorescent Pf3 coat proteins. *J Mol Biol*. **2011** Jul 23.
- Facey S.J.** und **Kuhn A**. The sensor protein KdpD inserts into the Escherichia coli membrane independent of the Sec translocase and YidC. *Eur J Biochem*. **2003** Apr;270(8):1724-34.
- Facey SJ**, Neugebauer SA, Krauss S, Kuhn A. The mechanosensitive channel protein MscL is targeted by the SRP to the novel YidC membrane insertion pathway of Escherichia coli. *J Mol Biol*. **2007** Jan 26;365(4):995-1004.
- Facey SJ**, Kuhn A. Biogenesis of bacterial inner-membrane proteins. *Cell Mol Life Sci*. **2010** Jul;67(14):2343-62.
- Fekkes P**, de Wit JG, van der Wolk JP, Kimsey HH, Kumamoto CA, Driessen AJ. Preprotein transfer to the Escherichia coli translocase requires the co-operative binding of SecB and the signal sequence to SecA. *Mol Microbiol*. **1998** Sep;29(5):1179-90.
- Fekkes P**, van der Does C, Driessen AJ. The molecular chaperone SecB is released from the carboxy-terminus of SecA during initiation of precursor protein translocation. *EMBO J*. **1997** Oct 15;16(20):6105-13.
- Fersht A**. *Enzyme structure and mechanism* **1985** W. H. Freeman und Co., New York
- Förster T**. Intermolecular energy migration and fluorescence test. *Ann. Phys.* **1948** (2), 55-75
- Förster T**. Transfer mechanisms of electronic excitation. *Discuss. Faraday Soc.* **1959** 27, 7.
- Funes S**, Nargang FE, Neupert W, Herrmann JM. The Oxa2 protein of Neurospora crassa plays a critical role in the biogenesis of cytochrome oxidase and defines a ubiquitous subbranch of the Oxa1/YidC/Alb3 protein family. *Mol Biol Cell*. **2004** Apr;15(4):1853-61.
- Funes S**, Hasona A, Bauerschmitt H, Grubbauer C, Kauff F, Collins R, Crowley PJ, Palmer SR, Brady LJ, Herrmann JM. Independent gene duplications of the YidC/Oxa/Alb3 family enabled a specialized cotranslational function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2009** Apr 21;106(16):6656-61.

- Gallusser** A. und **Kuhn** A. Initial Steps in protein membrane insertion. Bacteriophage M13 procoat protein binds to the membrane surface by electrostatic interaction. *EMBO J.* **1990** Sep;9(9):2723-9.
- Geller** B.L. und **Wickner** W. M13 procoat inserts into liposomes in the absence of other membrane proteins. *J Biol Chem.* **1985** Oct 25;260(24):13281-5.
- Gerdes** L, **Bals** T, **Klostermann** E, **Karl** M, **Philipp** K, **Hünken** M, **Soll** J, **Schünemann** D. A second thylakoid membrane-localized Alb3/Oxal/YidC homologue is involved in proper chloroplast biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem.* **2006** Jun 16;281(24):16632-42.
- Gerken** U, **Lupo** D, **Tietz** C, **Wrachtrup** J, **Ghosh** R. Circular symmetry of the light-harvesting 1 complex from *Rhodospirillum rubrum* is not perturbed by interaction with the reaction center. *Biochemistry.* **2003** Sep 9;42(35):10354-60.
- Gerken** U., **Erhardt** D., **Bär** G., **Ghosh** R. und **Kuhn** A. Initial binding process of the membrane insertase YidC with its substrate Pf3 coat protein is reversible. *Biochemistry* **2008** Jun 3;47(22):6052-8.
- Gohlke** U, **Pullan** L, **McDevitt** CA, **Porcelli** I, **de Leeuw** E, **Palmer** T, **Saibil** HR, **Berks** BC. The TatA component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2005** Jul 26;102(30):10482-6.
- Greenwood** J, **Hunter** GJ, **Perham** RN. Regulation of filamentous bacteriophage length by modification of electrostatic interactions between coat protein and DNA. *J Mol Biol.* **1991** Jan 20;217(2):223-7.
- Guzman** LM, **Belin** D, **Carson** MJ, **Beckwith** J. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol.* **1995** Jul;177(14):4121-30.
- Hartl** F.U., **Lecker** S., **Schiebel** E., **Hendrick** J.P. und **Wickner** W. The binding cascade of SecB to SecA to SecY/E mediates preprotein targeting to the *E. coli* plasma membrane. *Cell.* **1990** Oct 19;63(2):269-79.
- He** S, **Fox** TD. Membrane translocation of mitochondrially coded Cox2p: distinct requirements for export of N and C termini and dependence on the conserved protein Oxa1p. *Mol Biol Cell.* **1997** Aug;8(8):1449-60.
- Hell** K, **Herrmann** J, **Pratje** E, **Neupert** W, **Stuart** RA. Oxa1p mediates the export of the N- and C-termini of pCoxII from the mitochondrial matrix to the intermembrane space. *FEBS Lett.* **1997** Dec 1;418(3):367-70.
- Hell** K, **Neupert** W, **Stuart** RA. Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *EMBO J.* **2001** Mar 15;20(6):1281-8.
- Hermolin** J, **Fillingame** RH. Assembly of F0 sector of *Escherichia coli* H<sup>+</sup> ATP synthase. Interdependence of subunit insertion into the membrane. *J Biol Chem.* **1995** Feb 10;270(6):2815-7.
- Herskovits** AA, **Bibi** E. Association of *Escherichia coli* ribosomes with the inner membrane requires the signal recognition particle receptor but is independent of the signal recognition particle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2000** Apr 25;97(9):4621-6.

