
Funktion und Dynamik eines gemeinsamen Insertionskomplexes der Sec-Translokase und YidC-Insertase in der bakteriellen Membran

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

Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim

Institut für Mikrobiologie

vorgelegt von

Anja Marina Steudle

aus Esslingen am Neckar

2020

Dekan: Prof. Dr. Uwe Beifuß
1. berichtende Person: Prof. Dr. Andreas Kuhn
2. berichtende Person: Prof. Dr. Heinz Breer
3. Prüfer: Prof. Dr. Armin Huber

Eingereicht am: 07.08.2020
Mündliche Prüfung am: 28.10.2020

Die vorliegende Arbeit wurde am 23.09.2020 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS:

1	Einleitung	2
1.1	Proteintransport in und über die innere <i>E. coli</i> Membran.....	2
1.1.1	Protein-Targeting zum SecYEG-Translokon und zur YidC-Insertase.....	4
1.1.2	SecYEG – Der Kernkomplex des Sec-Translokons	12
1.1.3	Die YidC-Insertase	22
1.1.4	Insertion und Translokation von Sec- und YidC-abhängigen Substraten.....	30
1.2	Disulfid-Cross-Linking von Proteinen.....	35
1.3	Fluoreszenz und FRET	36
1.3.1	Fluoreszenz.....	36
1.3.2	FRET: Förster-Resonanzenergietransfer zur Untersuchung von SecY/YidC- Interaktionen	38
1.4	Ziele der Arbeit	42
2	Material und Methoden.....	44
2.1	Kulturmedien und Zusätze.....	44
2.1.1	LB-Medium (Luria Bertani)	44
2.1.2	M9 Minimalmedium für <i>Pulse-labeling</i> Experimente	44
2.1.3	SOB-Medium für Transformationen	46
2.1.4	Antibiotika	46
2.1.5	Zucker	46
2.2	Bakterienstämme	46
2.2.1	<i>Escherichia coli</i> XL-1 Blue	46
2.2.2	<i>Escherichia coli</i> C43(DE3)	47
2.2.3	<i>Escherichia coli</i> Lemo21(DE3).....	47
2.2.4	<i>Escherichia coli</i> BL21.19 (DE3).....	48
2.2.5	<i>Escherichia coli</i> SF100.....	48
2.2.6	<i>Escherichia coli</i> MK6S	48
2.2.7	<i>Escherichia coli</i> AF659	49
2.3	Plasmide und verwendete Mutanten.....	49
2.3.1	<i>E. coli</i> SecY Mutanten	50

2.3.2	<i>E. coli</i> YidC Mutanten	50
2.3.3	<i>E. coli</i> SecY-YidC-Fusionsprotein	51
2.3.4	<i>E. coli</i> proPhoA	51
2.4	Antikörper	51
2.5	Molekularbiologische Methoden	52
2.5.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen (RbCl-Methode).....	52
2.5.2	Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	52
2.5.3	Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	53
2.5.4	Zielgerichtete Mutagenese (QuikChange)	53
2.5.5	Ethanol-Fällung von Plasmid-DNA	54
2.5.6	Sequenzierung von DNA.....	54
2.5.7	Restriktionsverdau von DNA	54
2.5.8	Agarose-Gelelektrophorese	55
2.5.9	Ligation von DNA-Fragmenten.....	55
2.5.10	TCA-Fällung von Proteinen.....	55
2.5.11	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	56
2.5.12	Coomassie-Färbung von SDS-Gelen	57
2.5.13	Western Blot und Immundetektion von Proteinbanden	57
2.5.14	Entfernen von Antikörpern von einer Membran	58
2.6	<i>In vivo</i> Komplementationstest.....	58
2.6.1	YidC-Komplementation	58
2.6.2	SecY-Komplementation.....	59
2.7	<i>In vivo Cross-Links – Pulse-labeling</i> und Immunopräzipitation	59
2.8	Protein-Reinigung	61
2.8.1	Reinigung von <i>E. coli</i> YidC.....	61
2.8.2	Reinigung von <i>E. coli</i> SecYEG.....	63
2.8.3	Reinigung des SecY-YidC-Fusionsproteins.....	64
2.8.4	Reinigung von <i>E. coli</i> proPhoA	66
2.9	Fluoreszenzfarbstoff-Markierung von Proteinen (<i>Labeling</i>)	68
2.10	Größenausschluss-Chromatographie	69
2.11	Bestimmung der Proteinkonzentration und der <i>Labeling</i> -Effizienz (DOL).....	69
2.12	Herstellung von Liposomen	70

2.13	Rekonstitution von Membranproteinen mittels Extruder und Bio-Beads	70
2.14	Bestimmung der Partikelgröße über dynamische Lichtstreuung.....	71
2.15	Fluoreszenz-Messungen	72
2.15.1	Messungen am Fluorometer	72
2.15.2	Auswertung der Fluoreszenzmessdaten	72
3	Ergebnisse	80
3.1	YidC interagiert <i>in vivo</i> mit dem SecY <i>lateral gate</i>	80
3.1.1	Depletion von YidC in <i>E. coli</i> MK6S.....	82
3.1.2	Die SecY-Transmembrandomäne 3 interagiert mit der YidC- Transmembrandomäne 3	82
3.1.3	Die SecY-Transmembrandomäne 8 interagiert mit der YidC- Transmembrandomäne 5	85
3.1.4	Die DTT-abhängige Bande ist ein <i>Cross-Link</i> -Produkt aus YidC und SecY	87
3.2	SecY interagiert mit YidC <i>in vitro</i> mit einer hohen Affinität.....	89
3.2.1	Reinigung der Membranproteine SecYEG und YidC	90
3.2.2	Fluoreszenzfarbstoff-Markierung von SecYEG und YidC.....	93
3.2.3	SecY und YidC interagieren in äquimolarem Verhältnis mit hoher Bindungsaffinität in Detergens.....	98
3.2.4	Rekonstitution der Membranproteine SecYEG und YidC.....	103
3.2.5	Bestimmung der Affinität und der Stöchiometrie der SecY/YidC-Interaktion in DOPC-Proteoliposomen.....	106
3.2.6	SecY und YidC interagieren lateral in Proteoliposomen	108
3.3	Die Mutante YidC 5S: Gestörte Interaktion zu SecY	113
3.3.1	YidC 5S Mutante komplementiert die YidC-Funktion nicht, inseriert aber ein SecY-unabhängiges Substrat	113
3.3.2	Die Mutante YidC 5S zeigt eine geringere Affinität zu SecY als der YidC WT ..	116
3.4	Das Fusionsprotein SecY-YidC.....	120
3.4.1	Klonierung des SecY-YidC-Fusionsproteins	120
3.4.2	Das Fusionsprotein komplementiert die SecY- und YidC-Funktion	121
3.4.3	Expression und Reinigung des SecY-YidC-Fusionsproteins	124
3.4.4	Rekonstitution des SecY-YidC-Fusionsproteins.....	126

3.4.5	Das Fusionsprotein SecY-YidC inseriert und transloziert Substratproteine.....	127
3.5	Translokation und Insertion von Substratproteinen durch SecYEG und YidC.....	127
3.5.1	Reinigung des Substrats proPhoA	129
3.5.2	Fluoreszenzfarbstoff-Markierung des Substrats proPhoA.....	130
3.5.3	Quenching der Fluoreszenz mit Kaliumiodid	132
3.5.4	Translokation und Insertion von Sec- und YidC-abhängigen Substraten.....	134
4	Diskussion.....	138
4.1	SecY und YidC interagieren <i>in vitro</i> mit hoher Affinität	139
4.2	Das <i>lateral gate</i> von SecY kontaktiert die hydrophobe Rutsche von YidC.....	145
4.2.1	<i>In vivo Cross-Linking</i> ergibt Kontakte zwischen dem SecY <i>lateral gate</i> und YidC-TM3 und 5	146
4.2.2	Die YidC 5S Mutante interagiert nicht mit SecY.....	149
4.2.3	Das Kontaktmodell der SecY/YidC-Interaktion	152
4.3	<i>In vitro</i> Translokation und Insertion von SecY- und YidC-abhängigen Substraten..	154
4.3.1	<i>In vitro</i> Experimente mit DOPC-Proteoliposomen	154
4.3.2	<i>In vitro</i> Translokation und Insertion von proPhoA und Pf3 <i>coat</i>	156
4.3.3	Das SecY-YidC-Fusionsprotein inseriert und transloziert YidC- und SecY- abhängige Substrate.....	159
4.4	Die Insertion und Faltung von LacY wird von SecYEG dominiert	160
4.5	Fazit.....	162
	ZUSAMMENFASSUNG	164
	SUMMARY.....	166
5	Literaturverzeichnis	169
6	Anhang	203
6.1	Sequenzen	203
6.1.1	DNA- und Proteinsequenz von SecY.....	203
6.1.2	DNA- und Proteinsequenz von YidC.....	204
6.1.3	DNA- und Proteinsequenz des SecY-YidC-Fusionsproteins.....	206
6.1.4	Proteinsequenz von proPhoA.....	206
6.1.5	Proteinsequenz von Pf3 <i>coat</i>	207

6.2	Abkürzungen.....	207
	PUBLIKATIONEN	210
	DANKSAGUNG.....	211
	CURRICULUM VITAE	212
	ERKLÄRUNG.....	213

1 EINLEITUNG

1 EINLEITUNG

1.1 Proteintransport in und über die innere *E. coli* Membran

Membranen dienen als hydrophobe physikalische Barrieren, die das Innere der Zelle umgeben oder die Zelle in verschiedene Kompartimente unterteilen, um biologische Reaktionen räumlich voneinander zu trennen. Bakterielle Zellen besitzen ein wässriges Cytoplasma, das

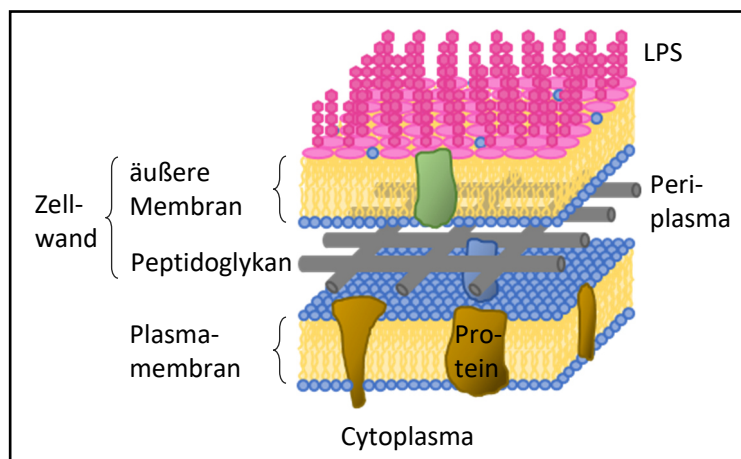


Abbildung 1: Aufbau der Membranen von Gram-negativen Bakterien. Das Cytoplasma Gram-negativer Bakterien wird von zwei Lipiddoppelschichten, der inneren und der äußeren Membran, umschlossen. Die äußere Membran enthält Lipopolysaccharide (LPS). Zwischen den beiden Membranen befindet sich das Periplasma mit der Peptidoglykanschicht (Abbildung nach Campbell & Reece, 2003b).