**Houben** EN, ten Hagen-Jongman CM, Brunner J, Oudega B, Luirink J. The two membrane segments of leader peptidase partition one by one into the lipid bilayer via a Sec/YidC interface. *EMBO Rep.* **2004** Oct;5(10):970-5.

**Imhof** N., Kuhn A. und Gerken U. Substrate-dependent conformational dynamics of the Escherichia coli membrane insertase YidC. *Biochemistry.* **2011** Apr 19;50(15):3229-39.

**Jia** L, Dienhart M, Schramp M, McCauley M, Hell K, Stuart RA. Yeast Oxa1 interacts with mitochondrial ribosomes: the importance of the C-terminal region of Oxa1. *EMBO J.* **2003** Dec 15;22(24):6438-47.

**Jiang** F, Yi L, Moore M, Chen M, Rohl T, Van Wijk KJ, De Gier JW, Henry R, Dalbey RE. 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.* **2002** May 31;277(22):19281-8.

**Jiang** F, Chen M, Yi L, de Gier JW, Kuhn A, Dalbey RE. Defining the regions of Escherichia coli YidC that contribute to activity. *J Biol Chem.* **2003** Dec 5;278(49):48965-72.

**Kankurnaz-Apa** B. Untersuchung der molekularen Interaktion zwischen der YidC-Membraninsertase und dem Pf3-Hüllprotein. **2004** Diplomarbeit

**Kaufmann** A, Manting EH, Veenendaal AK, Driessen AJ, van der Does C. Cysteine-directed cross-linking demonstrates that helix 3 of SecE is close to helix 2 of SecY and helix 3 of a neighboring SecE. *Biochemistry.* **1999** Jul 13;38(28):9115-25.

**Keenan** RJ, Freymann DM, Stroud RM, Walter P. The signal recognition particle. *Annu Rev Biochem.* **2001**;70:755-75.

**Kiefer** D., Hu X., Dalbey R. und Kuhn A. 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.* **1997** May 1;16(9):2197-204.

**Kiefer** D., Hu X., Dalbey R., Kuhn A. 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.* **1997** May 1;16(9):2197-204.

**Kiefer** D., Kuhn A. Hydrophobic forces drive spontaneous membrane insertion of the bacteriophage Pf3 coat protein without topological control. *EMBO J.* **1999** Nov 15;18(22) :6299-306.

**Kiefer** D, Kuhn A. YidC as an essential and multifunctional component in membrane protein assembly. *Int Rev Cytol.* **2007**;259:113-38.

**Kihara** A, Akiyama Y, Ito K. FtsH is required for proteolytic elimination of uncomplexed forms of SecY, an essential protein translocase subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1995** May 9;92(10):4532-6.

**Kihara** A, Akiyama Y, Ito K. Dislocation of membrane proteins in FtsH-mediated proteolysis. *EMBO J.* **1999** Jun 1;18(11):2970-81.

**Klenner** C, Yuan J, Dalbey RE, Kuhn A. The Pf3 coat protein contacts TM1 and TM3 of YidC during membrane biogenesis. *FEBS Lett.* **2008** Dec 10;582(29):3967-72.

**Koch** HG., Hengelage T., Neumann-Haefelin C., MacFarlane J., Hoffschulte HK., Schimz KL., Mechler B und Müller M. 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.* **1999** Jul;10(7):2163-73.

- Koch** HG, Moser M, Müller M. Signal recognition particle-dependent protein targeting, universal to all kingdoms of life. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* **2003**;146:55-94.
- Kohler** R., Boehringer D., Greber B., Bingel-Erlenmeyer R., Collinson I. Schaffitzel C. und Ban N. YidC and Oxa1 form dimeric insertion pores on the translating ribosome. *Mol Cell.* **2009** May 15;34(3):344-53.
- Kol** S, Majczak W, Heerlien R, van der Berg JP, Nouwen N, Driessen AJ. Subunit a of the F(1)F(0) ATP synthase requires YidC and SecYEG for membrane insertion. *J Mol Biol.* **2009** Jul 31;390(5):893-901.
- Kuhn** A, Kreil G, Wickner W. Both hydrophobic domains of M13 procoat are required to initiate membrane insertion. *EMBO J.* **1986** Dec 20;5(13):3681-5.
- Kuhn** A. Alteration in the extracellular domain of M13 procoat protein make its membrane insertion dependent on SecA and SecY. *Eur J Biochem.* **1988** Nov 1;177(2):267-71.
- Kuhn** A, Stuart R, Henry R, Dalbey RE. The Alb3/Oxa1/YidC protein family: membrane-localized chaperones facilitating membrane protein insertion? *Trends Cell Biol.* **2003** Oct;13(10):510-6. Review.
- Ladokhin** AS, Jayasinghe S, White SH. How to measure and analyze tryptophan fluorescence in membranes properly, and why bother? *Anal Biochem.* **2000** Oct 15;285(2):235-45.
- Laemmli** UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **1970** Aug 15;227(5259):680-5.
- Lakowicz** JR. Principles of fluorescence spectroscopy **2006** 3. Auflage Springer Verlag
- Lee**, N. Molecular Aspects of ara Regulation. In *The Operon*, J. H. Miller, W.S. Reznikoff (ed.) **1980** S. 389-410, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Lee**, N., Francklyn, C., and Hamilton, E. P. (1987). Arabinose-induced binding of AraC protein to aral2 activates the araBAD operon promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* **1987** Dec;84(24):8814-8.
- Lotz** M, Haase W, Kühlbrandt W, Collinson I. Projection structure of yidC: a conserved mediator of membrane protein assembly. *J Mol Biol.* **2008** Jan 25;375(4):901-7.
- Luirink** J, Samuelsson T, de Gier JW. YidC/Oxa1p/Alb3: evolutionarily conserved mediators of membrane protein assembly. *FEBS Lett.* **2001** Jul 13;501(1):1-5.
- Luirink** J, Sinning I. SRP-mediated protein targeting: structure and function revisited. *Biochim Biophys Acta.* **2004** Nov 11;1694(1-3):17-35.
- Maier** KS, Hubich S, Liebhart H, Krauss S, Kuhn A, Facey SJ. An amphiphilic region in the cytoplasmic domain of KdpD is recognized by the signal recognition particle and targeted to the Escherichia coli membrane. *Mol Microbiol.* **2008** Jun;68(6):1471-84.
- Manting** EH, van Der Does C, Remigy H, Engel A, Driessen AJ. SecYEG assembles into a tetramer to form the active protein translocation channel. *EMBO J.* **2000** Mar 1;19(5):852-61.

- Miroux B**, Walker JE 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* **1996**; 260 (3):289-98
- Moore M**, Harrison MS, Peterson EC, Henry R. Chloroplast Oxa1p homolog albino3 is required for post-translational integration of the light harvesting chlorophyll-binding protein into thylakoid membranes. *J Biol Chem*. **2000** Jan 21;275(3):1529-32.
- Moore M**, Goforth RL, Mori H, Henry R. Functional interaction of chloroplast SRP/FtsY with the ALB3 translocase in thylakoids: substrate not required. *J Cell Biol*. **2003** Sep 29;162(7):1245-54.
- Mori H**, Tsukazaki T, Masui R, Kuramitsu S, Yokoyama S, Johnson AE, Kimura Y, Akiyama Y, Ito K. Fluorescence resonance energy transfer analysis of protein translocase. SecYE from *Thermus thermophilus* HB8 forms a constitutive oligomer in membranes. *J Biol Chem*. **2003** Apr 18;278(16):14257-64.
- Nagamori S**, Smirnova IN, Kaback HR. Role of YidC in folding of polytopic membrane proteins. *J Cell Biol*. **2004** Apr;165(1):53-62.
- Nargang FE**, Preuss M, Neupert W, Herrmann JM. The Oxa1 protein forms a homooligomeric complex and is an essential part of the mitochondrial export translocase in *Neurospora crassa*. *J Biol Chem*. **2002** Apr 12;277(15):12846-53.
- Neumann-Haefelin C**, Schäfer U, Müller M, Koch HG. SRP-dependent co-translational targeting and SecA-dependent translocation analyzed as individual steps in the export of a bacterial protein. *EMBO J*. **2000** Dec 1;19(23):6419-26.
- Nouwen N** und Driessen AJ. SecDFyajC forms a heterotetrameric complex with YidC. *Mol Microbiol*. **2002** Jun;44(5):1397-405.
- Ochsner UA**, Snyder A, Vasil AI, Vasil ML. Effects of the twin-arginine translocase on secretion of virulence factors, stress response, and pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2002** Jun 11;99(12):8312-7.
- Oliver DC**, Paetzel M. Crystal structure of the major periplasmic domain of the bacterial membrane protein assembly facilitator YidC. *J Biol Chem*. **2008** Feb 22;283(8):5208-16.
- Osborne AR**, Rapoport TA. Protein translocation is mediated by oligomers of the SecY complex with one SecY copy forming the channel. *Cell*. **2007** Apr 6;129(1):97-110.
- Palmer T**, Sargent F, Berks BC. Export of complex cofactor-containing proteins by the bacterial Tat pathway. *Trends Microbiol*. **2005** Apr;13(4):175-80.
- Papanikou E**, Karamanou S, Economou A. Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. *Nat Rev Microbiol*. **2007** Nov;5(11):839-51.
- Perry A.J.**, Rimmer K.A., Mertens H.D., Waller R.F., Mulhern T.D., Lithgow T. und Gooley P.R. Structure, topology and function of the translocase of the outer membrane of mitochondria. *Plant Physiol Biochem* **2008** Mar;46(3):265-74.
- Pederson DM**, Welsh LC, Marvin DA, Sampson M, Perham RN, Yu M, Slater MR. The protein capsid of filamentous bacteriophage PH75 from *Thermus thermophilus*. *J Mol Biol*. **2001** Jun 1;309(2):401-21.
- Peterson GL**. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem*. **1977** Dec;83(2):346-56.