Zwischen den beiden Membranen befindet sich ein weiterer wässriger Raum, das Periplasma. Das Periplasma enthält eine Peptidoglykanschicht, die im Vergleich zu der in Gram-positiven Bakterien sehr viel dünner ist (Campbell & Reece, 2003b; Nelson & Cox, 2001a; Abbildung 1).

Mehr als ein Drittel der bakteriellen Proteine erfüllen ihre Funktion außerhalb des Cytoplasmas, dem Ort ihrer Synthese (Orfanoudaki & Economou, 2014). Hierfür müssen sie in oder über die Membranen transportiert werden. Im Falle von Gram-negativen Bakterien stehen dafür mehrere Systeme zur Verfügung, die die Proteine in die innere Zellmembran, das Periplasma, die äußere Membran oder in den extrazellulären Raum translozieren beziehungsweise inserieren (Crane & Randall, 2017) oder sogar bis in Wirtszellen transportieren (Green & Mecsas, 2016).

Einige Proteinsekretionssysteme (T1SS, T3SS, T4SS, und T6SS) transportieren ihre Substrate in einem Schritt über beide Membranen (Abbildung 2). Dabei können die Systeme T3SS, T4SS, und T6SS Proteine bis in eine Wirtszelle, also zusätzlich noch über eine dritte Membran, transportieren (Green & Meccas, 2016).

Periplasmatische oder OM-Proteine (*outer membrane protein* = Membranprotein der äußeren Membran) werden meist posttranslational mithilfe der Sec-Translokase vor ihrer Faltung über die innere Membran transportiert (Steinberg *et al.*, 2018). Für den Transport von bereits fertig gefalteten Proteinen über die innere Membran ist das Tat-System (*Twin Arginine Translocation*) verantwortlich (Palmer & Berks, 2012; Patel *et al.*, 2014). Die Substrate dieser Translokase besitzen zwei nebeneinander liegende Argininreste (*Twin Arginine*) in ihrer Signalsequenz. Sollen die Proteine weiter über die äußere Membran hinaus transportiert werden, geschieht dies in einem zweiten Schritt über das T2SS oder T5SS-System (Green & Meccas, 2016; Abbildung 2).

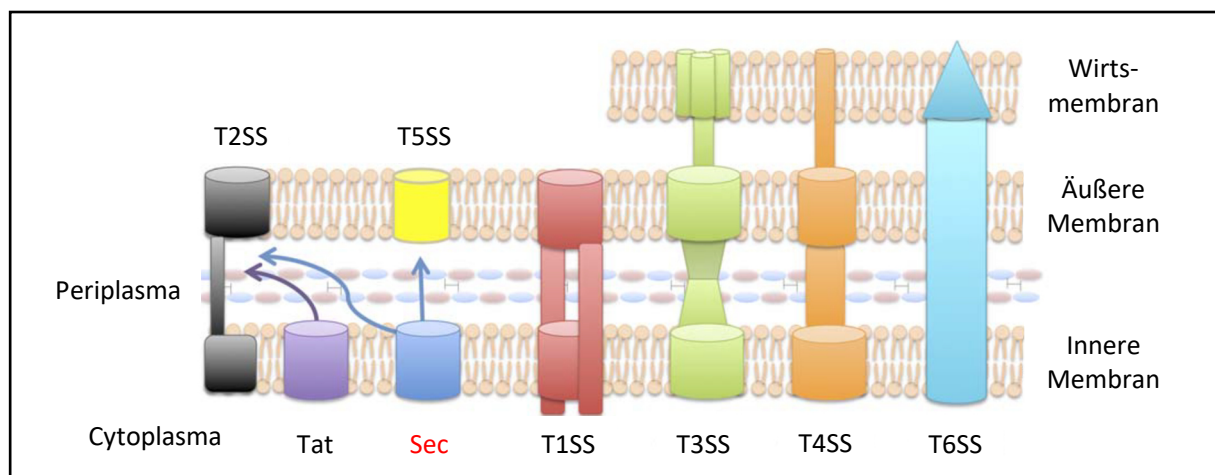


Abbildung 2: Sekretionssysteme in Gram-negativen Bakterien. Die verschiedenen Sekretionssysteme in Gram-negativen Bakterien können ihre Substrate über eine, zwei oder drei Membranen transportieren. Über die innere Membran werden Proteine meist über die Sec-Translokase (ungefaltete Proteine) oder das Tat-System (gefaltete Proteine) transportiert. Sollen diese Proteine auch die äußere Membran passieren, geschieht dies in einem zweiten Schritt (Abbildung aus: Green & Meccas, 2016).

Die Membranproteine der cytoplasmatischen Membran (IM-Protein = *inner membrane protein*) besitzen vor allem α -helikale Transmembrandomänen. Diese sind meist hydrophober als die β -Faltblattstrukturen der Membranproteine der äußeren Membran (Chaturvedi & Mahalakshmi, 2017; Steinberg *et al.*, 2018; Zhang & Han, 2016). Daher neigen IM-Proteine während und nach ihrer Synthese in der wässrigen Umgebung des Cytoplasmas zur Aggregation (Kuhn *et al.*, 2017a). Um dies zu verhindern, werden sie meist cotranslational

mithilfe der Sec-Translokase oder YidC-Insertase inseriert (Koch *et al.*, 1999; Steinberg *et al.*, 2018; Valent *et al.*, 1998; Welte *et al.*, 2012). Die Insertion kann in Kooperation von SecYEG und YidC (Petriman *et al.*, 2018; Sachelaru *et al.*, 2017; Samuelson *et al.*, 2000; Scotti *et al.*, 2000) erfolgen. Je nach Substrat können SecYEG und YidC aber auch unabhängig voneinander agieren (Chen *et al.*, 2002b; Koch & Müller, 2000; Samuelson *et al.*, 2000). Einige kleinere ein- und zweiseitige Membranproteine können außerdem posttranslational vor allem von YidC allein inseriert werden (Robinson & Woolhead, 2013).

Das Sec-System ist ein lange konservierter Mechanismus des Protein-Transports und findet sich in allen Reichen des Lebens (Bakterien, Archaeen, Eukaryonten) wieder. Das System besteht aus drei Teilen: einer Komponente, die für das Protein-*Targeting* an die Membran verantwortlich ist, einer Energie-liefernden Komponente und dem multimeren Kanal-bildenden Membranproteinkomplex, der SecYEG-Translokase (Green & Meccas, 2016).

Ebenso ist YidC in allen Reichen des Lebens mit Homologen der YidC/Oxa/Alb-Familie vertreten (Borowska *et al.*, 2015; Funes *et al.*, 2011).

1.1.1 Protein-*Targeting* zum SecYEG-Translokon und zur YidC-Insertase

Viele Proteine werden als Präproteine synthetisiert, die erst nach proteolytischer Spaltung ihre mature Größe besitzen. Sekretorische und membranständige Präproteine besitzen eine N-terminale Signalsequenz von 18-30 Aminosäuren, die im Fall der sekretorischen Proteine nach der Translokation durch eine Membran-gebundene Signalpeptidase entfernt wird. Mithilfe dieser Signalsequenz finden die Proteine ihren Weg zur Membran beziehungsweise zur Translokase und Insertase. Außerdem können im murenen Teil des Proteins ebenfalls Signalsequenzen vorhanden sein (Blobel & Dobberstein, 1975; Fekkes & Driessen, 1999; Robson & Collinson, 2006).

In *E. coli* finden sich zwei wichtige Wege, über die Proteine zur Sec-Translokase oder zur YidC-Insertase geleitet werden (Abbildung 3): der SRP-abhängige (*signal recognition particle*, Signalerkennungspartikel) und der SecA/B-abhängige Weg (Steinberg *et al.*, 2018).