- Peterson** JH, Woolhead CA, Bernstein HD. Basic amino acids in a distinct subset of signal peptides promote interaction with the signal recognition particle. *J Biol Chem.* **2003** Nov 14;278(46):46155-62.
- Pogliano** JA, Beckwith J. SecD and SecF facilitate protein export in Escherichia coli. *EMBO J.* **1994** Feb 1;13(3):554-61.
- Popot** JL, Engelman DM. Membrane protein folding and oligomerization: the two-stage model. *Biochemistry.* **1990** May 1;29(17):4031-7.
- Pradel** N, Ye C, Livrelli V, Xu J, Joly B, Wu LF. Contribution of the twin arginine translocation system to the virulence of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7. *Infect Immun.* **2003** Sep;71(9):4908-16.
- Preuss** M, Ott M, Funes S, Luirink J, Herrmann JM. Evolution of mitochondrial oxa proteins from bacterial YidC. Inherited and acquired functions of a conserved protein insertion machinery. *J Biol Chem.* **2005** Apr 1;280(13):13004-11.
- Price** CE, und Driessen AJ. YidC is involved in the biogenesis of anaerobic respiratory complexes in the inner membrane of Escherichia coli. *J Biol Chem.* **2008** Oct 3;283(40):26921-7.
- Price** CE, Driessen AJ. Conserved negative charges in the transmembrane segments of subunit K of the NADH:ubiquinone oxidoreductase determine its dependence on YidC for membrane insertion. *J Biol Chem.* **2010** Feb 5;285(6):3575-81.
- Price** CE, Kocer A, Kol S, van der Berg JP, Driessen AJ. In vitro synthesis and oligomerization of the mechanosensitive channel of large conductance, MscL, into a functional ion channel. *FEBS Lett.* **2011** Jan 3;585(1):249-54.
- Pristinski** D, Kozlovskaya V, Sukhishvili SA. Fluorescence correlation spectroscopy studies of diffusion of a weak polyelectrolyte in aqueous solutions. *J Chem Phys.* **2005** Jan 1;122(1):14907.
- Randall** LL, Hardy SJ, Topping TB, Smith VF, Bruce JE, Smith RD. The interaction between the chaperone SecB and its ligands: evidence for multiple subsites for binding. *Protein Sci.* **1998** Nov;7(11):2384-90.
- Ravaud** S, Wild K, Sinning I. Purification, crystallization and preliminary structural characterization of the periplasmic domain P1 of the Escherichia coli membrane-protein insertase YidC. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* **2008** Feb 1;64(Pt 2):144-8.
- Ridder** A.N., van de Hoef W., Stam J., Kuhn A., de Kruijff B., Killian J.A. Importance of hydrophobic matching for spontaneous insertion of a single-spanning membrane protein. *Biochemistry.* **2002** Apr 16;41(15):4946-52.
- Rigaud** JL, Mosser G, Lacapere JJ, Olofsson A, Levy D und Ranck JL. Bio-Beads: an efficient strategy for two-dimensional crystallization of membrane proteins. *J Struct Biol.* **1997** Apr;118(3):226-35.
- Robinson** C. The twin-arginine translocation system: a novel means of transporting folded proteins in chloroplasts and bacteria. *Biol Chem.* **2000** Feb;381(2):89-93.
- Robinson** C, Bolhuis A. Tat-dependent protein targeting in prokaryotes and chloroplasts. *Biochim Biophys Acta.* **2004** Nov 11;1694(1-3):135-47.
- Ruiz** N, Silhavy TJ. Sensing external stress: watchdogs of the Escherichia coli cell envelope. *Curr Opin Microbiol.* **2005** Apr;8(2):122-6.

- Russel M.** Filamentous phage assembly. *Mol Microbiol.* **1991** Jul;5(7):1607-13.
- Sääf A, Monné M, de Gier JW, von Heijne G.** Membrane topology of the 60-kDa Oxa1p homologue from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **1998** Nov 13;273(46):30415-8.
- Sahoo H, Roccatano D, Zacherias M, Nau WM** Distance distributions of short polypeptides recovered by fluorescence resonance energy transfer in the 10 Å domain. *J Am Chem Soc.* **2006** Jun 28;128(25):8118-9
- Saier MH Jr.** Families of proteins forming transmembrane channels. *J Membr Biol.* **2000** Jun 1;175(3):165-80.
- Samuelson JC, Chen M, Jiang F, Möller I, Wiedmann M, Kuhn A, Phillips GJ, Dalbey RE.** YidC mediates membrane protein insertion in bacteria. *Nature.* **2000** Aug 10;406(6796):637-41.
- Samuelson JC, Jiang F, Yi L, Chen M, de Gier JW, Kuhn A, Dalbey RE.** Function of YidC for the insertion of M13 procoat protein in *Escherichia coli*: translocation of mutants that show differences in their membrane potential dependence and Sec requirement. *J Biol Chem.* **2001** Sep 14;276(37):34847-52.
- Sanger F., Nicklen S. und Coulson AR.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1977** Dec;74(12):5463-7.
- Sargent F.** The twin-arginine transport system: moving folded proteins across membranes. *Biochem Soc Trans.* **2007** Nov;35(Pt 5):835-47.
- Schägger H, von Jagow G** Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **1987** Nov 1 166(2) 368-79
- Schuler B, Eaton WA.** Protein folding studied by single-molecule FRET. *Curr Opin Struct Biol.* **2008** Feb;18(1):16-26.
- Scotti PA, Valent QA, Manting EH, Urbanus ML, Driessen AJ, Oudega B, Luirink J.** SecA is not required for signal recognition particle-mediated targeting and initial membrane insertion of a nascent inner membrane protein. *J Biol Chem.* **1999** Oct 15;274(42):29883-8.
- Scotti PA, Urbanus ML, Brunner J, de Gier JW, von Heijne G, van der Does C, Driessen AJ, Oudega B, Luirink J.** YidC, the *Escherichia coli* homologue of mitochondrial Oxa1p, is a component of the Sec translocase. *EMBO J.* **2000** Feb 15;19(4):542-9.
- Seluanov A, Bibi E.** FtsY, the procaryotic signal recognition particle receptor homologue, is essential for biogenesis of membrane proteins. *J Biol Chem.* **1997** Jan 24;272(4):2053-5.
- Serek J, Bauer-Manz G, Struhalla G, van den Berg L, Kiefer D, Dalbey R, Kuhn A.** *Escherichia coli* YidC is a membrane insertase for Sec-independent proteins. *EMBO J.* **2004** Jan 28;23(2):294-301.
- Serek J.** Rekonstitution und funktionelle Analyse der *Escherichia coli* Membraninsertase YidC. **2005** Doktorarbeit
- Stiegler N.** YidC - Membraninsertase aus *Escherichia coli* Rekonstitution und Orientierung. **2004** Diplomarbeit
- Stiegler N, Dalbey RE, Kuhn A.** M13 procoat protein insertion into YidC and SecYEG proteoliposomes and liposomes. *J Mol Biol.* **2011** Feb 25;406(3):362-70