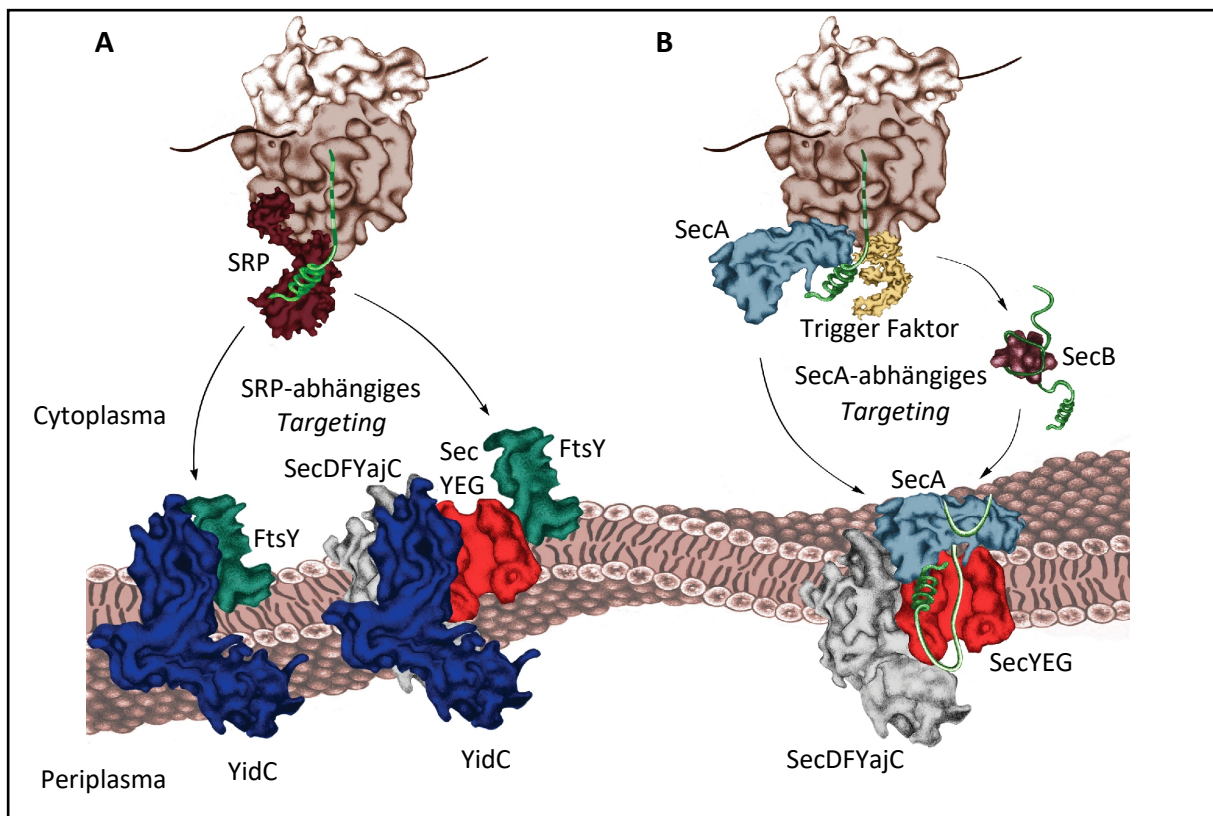


Abbildung 3: SRP- und SecA-abhängiges Targeting in *E. coli*. In Gram-negativen Bakterien wie *E. coli* sind zwei Protein-Targeting-Wege zur Membran zu finden. (A) Das SRP-abhängige Targeting leitet vor allem Membranproteine cotranslational an den SRP-Rezeptor FtsY, um diese über SecYEG oder YidC in die innere Membran zu inserieren. (B) Über das Targeting in Abhängigkeit von SecA werden hauptsächlich periplasmatische und OM-Proteine posttranslational zum SecYEG-Translokon geleitet. Einige Beobachtungen zeigen, dass das Targeting über SecA auch cotranslational ablaufen kann. (Abbildung: abgewandelt aus Steinberg *et al.*, 2018)

SRP und sein Rezeptor FtsY

Der bakterielle SRP ist ein Ribonukleoprotein, das aus der GTPase Untereinheit Ffh und einer 4,5S RNA (in Gram-negativen bzw. 6S RNA in Gram-positiven Bakterien) besteht. Ffh (48 kDa) ist hochkonserviert und homolog zur eukaryontischen SRP54 Untereinheit, woher auch der Name stammt: *Fifty-four-homologue* (Ffh, 54-Homolog).

Der bakterielle SRP-Rezeptor FtsY besitzt ebenfalls eine GTPase Untereinheit. FtsY ist durch seine Lipid- und SecY-Bindestellen auch ohne eigenen Membrananker am Translokon assoziiert.

Ffh und FtsY bestehen jeweils aus drei Domänen, wovon zwei (N- und G-Domäne) homolog zueinander aufgebaut sind. Die N-Domäne ist aus einem Bündel von vier Helices aufgebaut, auf die die GTPase G-Domäne folgt. Bilden Ffh und FtsY über diese beiden Domänen einen Komplex, wird die GTPase-Aktivität verstärkt. Die dritte nicht homologe FtsY-Domäne ist die

A-Domäne, die sich am N-Terminus befindet. Sie besitzt N-terminal eine Lipid-bindende Helix sowie die Bindestelle für das Sec-Translokon, um den Rezeptor direkt am Translokon zu assoziieren. Weitere SecY-Bindestellen finden sich in der NG-Domäne. Die M-Domäne, die nicht homologe dritte Domäne am C-Terminus von Ffh, ist flexibel an die NG-Domäne gebunden. Sie erkennt die hydrophoben N-terminalen Signalsequenzen der Membranproteine und interagiert mit der 4,5S RNA, die eine Haarnadelstruktur formt und die GTP-Hydrolyse reguliert. Neben dem Erkennen und Binden von Signalsequenzen von naszierenden Proteinen erkennt SRP vor allem über die N-Domäne von Ffh auch das Ribosom (Steinberg *et al.*, 2018).

Ribosomen sind ebenfalls Ribonukleoproteine und bestehen aus ribosomalen Proteinen und ribosomaler RNA (rRNA). Während der Proteinbiosynthese übersetzen sie den genetischen Code in Form von mRNA in die Aminosäuresequenz der Proteine. Das bakterielle 70S Ribosom besteht aus einer kleinen (30S) und einer großen Untereinheit (50S). Die kleine Untereinheit wird aus 21 ribosomalen Proteinen, die als S1-S21 bezeichnet werden (*S=small*), und einer 16S rRNA gebildet. Die große Untereinheit setzt sich aus 33 Proteinen (L1-L36; *L=large*) und zwei rRNAs, der 23S und der 5S rRNA, zusammen (Shajani *et al.*, 2011). Neu synthetisierte Proteine verlassen das Ribosom durch einen Tunnel (*ribosomal tunnel exit*) an der Rückseite der großen Untereinheit. Dieser ist ca. 80-100 Å lang und hat Platz für 30-40 Aminosäuren eines naszierenden Proteins (Bernabeu & Lake, 1982; Malkin & Rich, 1967). An seinem äußeren Ende bilden die konservierten ribosomalen Proteine L22, L23, L24 und L29 und die nur in Prokaryonten vorkommenden Proteine L17 und L32 einen Kranz (Kramer *et al.*, 2009). SRP interagiert mit dem Ribosom über einige dieser Proteine. Die N-Domäne von Ffh interagiert vor allem mit L23, aber auch mit L29. L22 und L24 sind Kontaktstellen für die M-Domäne (Schaffitzel *et al.*, 2006). Außerdem interagiert die 4,5S RNA von SRP mit L32 in Bakterien.

SRP-abhängiges Targeting

Das *Targeting* von den meisten der etwa 1000 verschiedenen bekannten Membranproteinen läuft wie in 1.1 erwähnt cotranslational in Abhängigkeit von SRP (Koch *et al.*, 1999) ab (Abbildung 3A). Hierbei erkennt und bindet SRP die N-terminale Signalsequenz von naszierenden Proteinen und Ribosomen, die das Membranprotein translatieren (Gu *et al.*, 2003; Halic *et al.*, 2004; Pool *et al.*, 2002; Schaffitzel *et al.*, 2006). Diese N-terminale

Signalsequenz wird Signalankersequenz (*signal anchor sequence*) genannt und unterscheidet Membranproteine von sekretorischen oder cytosolischen Proteinen. Die Sequenz besteht nicht aus einer bestimmten Aminosäureabfolge, sondern aus hydrophoben und aromatischen Aminosäuren, die N-terminal von basischen und C-terminal von polaren Resten umgeben sind (Steinberg *et al.*, 2018). Die Signalankersequenz unterscheidet sich von Signalsequenzen sekretorischer Proteine jedoch kaum. Hierbei spielt die höhere Hydrophobizität der Signalankersequenz eine wichtige Rolle (Beck *et al.*, 2000; Valent *et al.*, 1995). Ein weiterer Unterschied ist, dass Signalankersequenzen oft keine Proteaseschnittstelle besitzen und selbst als erste Transmembrandomäne dienen (Steinberg *et al.*, 2018). Es gibt aber auch einige sekretorische Proteine mit relativ hydrophoben Signalsequenzen wie die β -Laktamase, die abhängig von SRP sind (Luirink *et al.*, 1994; Phillips & Silhavy, 1992).

Der Komplex aus SRP, dem Ribosom und der naszierenden Peptidkette (RNC: *ribosome nascent chain*) wird an den SRP-Rezeptor FtsY geleitet, der an SecYEG gebunden ist. Dort bindet der RNC an das SecYEG-Translokon. Die gleichzeitige GTP-Hydrolyse durch die GTPase-Domänen von SRP und FtsY führt dazu, dass sich SRP vom Komplex löst (Freymann *et al.*, 1997; Kusters *et al.*, 1995; Steinberg *et al.*, 2018; Valent *et al.*, 1998). Durch das Fortschreiten der Translation werden die Transmembrandomänen des Membranproteins über den vom SecYEG-Translokon gebildeten Kanal in die Membran eingebaut (Knyazev *et al.*, 2018). Die Insertion kann dabei auch in Kooperation mit YidC erfolgen (Petriman *et al.*, 2018; Sachelaru *et al.*, 2017; Samuelson *et al.*, 2000; Scotti *et al.*, 2000). Für die Translokation von großen periplasmatischen Domänen wird zusätzliche Energie von der SecA-ATPase benötigt (Deitermann *et al.*, 2005; Neumann-Haefelin *et al.*, 2000; Saaf *et al.*, 1995; van der Laan *et al.*, 2004a). Einige Membranproteine können also gleichzeitig von SRP (*Targeting*) und SecA (Energieförderer) abhängig sein.

Neben dem *Targeting* an das SecYEG-Translokon können RNCs über den SRP-Weg auch zu YidC transportiert und Membranproteine ohne große periplasmatische Domäne unabhängig von der SecYEG-Translokase inseriert werden (Facey *et al.*, 2007; Kedrov *et al.*, 2013 und 2016; Kohler *et al.*, 2009; Welte *et al.*, 2012). Außer dem SRP-Weg spielen beim *Targeting* an YidC elektrostatische Interaktionen zwischen Substrat und den Phospholipid-Kopfgruppen sowie Interaktionen zwischen YidC und Ribosomen eine Rolle (Geyter *et al.*, 2019).