- Shimohata** N, Nagamori S, Akiyama Y, Kaback HR, Ito K. SecY alterations that impair membrane protein folding and generate a membrane stress. *J Cell Biol.* **2007** Jan 29;176(3):307-17.
- Stanisich** VA. The properties and host range of male-specific bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol.* **1974** Oct;84(2):332-42.
- Stryer** L. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu Rev Biochem.* **1978**;47:819-46.
- Stryer** L. und Haugland RP Energy transfer: A spectroscopic ruler. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1967** Aug;58(2):719-26.
- Stuart** RA, Neupert W. Making membranes in bacteria. *Nature.* **2000** Aug 10;406(6796):575, 577.
- Sundberg** E, Slagter JG, Fridborg I, Cleary SP, Robinson C, Coupland G. 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.* **1997** May;9(5):717-30.
- Szyrach** G., Ott M., Bonnefoy N., Neupert W. und Herrmann J.M. Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. *EMBO J.* **2003** Dec 15;22(24):6448-57.
- Thiaudière** E, Soekarjo M, Kuchinka E, Kuhn A, Vogel H. Structural characterization of membrane insertion of M13 procoat, M13 coat and Pf3 coat proteins. *Biochemistry.* **1993** Nov 16;32(45):12186-96.
- Tsukazaki** T, Mori H, Echizen Y, Ishitani R, Fukai S, Tanaka T, Perederina A, Vassilyev DG, Kohno T, Maturana AD, Ito K, Nureki O. Structure and function of a membrane component SecDF that enhances protein export. *Nature* **2011** May 11;474(7350):235-8
- Urbanus** ML, Scotti PA, Froderberg L, Saaf A, de Gier JW, Brunner J, Samuelson JC, Dalbey RE, Oudega B, Luirink J. Sec-dependent membrane protein insertion: sequential interaction of nascent FtsQ with SecY and YidC. *EMBO Rep.* **2001** Jun;2(6):524-9.
- Urbanus** ML, Fröderberg L, Drew D, Björk P, de Gier JW, Brunner J, Oudega B, Luirink J. Targeting, insertion, and localization of *Escherichia coli* YidC. *J Biol Chem.* **2002** Apr 12;277(15):12718-23.
- Valent** QA. Und van Leeuwenhoek A. Signal recognition particle mediated protein targeting in *Escherichia coli*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **2001** Jan;79(1):17-31.2001
- van Bloois** E., Haan J.G., de Gier J.W., Oudega B. und Luirink J.F(1)F(0) ATP synthase subunit c is targeted by the SRP to YidC in the *E. coli* inner membrane. *FEBS Lett.* **2004** Oct 8;576(1-2):97-100.
- van Bloois** E, Haan GJ, de Gier JW, Oudega B, Luirink J. Distinct requirements for translocation of the N-tail and C-teil of the *Escherichia coli* inner membrane protein CyoA. *J Biol Chem.* **2006** Apr 14;281(15):10002-9.
- van Bloois** E, Koningstein G, Bauerschmitt H, Herrmann JM, Luirink J. *Saccharomyces cerevisiae* Cox18 complements the essential Sec-independent function of *Escherichia coli* YidC. *FEBS J.* **2007** Nov;274(21):5704-13.
- van Bloois** E, Dekker HL, Fröderberg L, Houben EN, Urbanus ML, de Koster CG, de Gier JW, Luirink J. Detection of cross-links between FtsH, YidC, HflK/C suggests a

linked role for these proteins in quality control upon insertion of bacterial inner membrane proteins. *FEBS Lett.* **2008** Apr 30;582(10):1419-24.

**van den Berg** B, Clemons WM Jr, Collinson I, Modis Y, Hartmann E, Harrison SC, Rapoport TA. X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature.* **2004** Jan 1;427(6969):36-44.

**van der Laan** M., Houben EN., Nouwen N., Luirink J. und Driessen AJ. Reconstitution of Sec-dependent membrane protein insertion: nascent FtsQ interacts with YidC in a SecYEG-dependent manner. *EMBO Rep.* **2001** Jun;2(6):519-23.