SecB – Das Chaperon

SecB ist ein homotetrameres Protein, welches als Dimer von zwei Dimeren (*dimer of dimers*) beschrieben werden kann (Dekker *et al.*, 2003; Murén *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2008; Topping *et al.*, 2001; Watanabe & Blobel, 1989). Das Monomer besteht aus 155 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 17,3 kDa (Kumamoto & Nault, 1989; Weiss *et al.*, 1988). Es ist zu

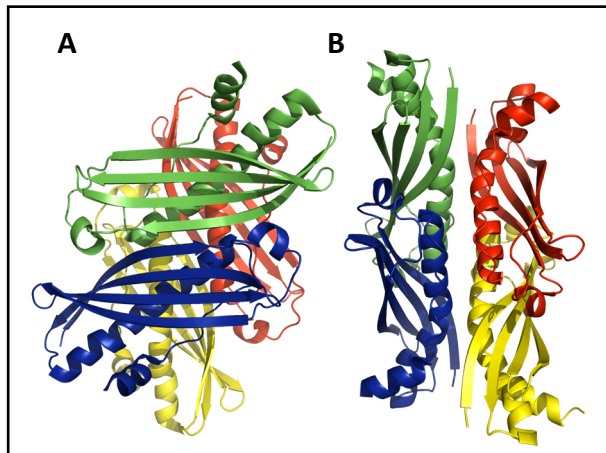


Abbildung 4: Die *E. coli* SecB Struktur (PDB 1QYN; Dekker *et al.*, 2003) bildet ein Dimer aus Dimeren. Die vier Monomere sind jeweils unterschiedlich eingefärbt. (A) Die Ansicht von vorne zeigt die beiden 4-strängigen β -Faltblätter von zwei um 180° zueinander gedrehten Monomeren. (B) In der seitlichen Ansicht ist zu sehen, dass die α -Helices zwischen den β -Faltblättern der beiden Dimeren liegen.

einem β -Faltblatt aus vier antiparallelen Strängen und einer langen α -Helix (α_1) gefaltet. Das Dimer bildet sich aus zwei 180° zueinander gedrehten Monomeren. Aus zwei Dimeren wird letztendlich ein Tetramer gebildet, indem die α -Helices zwischen die β -Faltblätter gepackt werden. Am C-Terminus findet sich eine weitere kurze α -Helix (α_2). In der Kristallstruktur (Abbildung 4) fehlen 11 weitere C-terminale Reste (Dekker *et al.*, 2003).

SecB wurde kurz nach SecA entdeckt (Kumamoto & Beckwith, 1983) und spielt eine wichtige Rolle bei der

Proteinsekretion. Es fungiert als Chaperon und schützt so neu synthetisierte Proteine vor Aggregation oder einer zu frühen Faltung, also einer Faltung vor dem Export über das Sec-Translokon (Collier *et al.*, 1988; Crane & Randall, 2017; Weiss *et al.*, 1988). Die Signalsequenz von sekretorischen Proteinen verzögert die Faltung der Präproteine, sodass SecB Zeit hat, um zu binden und die Proteine in einem ungefalteten Zustand zu halten (Liu *et al.*, 1988; Liu *et al.*, 1989; Randall & Hardy, 1986). Dabei wird die Signalsequenz nicht direkt erkannt, ist aber für die verzögerte Faltung wichtig. SecB bindet an den dadurch zugänglichen maturen Teil des Proteins (de Cock *et al.*, 1992; Collier *et al.*, 1988; Gannon *et al.*, 1989; Liu *et al.*, 1989; Randall *et al.*, 1990; Randall *et al.*, 1998). Durch die große Anzahl an unterschiedlichen Liganden ist die Spezifität der Substratbindung bei hoher Affinität gering (Randall, 1995; Randall *et al.*, 1998). Die Möglichkeit, viele unterschiedliche Substrate zu binden, ist der Flexibilität der SecB-Struktur geschuldet (Dekker *et al.*, 2003). SecB kann daher auch Proteine binden, die nicht zu

seinen Substraten gehören, wenn diese ungefaltet sind. Ein versehentlicher Export wird aber durch das Fehlen der entsprechenden Signalsequenz verhindert (Hardy & Randall, 1991).

Neben SecB spielen Hitzeschockproteine (*heat shock protein*) wie DnaK/DnaJ oder GroEL/GroES eine Rolle als Chaperone bei der Sec-abhängigen Proteinsekretion (Altman *et al.*, 1991; Ito *et al.*, 1986; Wild *et al.*, 1993). Dabei können aber in Abwesenheit der eigentlich vorzugsweise genutzten Chaperone oft andere einspringen (Altman *et al.*, 1991; Müller, 1996; Randall & Hardy, 2002; Wild *et al.*, 1992; Wild *et al.*, 1993). Dadurch ist SecB kein essentielles Chaperon und Proteine, die als SecB-abhängig eingestuft sind, sind tatsächlich nicht komplett abhängig (Crane & Randall, 2017). Zum Beispiel wurde proPhoA, je nach Quelle, als SecB-abhängig (Kusukawa *et al.*, 1989) oder unabhängig (Collier *et al.*, 1988; Kumamoto & Beckwith, 1985) beschrieben. Tatsächlich nutzt proPhoA primär die Hitzeschockproteine DnaK/DnaJ als Chaperone (Wild *et al.*, 1992). In Abwesenheit von DnaK/DnaJ kann deren Funktion aber von SecB übernommen werden (Müller, 1996).

Eine weitere Aufgabe von SecB ist es, die ungefalteten Präproteine zur Translokase an der Membran zu leiten. Hierfür bindet SecB spezifisch an SecA (den Blaauwen *et al.*, 1997; Hartl *et al.*, 1990). Der Komplex aus SecB, dem gebundenen Präprotein und SecA bindet an den SecYEG-Kanal (Fekkes *et al.*, 1997; Hartl *et al.*, 1990). SecB kann dabei an cytosolisches SecA oder an bereits Membran-gebundenes SecA binden, wobei die Affinität von SecB für SecA deutlich höher ist, wenn dieses bereits an SecYEG gebunden ist (den Blaauwen *et al.*, 1997; Hartl *et al.*, 1990). Die Bindung eines Präproteins durch SecB erhöht die Affinität zusätzlich (Hartl *et al.*, 1990). Das an SecB gebundene Präprotein wird an SecA und letztendlich an SecYEG weitergegeben (Fekkes *et al.*, 1997; Hartl *et al.*, 1990). Durch die Bindung von ATP an SecA löst sich SecB wieder vom Komplex (Fekkes *et al.*, 1997).

Die ATPase SecA – Das Motorprotein des Translokons

Das *secA* Gen war das erste Gen des Sec-Systems, das identifiziert wurde (Oliver & Beckwith, 1981). SecA ist ein 102 kDa (901 Aminosäuren; UniProtKB P10408) großes Protein mit ATPase-Aktivität (Lill *et al.*, 1989), welches für den Proteinexport in Bakterien essentiell ist (Cunningham *et al.*, 1989). Es interagiert unter anderem mit Präproteinen, SecB, SecY und Phospholipiden (Crane & Randall, 2017).

SecA ist aus mehreren Domänen aufgebaut. Das N-terminale Segment besteht aus zwei Nukleotidbindedomänen, der NBD und IRA2 (*Intramolecular Regulator of ATPase 2*) bzw. NBD2, und der Präproteinbindedomäne (PBD). Das C-terminale Segment bildet die C-Domäne und besteht aus α -Helices (*Helix Scaffold Domain*, HSD). Zwei kürzere dieser Helices bilden die IRA1 (*Intramolecular Regulator of ATPase 1*) -Domäne, auch *two-helix finger* genannt (Papanikolau *et al.*, 2007). SecA ist ein sehr dynamisches Protein. Es kommt während des gesamten Translokationsprozesses zu verschiedenen Konformationsänderungen. Dadurch gibt es viele unterschiedliche SecA-Kristallstrukturen (Chen *et al.*, 2015; Crane & Randall, 2017; Papanikolau *et al.*, 2007; Zimmer *et al.*, 2008; Zimmer & Rapoport, 2009).

SecA existiert *in vivo* als Monomer und Dimer (Papanikolau *et al.*, 2007). SecB bindet an die dimere Form von SecA. Wann SecA während der Translokation als Monomer oder Dimer vorliegt und wodurch der Übergang zwischen den beiden Quartärstrukturen ausgelöst wird, wird diskutiert. Es gibt Hinweise darauf, dass SecA als Dimer an SecYEG bindet (Chatzi *et al.*, 2014; Geyter *et al.*, 2019). Während des Translokationsprozesses scheint SecA abhängig vom ATP-Hydrolyse-Zyklus zwischen monomerer und dimerer Form zu wechseln oder, je nach Substrat, komplett vom SecYEG-Komplex zu dissoziieren (Sanganna Gari *et al.*, 2019).

Sekretorische Präproteine müssen für den Export zum SecYEG-Translokon geleitet werden. Sie binden dafür mit oder ohne Hilfe von Chaperonen an freies im Cytoplasma vorliegendes oder an bereits SecY-gebundenes SecA (Chatzi *et al.*, 2014). Etwa die Hälfte von SecA liegt frei im Cytoplasma vor, die andere Hälfte ist mit der inneren Membran assoziiert (Cabelli *et al.*, 1991). Die Präproteine werden von SecA sowohl über die Signalsequenz als auch durch Interaktion mit dem murenen Teil des Proteins gebunden (Chatzi *et al.*, 2014; Papanikou *et al.*, 2005). Wichtig für die Substraterkennung ist die PBD (Papanikou *et al.*, 2005). Wie oben beschrieben werden Präproteine, die zur Aggregation oder schnellen Faltung neigen, zuerst von SecB gebunden und erst später an SecA weitergegeben. Die Affinität des SecB-Präprotein-Komplexes ist für membrangebundenes SecA höher als für cytoplasmatisches (Hartl *et al.*, 1990). Nach der Bindung des SecA-SecB-Präprotein-Komplexes an das Translokon wird das Präprotein an SecA weitergegeben (Fekkes *et al.*, 1997; Hartl *et al.*, 1990).