**van der Laan** M, Urbanus ML, Ten Hagen-Jongman CM, Nouwen N, Oudega B, Harms N, Driessen AJ, Luirink J. A conserved function of YidC in the biogenesis of respiratory chain complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2003** May 13;100(10):5801-6.

**van der Laan** M, Nouwen N, Driessen AJ. SecYEG proleoliposomes catalyze the Deltaphi-dependent membrane insertion of FtsQ. *J Biol Chem.* **2004** Jan 16;279(3):1659-64.

**van der Laan** M, Bechtluft P, Kol S, Nouwen N, Driessen AJ. F1F0 ATP synthase subunit c is a substrate of the novel YidC pathway for membrane protein biogenesis. *J Cell Biol.* **2004** Apr 26;165(2):213-22.

**van der Wolk** JP, de Wit JG, Driessen AJ. The catalytic cycle of the Escherichia coli SecA ATPase comprises two distinct preprotein translocation events. *EMBO J.* **1997** Dec 15;16(24):7297-304.

**Veenendaal** AK, van der Does C, Driessen AJ. Mapping the sites of interaction between SecY and SecE by cysteine scanning mutagenesis. *J Biol Chem.* **2001** Aug 31;276(35):32559-66.

**Veenendaal** AK, van der Does C, Driessen AJ. The protein-conducting channel Sec YEG. *Biochim Biophys Acta.* **2004** Nov 11;1694(1-3):81-95.

**Vivian** JT, Callis PR. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophys J.* **2001** May;80(5):2093-109.

**Vrontou** E, Economou A. Structure and function of SecA, the preprotein translocase nanomotor. *Biochim Biophys Acta.* **2004** Nov 11;1694(1-3):67-80.

**Wagner** S, Baars L, Ytterberg AJ, Klussmeier A, Wagner CS, Nord O, Nygren PA, van Wijk KJ, de Gier JW. Consequences of membrane protein overexpression in Escherichia coli. *Mol Cell Proteomics.* **2007** Sep;6(9):1527-50.

**Wagner** S., Pop OI., Haan GJ., Baars L., Koningstein G., Klepsch MM., Genevaux P., Luirink J. und de Gier JW. Biogenesis of MalF and the MalFGK(2) maltose transport complex in Escherichia coli requires YidC. *J Biol Chem.* **2008** Jun 27;283(26):17881-90.

**Wang** P., Kuhn A. und Dalbey RE. Global change of gene expression and cell physiology in YidC-depleted Escherichia coli. *J Bacteriol.* **2010** Apr;192(8):2193-209.

**Watanabe** M, Blobel G. Cytosolic factor purified from Escherichia coli is necessary and sufficient for the export of a preprotein and is a homotetramer of SecB. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1989** Apr;86(8):2728-32.

**Welsh** L.C., Symmons M.F., Sturtevant J.M., Marvin D.A., Perham R.N. Structure of the capsid of Pf3 filamentous phage determined from X-ray fibre diffraction data at 3.1 Å resolution. *J Mol Biol.* **1998**;283(1):155-77.

- Wexler M**, Sargent F, Jack RL, Stanley NR, Bogsch EG, Robinson C, Berks BC, Palmer T. TatD is a cytoplasmic protein with DNase activity. No requirement for TatD family proteins in sec-independent protein export. *J Biol Chem.* **2000** Jun 2;275(22):16717-22.
- Wild K**, Halic M, Sinning I, Beckmann R. SRP meets the ribosome. *Nat Struct Mol Biol.* **2004** Nov;11(11):1049-53. Review.
- Winterfeld S**, Imhof N., Roos T., Bär G., Kuhn A. und Gerken U. Substrate induced conformational change of the Escherichia coli membrane insertase YidC. *Biochemistry* **2009** Jul 21;48(28):6684-91.
- Xie K**, Kiefer D, Nagler G, Dalbey RE, Kuhn A. Different regions of the nonconserved large periplasmic domain of Escherichia coli YidC are involved in the SecF interaction and membrane insertase activity. *Biochemistry.* **2006** Nov 7;45(44):13401-8.
- Xie K**, Hessa T, Seppälä S, Rapp M, von Heijne G, Dalbey RE. Features of transmembrane segments that promote the lateral release from the translocase into the lipid phase. *Biochemistry* **2007** Dec 25;46(51):15153-61
- Yahr TL**, Wickner WT. Evaluating the oligomeric state of Sec YEG in preprotein translocase. *EMBO J.* **2000** Aug 15;19(16):4393-401.
- Yen MR**, Harley KT, Tseng YH, Saier MH Jr. Phylogenetic and structural analyses of the oxa1 family of protein translocases. *FEMS Microbiol Lett.* **2001** Nov 13;204(2):223-31.
- Yi L**, Jiang F, Chen M, Cain B, Bolhuis A, Dalbey RE. YidC is strictly required for membrane insertion of subunits a and c of the F(1)F(0)ATP synthase and SecE of the SecYEG translocase. *Biochemistry.* **2003** Sep 9;42(35):10537-44.
- Yi L**, Celebi N, Chen M, Dalbey RE. Sec/SRP requirements and energetics of membrane insertion of subunit a, b and c of the Escherichia coli F1F0 ATP synthase. *J Biol Chem.* **2004** Sep 17;279(38):39260-7.
- Zagrovc B**, Jayachandran G, Millett IS, Doniach S, Pande VS. How large is an alpha-helix? Studies of the radii of gyration of helical peptides by small-angle-X-ray scattering and molecular dynamics. *J Mol Biol.* **2005** Okt 21;353(2):232-41
- Zarrabi N.** Hidden Markov Modelle an Einzelmoleküldaten. **2010** Dissertation 3. Physikalisches Institut, Universität Hohenheim
- Zhang Y.J.**, Tian H.F., Wen J.F. The evolution of YidC/Oxa/Alb3 family in the three domains of life: a phylogenomic analysis. *BMC Evol Biol.* **2009** Jun 18;9:137.
- Zhou J.** und Xu Z. Structural determinants of SecB recognition by SecA in bacterial protein translocation. *Nat Struct Biol.* **2003** Nov;10(11):942-7.
- Zimmermann R**, Watts C, Wickner W. The biosynthesis of membrane-bound M13 coat protein. Energetics and assembly intermediates. *J Biol Chem.* **1982** Jun 10;257(11):6529-36