Im Anschluss an die Bindung des Präproteins an SecA kommt es zu ersten Konformationsänderungen und ATP wird gebunden (Fekkes *et al.*, 1997). Die Mononukleotid-Bindestelle befindet sich zwischen den Domänen NBD1 und IRA2, die ATP zwischen sich

einklemmen (Chatzi *et al.*, 2014; Papanikolau *et al.*, 2007). Die PDB-Domäne unterliegt großen Konformationsänderungen (Chen *et al.*, 2015; Zimmer *et al.*, 2008; Zimmer & Rapoport, 2009). Einzelmolekül-FRET (*Förster resonance energy transfer*)-Experimente haben gezeigt, dass sich die PDB in Abhängigkeit des ATP-Bindezustands bewegt (Ernst *et al.*, 2018) und so der Translokationsprozess initiiert wird (Chatzi *et al.*, 2014; Gold *et al.*, 2013). Nach der Initiation der Translokation muss die PDB keine weiteren Konformationsänderungen mehr leisten (Gold *et al.*, 2013). Nach der Aktivierung der ATPase erfüllt SecA seine Aufgabe als Motorprotein und stellt Energie für die Translokation bereit (Lill *et al.*, 1989). Durch mehrere ATP-Binde- und -Hydrolyse-Zyklen kommt es durch weitere große Konformationsänderungen zur Bewegung von SecA-Domänen und der Translokation des Präproteins in mehreren Schritten (Crane & Randall, 2017; Papanikolau *et al.*, 2007; Schiebel *et al.*, 1991). Auch die *two-helix-finger*-Domäne bewegt sich und schiebt sich immer wieder in den Eingang des SecY-Kanals (Zimmer *et al.*, 2008). Da sie mit dem translozierenden Präprotein interagiert, wäre es möglich, dass diese Bewegung das Präprotein Stück für Stück in den Kanal schiebt (Catipovic *et al.*, 2019; Erlandson *et al.*, 2008). Pro ATP-Binde- und Hydrolysezyklus werden etwa 30 Aminosäuren transloziert (Geyter *et al.*, 2019). Da die Beweglichkeit der *two-helix-finger*-Domäne aber nicht essentiell für die Translokation von Präproteinen ist, kann dies zumindest nicht allein die treibende Kraft sein (Whitehouse *et al.*, 2012). Im Gegensatz zu dieser sogenannten *Power stroke* Theorie steht das *Brownian ratchet* Modell (Allen *et al.*, 2016; Corey *et al.*, 2019) zur Diskussion, wobei die Diffusion des Präproteins durch die Brownsche Molekularbewegung in den Kanal ausschlaggebend ist. Die Diffusion wird durch SecA unterstützt, indem es den Kanal öffnet und das Zurückrutschen des Polypeptids verhindert. Bauer *et al.* (2014) schlagen eine Mischung der beiden Modelle vor. Der genaue Mechanismus ist aber noch zu klären (Allen *et al.*, 2016; Bauer *et al.*, 2014; Chatzi *et al.*, 2014; Kuhn & Dalbey, 2016).

SecA-abhängiges Targeting

Die meisten der ungefähr 600 sekretorischen Proteine, die nicht so stark zur Aggregation neigen wie Membranproteine, werden posttranslational mithilfe von SecA oder SecB zum Translokation geleitet (Abbildung 3B; Koch *et al.*, 1999; Steinberg *et al.*, 2018). Die Signalsequenzen (Leader-Peptide) dieser Proteine sind weniger hydrophob als die der Proteine, welche durch SRP erkannt werden (Beck *et al.*, 2000; Valent *et al.*, 1995). Außerdem weisen sie eine Proteaseschnittstelle auf, an der die Signalsequenz nach der Translokation im

Periplasma abgeschnitten wird. Diese Prozessierung erfolgt durch die Signalpeptidase (Leaderpeptidase; Lep), die in der inneren Membran verankert ist (Steinberg *et al.*, 2018). Neben der Signalsequenz selbst besitzt auch der mature Teil des Präproteins *Targeting*-Signale (Chatzi *et al.*, 2017).

Nach der vollständigen Translation des Proteins bindet dieses entweder direkt an SecA oder wird vom Chaperon SecB gebunden und zu SecA weitergeleitet und so zur Membran gebracht (Alami *et al.*, 2007; Steinberg *et al.*, 2018; Zimmer *et al.*, 2008). Mithilfe der Energie aus der protonenmotorischen Kraft (*proton motive force*, PMF) und durch mehrere ATP-Hydrolyseschritte wird das Protein Stück für Stück durch den SecYEG-Kanal transloziert (Karamanou *et al.*, 1999; Knyazev *et al.*, 2018; Tomkiewicz *et al.*, 2006).

Inzwischen gibt es einige Erkenntnisse, die zeigen, dass SecA auch cotranslational mit RNCs interagiert (Abbildung 3B). In diesem Fall ist SecA noch nicht an SecYEG gebunden. Ob die anschließende Translokation co- oder posttranslational abläuft, ist noch nicht geklärt (Chun & Randall, 1994; Huber *et al.*, 2011; Huber *et al.*, 2017; Karamyshev & Johnson, 2005; Knüpffer *et al.*, 2019; Origi *et al.*, 2019). Auch beim *Targeting* und der Insertion von einigen Membranproteinen spielt SecA eine Rolle (Deitermann *et al.*, 2005; Rawat *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017). So wird YidC zwar abhängig von SRP an die Membran geleitet, für die Insertion ist aber aufgrund der großen periplasmatischen Domäne von YidC SecA als Energielieferant nötig (Deitermann *et al.*, 2005; Koch *et al.*, 2002; Welte *et al.*, 2012). Ähnlich sieht es bei der Insertion der Signalpeptidase aus. Das zweispännige Membranprotein besitzt eine große periplasmatische Domäne am C-Terminus (Uniprot P00803), deren Translokation abhängig von der SecA-ATPase ist (Wolfe *et al.*, 1985).

1.1.2 SecYEG – Der Kernkomplex des Sec-Translokons

Nach dem *Targeting* der Präproteine an die Membran müssen diese über die Membran transloziert oder in die Membran eingebaut werden. Dazu müssen hydrophile Bereiche der Proteine die hydrophobe Barriere des Membraninneren und hydrophobe Protein-Segmente die hydrophile Membranschicht der Phospholipid-Kopfgruppen überwinden. Das Heterotrimer SecYEG, ein stark konservierter stabiler Komplex, bildet den Kernkomplex des Translokons.

SecY bildet den Transportkanal

Der *E. coli* Protein-Translokations-Kanal ist aus drei integralen Membranproteinen aufgebaut: SecY, SecE und SecG (Ito *et al.*, 1983; Nishiyama *et al.*, 1994; Riggs *et al.*, 1988). Das ubiquitär in Prokaryonten vorhandene SecY wurde 1984 identifiziert (Ito, 1984) und ist ein stark hydrophobes Protein mit einem Molekulargewicht von 48 kDa und einer Länge von 443 Aminosäuren (UniProtKB P0AGA2). Es besteht aus zehn transmembranen α -Helices, wobei der C- und N-Terminus auf der cytosolischen Seite der Membran liegen (Abbildung 5). Unterteilt wird SecY in eine N- und eine C-terminale Domäne (Transmembranhelices 1-5 und Transmembranhelices 6-10). Die beiden Domänen sind über einen periplasmatischen Loop zwischen dem fünften und sechsten transmembranen Segment, der wie eine Art Gelenk die beiden Hälften zueinander flexibel werden lässt, verbunden. Die beiden Hälften stehen sich gegenüber, wodurch sich in der Mitte eine Pore bildet (Frauenfeld *et al.*, 2011; van den Berg *et al.*, 2004). Durch diese 16-22 Å enge Pore kann das Substrat die Membran durchqueren bzw. in die Membran inserieren (Cannon *et al.*, 2005; Geyter *et al.*, 2019). SecE, das wie eine molekulare Klammer wirkt, hält die beiden SecY Domänen zusammen (Frauenfeld *et al.*, 2011). In *E. coli* besitzt SecE drei transmembrane Segmente und hat ein Molekulargewicht von 14 kDa (UniProtKB P0AG96). SecG, welches mit einem Molekulargewicht von 11 kDa zwei Transmembrandomänen besitzt (UniProtKB P0AG99), ist peripher am Komplex lokalisiert (van den Berg *et al.*, 2004). Bei der Reinigung von SecY werden SecE und G co-gereinigt (Brundage *et al.*, 1990; Homma *et al.*, 1997). Der SecY-Kanal ist wie eine Sanduhr geformt: Auf der cytosolischen Seite ist der Kanal wie ein umgekehrter Trichter geformt und verjüngt sich in der Mitte zu einem engen Ring, der aus sechs hydrophoben Aminosäuren (in *E. coli*: Isoleucin) an den Transmembrandomänen (TM) 2a, 5, 7 und 10 besteht. Auf der periplasmatischen Seite zeigt die Struktur eine Aushöhlung, die durch die SecY-Helix 2a, die in die Trichter-ähnliche Aushöhlung geknickt wird, geschlossen wird (Frauenfeld *et al.*, 2011; van den Berg *et al.*, 2004). Dieser *plug* (*plug*, Stopfen) sowie die Verengung in der Mitte des Kanals verschließen diesen und verhindern den Verlust von kleinen Molekülen wie Wasser und Ionen (Li *et al.*, 2007; Saparov *et al.*, 2007; van den Berg *et al.*, 2004). Außerdem zeigt die Kristallstruktur von Tanaka *et al.* (2015), dass ein cytoplasmatischer Loop von SecG die Pore zusätzlich auf der cytoplasmatischen Seite verschließt. Es wird angenommen, dass der *plug* bei Beginn der Translokation den Kanal frei gibt und dieser somit geöffnet ist (Bondar *et al.*, 2010; Robson *et al.*, 2009; Tam *et al.*, 2005; van den Berg *et al.*, 2004). Der Kanal sowie der *plug* sind in der

Kristallstruktur von *M. jannaschii* (van den Berg *et al.*, 2004) sehr schön zu erkennen (Abbildung 6). Außerdem kommt es zu weiteren Konformationsänderungen in SecY, was letztendlich dazu führt, dass der hydrophobe Ring leicht geöffnet wird und das sekretorische Protein durch die Pore hindurch passt. (van den Berg *et al.*, 2004). Vier der sechs hydrophoben Reste des Rings interagieren mit dem translozierenden Protein. Der Ring wirkt also wie eine Dichtung und die Pore bleibt für andere Moleküle verschlossen (Tsukazaki, 2019). Es wird angenommen, dass die Schließung des Kanals am Ende der Translokation unter anderem von der Spannung, also vom Membranpotential, abhängt und dabei die TM2b als Teil eines Spannungssensors eine Rolle spielt (Knyazev *et al.*, 2020).

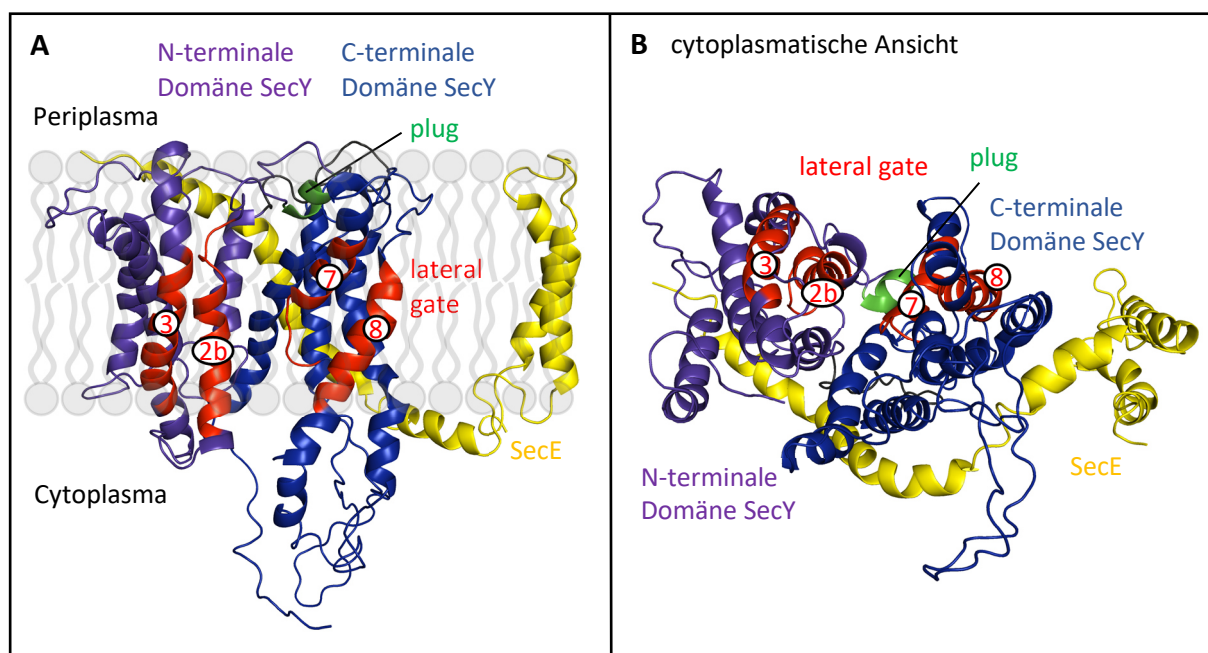


Abbildung 5: Kristallstruktur von *E. coli* SecYE (PDB 3J01; Frauenfeld *et al.*, 2011). Die Kristallstruktur zeigt SecYE (A) aus Sicht der Membran und (B) vom Cytoplasma aus betrachtet. Die Domänen wurden nach Angaben von UniProtKB - P0AGA2 angefärbt. SecY wird in eine N-terminale (TM 1-5, violett) und eine C-terminale Domäne (TM 6-10, blau) unterteilt, die in ihrer Mitte einen Kanal bilden. SecE (gelb) umschließt die beiden Hälften wie eine Klammer. Der Kanal wird unter anderem durch einen beweglichen *plug*, die SecY-Helix 2a (grün), verschlossen. Um Proteine in die Membran entlassen zu können, bilden die TM 2b, 3, 7 und 8 eine Öffnung in Richtung Lipidbilayer, das *lateral gate* (rot).

Neben der Translokation von Proteinen über die Membran können Proteine mit hydrophoben Transmembransegmenten mithilfe von SecYEG auch in die Membran eingebaut werden. Hydrophobe Regionen in Präproteinen können als Stop-Transfer-Sequenzen wirken und einen Translokationsarrest und die laterale Freisetzung aus dem Kanal verursachen (Duong, 1998; Sääf *et al.*, 1998a) Die Freisetzung in die Membran wird durch das *lateral gate* ermöglicht, welches sich durch Konformationsänderungen in Richtung Membranbilayer öffnet.

SecY hat neben SecE und SecG noch viele weitere Interaktionspartner. Dazu gehören unter anderem SecF, SecA, YajC, YidC, FtsY und RNCs (Crane & Randall, 2017; Petriman *et al.*, 2018; Steinberg *et al.*, 2018). Dies spiegelt das komplexe Zusammenspiel vieler Proteine im Sec-Translokation wider.

Das 'lateral gate' von SecY

Nachdem das naszierende Membranprotein mit dem Ribosom zum Translokation gebracht wurde, müssen die periplasmatischen Segmente über die Membran transloziert und die Transmembrandomänen in die Membran inseriert werden. Die hydrophilen

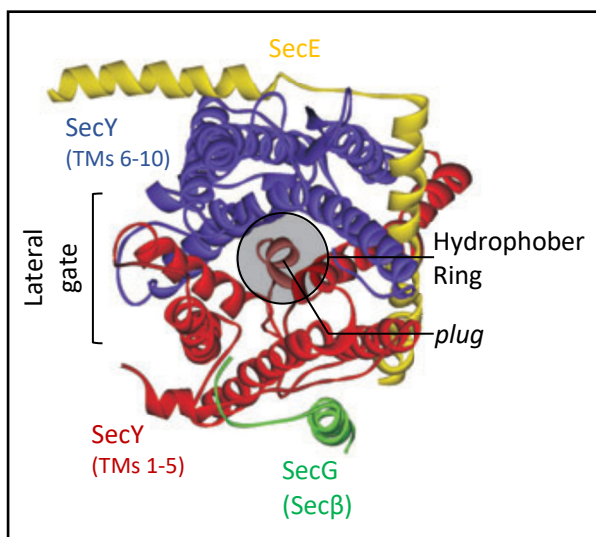


Abbildung 6: Kristallstruktur des SecYEF-Kanals von *M. jannaschii*. In der Struktur von *M. jannaschii* (Archaeon) aus Sicht des Cytoplasmas ist zwischen der N- (rot) und C- (blau) terminalen Hälfte von SecY der Kanal, der gebildet wird, gut zu erkennen. Der hydrophobe Ring in der Mitte des Kanals ist angedeutet. In dieser Struktur ist der *plug*, der den Kanal verschlossen hält, sehr schön zu sehen. Im Gegensatz zur *E. coli* Struktur (Abbildung 5) ist hier nicht nur SecE (gelb), sondern auch Secβ (grün; SecG Analog) dargestellt. Das *lateral gate* ist in dieser Struktur geschlossen. (Struktur: van den Berg *et al.*, 2004; Abbildung abgewandelt aus Driessen & Nouwen, 2008).

periplasmatischen Bereiche nutzen zum Passieren der hydrophoben Membran den hydrophilen Bereich im SecY-Kanal (Park *et al.*, 2014). Die hydrophoben Transmembransegmente dagegen müssen lateral in die Membran entlassen werden. Sie interagieren mit den Helices des sogenannten *lateral gates* von SecY, durch welches sie vermutlich in die Membran eingebaut werden (Hizlan *et al.*, 2012; Jomaa *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2014; van den Berg *et al.*, 2004). Das *lateral gate* wird durch eine Öffnung des Kanals in Richtung Membranbilayer zwischen den SecY-Transmembrandomänen 2b, 3, 7 und 8 gebildet (Abbildung 5; Frauenfeld *et al.*, 2011; Reithinger *et al.*, 2014; Tsukazaki *et al.*, 2008; van den Berg *et al.*, 2004).

Wie genau die Transmembrandomänen das Translokation verlassen, ist nicht vollständig geklärt. Einige mehrspännige Membranproteine verlassen das Translokation der Reihe nach (Houben *et al.*, 2004), andere paarweise (Hou *et al.*, 2012; Öjemalm *et al.*, 2012). Die Faltung der Membranproteine findet erst nach Verlassen des Translokations statt. SecY inseriert je nach Substrat die Membranproteine in Kooperation mit YidC. Dieses steht in Kontakt mit dem

lateral gate und übernimmt vermutlich die Transmembrandomänen von SecY, um die korrekte Faltung des Membranproteins zu unterstützen (Kuhn *et al.*, 2017a).

In verschiedenen Kristallstrukturen zeigt sich, dass das *lateral gate* je nach Zustand geschlossen (Abbildung 6; van den Berg *et al.*, 2004), halb geöffnet (Hizlan *et al.*, 2012) oder geöffnet (Abbildung 5; Egea & Stroud, 2010; Frauenfeld *et al.*, 2011; Jomaa *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2014) ist. Unter anderem das Binden von Ribosomen an das Translokon (Ge *et al.*, 2014), vor allem aber die naszierende Polypeptidkette (Kater *et al.*, 2019; Park *et al.*, 2014) und das Binden der hydrophoben Signalsequenz an das *lateral gate* (Ge *et al.*, 2014; Egea & Stroud, 2010; Hizlan *et al.*, 2012; Jomaa *et al.*, 2016) führen zum Öffnen des *gates*. Durch die Gelenk-Funktion der TM5-TM6-Verbindung können sich die beiden SecY-Hälften auseinander bewegen und das *lateral gate* öffnen (Park *et al.*, 2014; van den Berg *et al.*, 2004). Dabei bewegen sich Helix 2b und 7 von etwa 7 Å (van den Berg *et al.*, 2004) bis 15 Å (Allen *et al.*, 2016) im geschlossenen Zustand über 18 Å (halboffen; Allen *et al.*, 2016) auf ca. 24-26 Å (Allen *et al.*, 2016; Frauenfeld *et al.*, 2011) im geöffneten Zustand auseinander.