## 8 Anhang

### 8.1 DNA- und Aminosäuresequenz von YidC aus *E. coli*

#### DNA-Basensequenz YidC WT

atg gat tcg caa cgc aat ctt tta gtc atc gct ttg ctg ttc gtg tct ttc atg atc tgg caa gcc tgg  
gag cag gat aaa aac ccg caa cct cag gcc caa cag acc acg cag aca acg acc acc gca  
gcg ggt agc gcc gcc gac cag ggc gta ccg gcc agt ggc cag ggg aaa ctg atc tcg gtt aag  
acc gac gtg ctt gat ctg acc atc aac acc cgt ggg ggt gat gtt gag caa gct ctg ctg cct gct  
tac ccg aaa gag ctg aac tct acc cag ccg ttc cag ctg ttg gaa act tca ccg cag ttt att tat  
cag gca cag agc ggt ctg acc ggt cgt gat ggc ccg gat aac ccg gct aac ggc ccg cgt ccg  
ctg tat aac gtt gaa aaa gac gct tat gtg ctg gct gaa ggt caa aac gaa ctg cag gtg ccg atg  
acg tat acc gac gcg gca ggc aac acg ttt acc aaa acg ttt gtc ctg aaa cgt ggt gat tac gct  
gtc aac gtc aac tac aac gtg cag aac gct ggc gag aaa ccg ctg gaa atc tcc tcg ttt ggt  
cag ttg aag caa tcc atc act ctg cca ccg cat ctc gat acc gga agc agc aac ttc gca ctg  
cac acc ttc cgt ggc gcg gcg tac tcc acg cct gac gag aag tat gag aaa tac aag ttc gat  
acc att gcc gat aac gaa aac ctg aac atc tct tcg aaa ggt ggt tgg gtg gcg atg ctg caa  
cag tat ttc gcg acg gcg tgg atc ccg cat aac gac ggt acc aac aac ttc tat acc gct aat ctg  
ggt aac ggc atc gcc gct atc ggc tat aaa tct cag ccg gta ctg gtt cag cct ggt cag act ggc  
gcg atg aac agc acc ctg tgg gtt ggc ccg gaa atc cag gac aaa atg gca gct gtt gct ccg  
cac ctg gat ctg acc gtt gat tac ggt tgg ttg tgg ttc atc tct cag ccg ctg ttc aaa ctg ctg aaa  
tgg atc cat agc ttt gtg ggt aac tgg ggc ttc tcc att atc atc atc acc ttt atc gtt cgt ggc atc  
atg tac ccg ctg acc aaa gcg cag tac acc tcc atg gcg aag atg cgt atg ttg cag ccg aag  
att cag gca atg cgt gag cgt ctg ggc gat gac aaa cag cgt atc agc cag gaa atg atg gcg  
ctg tac aaa gct gag aag gtt aac ccg ctg ggc ggc tgc ttc ccg ctg ctg atc cag atg cca atc  
ttc ctg gcg ttg tac tac atg ctg atg ggt tcc gtt gaa ctg cgt cag gca ccg ttt gca ctg tgg atc  
cac gac ctg tcg gca cag gac ccg tac tac atc ctg ccg atc ctg atg ggc gta acg atg ttc ttc  
att cag aag atg tcg ccg acc aca gtg acc gac ccg atg cag cag aag atc atg acc ttt atg  
ccg gtc atc ttc acc gtg ttc ttc ctg tgg ttc ccg tca ggt ctg gtg ctg tac tat atc gtc agc aac  
ctg gta acc att att cag cag cag ctg att tac cgt ggt ctg gaa aaa cgt ggc ctg cat agc cgc  
gag aag aaa aaa tcc cac cac cac cac cac cac cac cac tga\*