Neuere Studien deuten darauf hin, dass die Insertion durch SecY eventuell gar nicht im Kanal beginnt, sondern direkt am *lateral gate* stattfindet. Das heißt, das *lateral gate* stellt eine Kavität dar, die im Inneren hydrophile Bereiche des Substrats aufnehmen und weiter außen hydrophobe TM binden kann, ohne dass das Substrat den eigentlichen Kanal benutzt. Der Insertionsprozess wäre dem von YidC ähnlich (Ito *et al.*, 2019).

Nicht nur bei der Insertion von Membranproteinen spielt das *lateral gate* eine wichtige Rolle. Auch bei der Translokation sekretorischer Proteine wird das *lateral gate* geöffnet, um den Kanal zu vergrößern (Crane & Randall, 2017; du Plessis *et al.*, 2009; Egea & Stroud, 2010) und weitere Konformationsänderungen herbeizuführen (du Plessis *et al.*, 2009). Die Signalsequenz der sekretorischen Proteine bindet dabei ebenfalls außen an die Helices des *lateral gates*, während der hydrophile Bereich des Proteins die hydrophile Umgebung der Pore nutzt, um die Membran zu überqueren (Park *et al.*, 2014; Plath *et al.*, 1998). Dies wird auch durch eine neuere Cryo-EM-Struktur von aktivem SecA-SecY mit einem translozierenden Substrat dargestellt (Ma *et al.*, 2019). Es gibt einige Hinweise darauf, dass für die Konformationsänderungen, die zur Öffnung des *lateral gates* führen, auch die Bindung von SecA an SecY (Zimmer *et al.*, 2008) bzw. die Bindung von ATP an SecA (Allen *et al.*, 2016) eine

Rolle spielt. Gleichzeitig ist das Öffnen des *lateral gates* wichtig für die Aktivierung der ATPase. Die beiden Prozesse bedingen sich also gegenseitig (Allen *et al.*, 2016; du Plessis *et al.*, 2009). Neben der Öffnung des *lateral gates* ist das Weiten des hydrophoben Rings in der Mitte des Kanals und das Freigeben des Kanals durch den *plug* von großer Bedeutung. Die Konformationsänderungen hängen zusammen und beeinflussen sich gegenseitig (du Plessis *et al.*, 2009; Egea & Stroud, 2010; Hizlan *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2014).

SecYEG Oligomerisierung

SecYEG kommt sowohl als Monomer als auch in dimerer Form vor. Außerdem gibt es Hinweise auf Oligomere, die aus mehr als zwei SecYEG Protomeren bestehen (Manting *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 1999). *In vivo* existieren zwei unterschiedliche Dimere von SecYEG (Park & Rapoport, 2012; Zheng *et al.*, 2016): Beim *front-to-front* Dimer treffen die beiden *lateral gates* aufeinander, wodurch eventuell eine größere Pore entstehen könnte. Das *back-to-back* Dimer ist über die SecE-Proteine auf der Rückseite der beiden SecY-Monomere verbunden (Mitra *et al.*, 2005; 2006).

Ob SecYEG als Monomer oder als Dimer aktiv ist, wird kontrovers diskutiert, da es viele verschiedene Studien mit teils widersprüchlichen Ergebnissen gibt. Hinweise gibt es sowohl für die monomere (Kedrov *et al.*, 2011; Ménétret *et al.*, 2007; Park & Rapoport, 2012) als auch für die dimere (Dalal *et al.*, 2012; Osborne & Rapoport, 2007; Scheuring *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2016) Form. Anzumerken ist, dass der Kanal von einem einzigen SecYEG Protomer gebildet wird (Frauenfeld *et al.*, 2011; van den Berg *et al.*, 2004). Im Falle des Dimers stellt sich außerdem die Frage, welche Dimer-Form aktiv ist. Auch hier gibt es sowohl für das *front-to-front* (Mitra *et al.*, 2005) als auch für das *back-to-back* (Deville *et al.*, 2011) Dimer Anhaltspunkte. Es hat sich außerdem gezeigt, dass, auch wenn das Dimer vorliegt, trotzdem nur eines der beiden Protomere aktiv ist, solange das andere inaktiv bleibt (Hizlan *et al.*, 2012; Osborne & Rapoport, 2007). Welche Rolle dabei das passive Protomer spielt, ist ebenfalls nicht geklärt. Die vielen unterschiedlichen Ergebnisse lassen vermuten, dass SecYEG sowohl als Monomer und als auch als Dimer in beiden Formen (*front-to-front/ back-to-back*) aktiv sein kann. Der oligomere Zustand ist wahrscheinlich von verschiedenen Faktoren wie dem Substrat, den beteiligten Liganden und dem Fortschritt des Prozesses abhängig (Boy & Koch, 2009; Deville *et al.*, 2011; Ménétret *et al.*, 2007; Scheuring *et al.*, 2005). Zwischen monomerem und dimerem SecYEG besteht also ein Gleichgewicht (Sanganna Gari *et al.*, 2013), welches von

den verschiedenen Interaktionspartnern beeinflusst wird (Scheuring *et al.*, 2005). Auch hier zeigt sich wieder die Dynamik und Komplexität des Sec-Systems und, dass es auch an dieser Stelle noch einige Fragen zu klären gibt.

Sec-Homologe finden sich in allen Reichen des Lebens

Die Sec-Translokase ist hoch konserviert über alle drei Reiche des Lebens. Dies lässt auf eine ähnlich Funktionsweise der Homologen schließen und unterstreicht die Wichtigkeit des Sec-Systems.

Im Reich der Prokaryonten ist SecYEG nicht nur in der inneren Membran von Gram-negativen Bakterien wie *E. coli*, sondern auch in den Gram-positiven zu finden. In manchen Gram-positiven Bakterien wurde neben dem üblichen (Suh *et al.*, 1990) sogar ein zusätzliches Sec-System entdeckt. Dieses weist ein zweites SecA (SecA2) und in manchen Fällen auch ein weiteres SecY (SecY2) auf (Prabudiansyah & Driessen, 2017). In Cyanobakterien wurden SecYEG Homologe nicht nur in der Cytoplasmamembran, sondern auch in der Thylakoidmembran nachgewiesen (Nakai *et al.*, 1992; M. Nakai *et al.*, 1993).

In Eukaryonten wurde zunächst im Endoplasmatischen Retikulum der Hefe (Deshaies & Schekman, 1987; Hartmann *et al.*, 1994), später auch in Säugetierzellen (Görllich & Rapoport, 1993; Hartmann *et al.*, 1994), das SecYEG Homolog Sec61 $\alpha\beta\gamma$ entdeckt. Ebenfalls in Hefen wurde neben Sec61 noch ein weiteres Homolog, Ssh1 (*Sec sixty-one homolog 1*), gefunden. Ssh1 ist nicht essentiell und fungiert möglicherweise als *back-up*-System für Sec61 (Finke *et al.*, 1996; Robb & Brown, 2001).

In der Thylakoidmembran von Chloroplasten sind Komponenten des Sec-Translokons (Sec1) schon länger bekannt (Hartmann *et al.*, 1994; Laidler *et al.*, 1995; Scaramuzzi *et al.*, 1992; Schuenemann *et al.*, 1999b). Inzwischen wurde aber auch in der inneren Membran von Chloroplasten ein weiteres Sec Homolog (Sec2) identifiziert (Day & Theg, 2018; Li *et al.*, 2015; Skalitzky *et al.*, 2011). Es wird angenommen, dass Sec2 sowohl Proteine, die Zellkern-codiert sind, als auch solche, die in den Chloroplasten selbst synthetisiert werden, in die innere Chloroplastenmembran inseriert. Vor ihrer Insertion werden die Zellkern-codierten Proteine mithilfe des TOC/TIC (*translocon on the outer/inner chloroplast membrane*)-Systems aus dem Cytosol in die Chloroplasten transportiert (Fernandez, 2018).

Auch die meisten mitochondrialen Proteine werden an cytosolischen Ribosomen synthetisiert und müssen anschließend über oder in die äußere und innere Mitochondrienmembran transportiert werden. Dies geschieht in den meisten Fällen aber nicht über ein Sec-System, sondern vor allem über den TOM/TIM (*translocase of the outer/inner membrane*)-Komplex (Hansen & Herrmann, 2019). Es wird vermutet, dass SecY in Mitochondrien evolutionär durch TIM ersetzt wurde und die beiden Systeme nur noch in wenigen Beispielen coexistieren (Tong *et al.*, 2011). Bisher konnte nur im mitochondrialen Genom von einigen Pflanzenarten der Jakobia, die zu den Asternartigen gehören, mitochondriales SecY identifiziert werden (Burger *et al.*, 2013; Lang *et al.*, 1997; Petrů *et al.*, 2018; Tong *et al.*, 2011).

Mit SecYEß ist auch im Reich der Archaeen ein SecYEG Homolog vorhanden (Arndt, 1992; Auer *et al.*, 1991; Bondar *et al.*, 2010; Hartmann *et al.*, 1994; Kath & Schäfer, 1995; Kinch *et al.*, 2002; van den Berg *et al.*, 2004).

SecY im Labor

Bei den Experimenten mit SecY muss beachtet werden, dass SecY in SDS-Gelen niedriger läuft (~35 kDa) als das Molekulargewicht von 48 kDa vermuten lässt. Eventuell ist dies auf ein übermäßiges Binden von SDS durch das stark hydrophobe Protein zurückzuführen (Ito, 1984; Rath *et al.*, 2009).

Außerdem wird SecY von der periplasmatischen Protease OmpT geschnitten, was bei der Reinigung beachtet werden muss. OmpT (Protease VII) ist eine Protease, die mit der äußeren Membran von *E. coli* assoziiert ist (OmpT = *outer membrane-associated protease T*) und Proteine spezifisch zwischen zwei aufeinanderfolgenden basischen Aminosäuren schneidet (Baneyx & Georgiou, 1990; Sugimura & Higashi, 1988). SecY wird von OmpT in der cytoplasmatischen Domäne 4 (C4) zwischen den beiden Argininresten 255 und 256 geschnitten (du Plessis *et al.*). Beim Abbau von SecY *in vitro* entsteht ein N-terminales Fragment, das auf SDS-Gelen auf Höhe von 22 kDa erscheint (Akiyama & Ito, 1990). Bei der Reinigung von SecY muss daher ein OmpT-Deletionsstamm verwendet werden. Durch PMSF und viele andere Proteaseinhibitoren wird OmpT nicht inaktiviert (Sugimura & Higashi, 1988).

Weitere Sec-Proteine: SecDFYajC

Der heterotrimere Komplex SecDFYajC ist Teil des Sec-Translokons. Dabei stehen SecF und YajC in direktem Kontakt zu SecY. Weitere Interaktionen gibt es zwischen SecD und SecF sowie YidC. (Crane & Randall, 2017).

Für *E. coli* SecD und SecF stehen noch keine Kristallstrukturen zur Verfügung. Um den Aufbau zu betrachten, kann die Kristallstruktur aus *Thermus thermophilus* (Abbildung 7; PDB 3AQO/3AQP/2RRN; Tsukazaki *et al.*, 2011) herangezogen werden. SecDF ist in Bakterien und Archaeen konserviert (Eichler, 2003). In manchen Bakterien wie in *T. thermophilus* wird SecDF

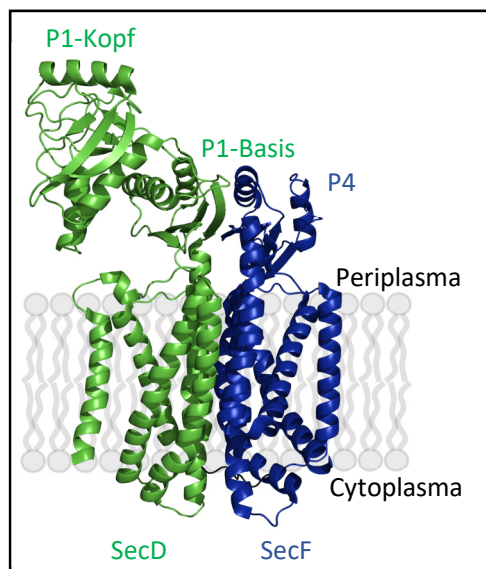


Abbildung 7: Kristallstruktur von SecDF in F-Form aus *T. thermophilus* (PDB 3AQP; Tsukazaki *et al.*, 2011). Die Tt-SecDF-Struktur besteht aus zwölf TMs und den beiden periplasmatischen Domänen P1 und P4. Die P1-Domäne kann außerdem in die Basis- und die flexible Kopf-Domäne unterteilt werden. Die N-terminale Domäne (grün; TM 1-6) entspricht dem *E. coli* SecD, die C-terminale Domäne (blau; TM 7-12) *E. coli* SecF.

als ein Membranprotein, welches aus zwölf Transmembrandomänen und zwei großen periplasmatischen Domänen (P1 und P4) besteht, exprimiert (Tsukazaki *et al.*, 2011). In *E. coli* sind SecD (66,6 kDa) und SecF (35,4 kDa) zwei einzelne Proteine, die jeweils aus sechs transmembranen Helices bestehen und je eine große periplasmatische Domäne besitzen (Crane & Randall, 2017). In der *T. thermophilus* (Tt) Struktur zeigt sich, dass die N- und die C-terminalen Hälften, welche in *E. coli* SecD und SecF entsprechen, in einer pseudo-symmetrischen Form angeordnet sind (Tsukazaki *et al.*, 2011). Die große periplasmatische Domäne P1 entspricht in *E. coli* der periplasmatischen Domäne von SecD (Crane & Randall, 2017). P1 kann in zwei Subdomänen, die Basis- und die Kopf-Domäne, unterteilt werden. Die P1-Basis-Domäne ist strukturell homolog zur P4-Domäne. Die P1-Kopf-

Domäne ist beweglich und kann sich um 120° in Richtung Periplasma drehen. Hieraus geben sich zwei wichtige Konformationen von SecDF, die F- (Drehung Richtung Membran) und die I- (Drehung Richtung Periplasma) Form (Tsukazaki *et al.*, 2011). In späteren Kristallstrukturen zeigte sich noch eine weitere Konformation, die Super-F-Form, bei der die P1-Kopf-Domäne noch weiter Richtung Membran gedreht ist (Furukawa *et al.*, 2018). Der Wechsel zwischen den

Konformationen ist für die Funktionalität von großer Bedeutung (Tsukazaki *et al.*, 2011). Eine weitere SecDF Struktur aus *Deinococcus radiodurans* lässt erkennen, dass SecDF in der I-Form einen Tunnel bilden kann, der Protonen transportieren könnte, was durch einen konservierten Asp-Rest in der TM-Region reguliert wird (Furukawa *et al.*, 2017). Weitere konservierte geladen Aminosäurereste in den Transmembranhelices sind ebenfalls essentiell für die SecDF-Funktionalität (Tsukazaki *et al.*, 2011). Außerdem konnte gezeigt werden, dass strukturelle Bewegungen in der TM-Region mit Konformationsänderungen in den periplasmatischen Domänen zusammenhängen (Furukawa *et al.*, 2018).

In *E. coli* formt SecDF einen stabilen Komplex mit dem nicht essentiellen YajC (Pogliano & Beckwith, 1994b; Tsukazaki *et al.*, 2011). YajC ist nur 11,9 kDa (110 Aminosäuren) groß und besitzt nur eine einzige Transmembrandomäne (UniProt P0ADZ7).

SecDF ist zwar nicht essentiell, steigert aber die Translokationseffizienz (Pogliano & Beckwith, 1994a). Trotzdem ist die Funktion des Komplexes beziehungsweise der genaue Mechanismus noch nicht abschließend geklärt. Es wird vermutet, dass SecDF die Proteinsekretion unterstützt, indem es das Präprotein angetrieben durch die Energie aus der PMF auf der periplasmatischen Seite herauszieht (Furukawa *et al.*, 2017, 2018; Tsukazaki *et al.*, 2011).

Die verschiedenen Kristallstrukturen und weitere Analysen ergaben wichtige Hinweise auf die SecDF Funktion und den Mechanismus dahinter: (a) SecDF nutzt die Energie aus der PMF und leitet über die TM-Region abhängig von der Anwesenheit eines ungefalteten Proteins Protonen, wobei die konservierten geladenen Aminosäuren in der TM-Region und die Flexibilität der P1-Domäne eine wichtige Rolle spielen (Tsukazaki *et al.*, 2011; Furukawa *et al.*, 2017); (b) Die P1-Kopf-Domäne besitzt eine Präprotein-bindende Kavität, die mit ungefalteten Präproteinen interagiert (Tsukazaki *et al.*, 2011; Furukawa *et al.*, 2017); (c) SecDF durchläuft mehrere Konformationsänderungen, die essentiell für seine Funktion sind und mit dem Protonentransport zusammenhängen (Furukawa *et al.*, 2017; Tsukazaki *et al.*, 2011).

Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse wird von Furukawa *et al.* (2017) und Tsukazaki (2018) ein möglicher Mechanismus vorgeschlagen: Die Präprotein-bindende Kavität der P1-Kopf-Domäne interagiert in der Super-F-Form mit dem Präprotein, das auf der periplasmatischen Seite den SecY-Kanal verlässt. Durch eine Konformationsänderung zur I-Form wird das Präprotein aus dem Kanal gezogen. Dabei entsteht außerdem der oben genannte Tunnel, durch den Protonen durch die Membran hindurchgeleitet werden. Das Präprotein löst sich

von der P1-Bindestelle, der Protonentunnel schließt sich und SecDF kehrt in die Super-F-Form zurück, um mit dem nächsten Teil des Präproteins zu interagieren. Durch mehrere Zyklen dieser durch die PMF angetriebenen Konformationsänderungen wird die Translokation beendet. Möglicherweise zieht SecDF das Präprotein nicht aktiv aus dem SecY-Kanal, sondern verhindert nur ein Zurückrutschen (Botte *et al.*, 2016; Tsukazaki *et al.*, 2011). Um die Funktion von SecDF im Proteinexport abschließend zu klären, werden weitere strukturelle und funktionelle Analysen benötigt.

Die Funktion von YajC ist bisher ungeklärt. Es ist in *E. coli* nicht essentiell (Pogliano & Beckwith, 1994b) und ist nicht in allen Prokaryonten vorhanden (Crane & Randall, 2017). Da YajC in einem 5-10-fachen Überschuss zu SecDF vorkommt (Pogliano & Beckwith, 1994b), erfüllt es möglicherweise Aufgaben unabhängig vom Proteinexport (Crane & Randall, 2017).

Neben der Interaktion mit dem Sec-Translokon interagiert SecDFYajC auch mit YidC (Xie *et al.*, 2006; Nouwen & Driessen, 2002). Diese Interaktion spielt eine Rolle bei der Sec-abhängigen YidC-Insertion von Membranproteinen (Chen *et al.*, 2005; Nouwen & Driessen, 2002). SecDFYajC verbindet YidC mit SecY und bildet das sogenannte Holotranslokon (Botte *et al.*, 2016; Komar *et al.*, 2016; Schulze *et al.*, 2014).

1.1.3 Die YidC-Insertase

Die *E. coli*-Membraninsertase YidC ist Teil der YidC/Oxa/Alb-Familie und verantwortlich für die Insertion von vielen Membranproteinen (Samuelson *et al.*, 2000). Kleine ein- oder zweispännige Membranproteine kann YidC eigenständig inserieren, mehrspännige YidC-abhängige Membranproteine werden in Kooperation mit der Sec-Translokase in die Membran integriert (Chen *et al.*, 2002b; Petriman *et al.*, 2018; Sachelaru *et al.*, 2017; Samuelson *et al.*, 2000; Scotti *et al.*, 2000). YidC bindet ungefaltete Substratproteine und unterstützt ihren Einbau und ihre Faltung in die innere Membran. Wird YidC depletiert, werden Chaperone wie DnaK, PpiD und GroEL hochreguliert (Wickström *et al.*, 2011). Eingebaut in die Membran wird YidC über das SRP-abhängige *Targeting* und in Abhängigkeit von der Sec-Translokase. Auch YidC selbst scheint eine Rolle bei seiner eigenen Insertion zu spielen. Für die Translokation der großen periplasmatischen Domäne ist die YidC-Insertion auch von SecA abhängig (Koch *et al.*, 2002; Urbanus *et al.*, 2002).

Die Struktur von *