\* Stopcodon

## Aminosäuresequenz YidC WT

Transmembranbereiche sind unterstrichen

MDSQRNLLVI ALLFVSFMIW QAWEQDKNPQ PQAQQTQTQT TTAAGSAADQ  
 GVPASGQGKL ISVKTDVLDL TINTRGGDVE QALLPAYPKE LNSTQPFQLL  
 ETSPQFIYQA QSGLTGRDGP DNPANGPRPL YNVEKDAYVL AEGQNELQVP  
 MTYTDAAGNT FTKTFVLKRG DYAVNVNYNV QNAGEKPLEI SSFGQLKQSI  
 TLPPHLDTGS SNFALHTFRG AAYSTPDEKY EKVKFDTIAD NENLNISKKG  
 GWVAMLQQYF ATAWIPHNDG TNNFYTANLG NGNIAAIGYK SQPVLVQPGQ  
 TGAMNSTLWV GPEIQDKMAA VAPHLDLTVD YGWLWFISQP LFKLLKWIHS  
 FVGNWGFSSII IITFIVRGIM YPLTKAQYTS MAKMRMLQPK IQAMRERLGD  
 DKQRISQEMM ALYKAEKVNP LGGCFFLLIQ MPIFLALYYM LMGSVELRQA  
 PFALWIHDLS AQDPYYILPI LMGVTFMFFIQ KMSPTTVTDP MQQKIMTFMP  
VIFTVFFLWF PSGLVLYYIV SNLVTIIQQQ LIYRGLEKRG LHSREKKKSH  
 HHHHHHHHHH

## Einzel-Cystein Mutanten von YidC

Alle Mutanten tragen an AS Position 423 S (agc) statt C (tgc)

YidC-7C	AS Position 7	C (tgt) statt L (ctt)
YidC-23C	AS Position 23	C (tgt) statt W (tgg)
YidC-405C	AS Position 405	C (tgt) statt S (agc)
YidC-442C	AS Position 442	C (tgt) statt G (ggg)
YidC-478C	AS Position 478	C (tgt) statt I (att)
YidC-511C	AS Position 511	C (tgt) statt S (tca)

## 8.2 DNA- und Aminosäuresequenz von Pf3 coat Protein

### DNA-Basen- und Aminosäuresequenz Pf3W0 coat

Transmembranbereich ist unterstrichen

M Q S V I T D V T G Q L T A V Q A D I T T I  
 atg caa tcc gtg att act gat gtg aca ggc caa ctg aca gcg gtg caa gct gat atc act acc att

G G A I I V L A A V V L G I R F I K A Q L L H  
ggt ggt gct att att gtt ctg gcc gct gtt gtg ctg ggt att cgc ttt atc aaa cgc caa tta ctg cac

P V Q L F  
 cct gtt caa ttg ttt





## 9 Abkürzungen und Trivialnamen

a	Adenin
A	Alanin
Å	Angström
Abb	Abbildung
APD	Avalanche Photo Diode
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
C	Cystein
c	Cytosin
C-Terminus	Carboxyterminus
D	Aspartat
Da	Dalton
DdH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DDM	n-Dodecyl-β-D-Maltosid
ddNTP	Di-2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPC	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DOPE	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidyl-ethanolamin
DOPG	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)
DTT	Dithiothreitol
E	Glutamat
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii (lat.: und andere)
EtOH	Ethanol
F	Phenylalanin
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
G	Glutamin
g	Guanin
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
H	Histidin
His-tag	Histidin-Reste

---

I	Isoleucin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
K	Lysin
L	Leucin
LB	Luria Bertani oder lysogeny broth
M	Methionin
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
mRNA	messenger RNA
n	Asparagin
NaDOC	Natriumdesoxycholat
NTA	Nitrilotriessigsäure
N-Terminus	Aminoterminus
OD	optische Dichte
P	Prolin
PCR	Polymerasekettenreaktion
Ponceau S	3-Hydroxy-4-[2-sulfo-4-(4-sulfo-phenylazo) phenylazo] - 2,7-naphtalensulfonsäure, Na-Salz
psi	<i>pounds per square inch</i>
Q	Glutamin
R	Arginin
RNA	Ribonukleinsäure
RP	<i>reversed-phase</i> (Umkehrphase)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SDS	Sodiumdodecylsulfat
T	Threonin
TBS	Tris-buffered Saline
TCA	Trichloressigsäure
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphinhydrochlorid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFE	Trifluoressigsäure
Tricin	N-[2-Hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	Volumen pro Volumen
W	Tryptophan

---

WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
Y	Tyrosin



## Posterpräsentationen

Teile dieser Arbeit wurden in Form von Postern auf folgenden Veranstaltungen präsentiert:

8. European Symposium of the Protein Society  
Zürich (Schweiz), Juni 2009

7. European Biophysics Congress  
Genua (Italien), Juli 2009

16. International workshop on Single Molecule Spectroscopy and Ultrasensitive Analysis in the Life Sciences (PicoQuant)  
Berlin, September 2010

International Bunsen Discussion Meeting  
Göttingen, März 2011

## Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden bzw. werden publiziert:

Substrate-Induced Conformational Change of the *Escherichia coli* Membrane Insertase YidC

Winterfeld S, Imhof N., Roos T., Bär G., Kuhn A. und Gerken U. Substrate induced conformational change of the *Escherichia coli* membrane insertase YidC. *Biochemistry* **2009** Jul 21;48(28):6684-91.

Real time observation of single membrane protein insertion events by the *Escherichia coli* insertase YidC.

Winterfeld S, Ernst S, Börsch M, Gerken U und Kuhn A. 2011 (wird eingereicht)



**Erklärung gemäß §8 Absatz 2 Ziffer 2 der Promotionsordnung zum  
Dr. rer. nat. der Universität Hohenheim**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Wörtlich oder inhaltliche übernommene Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift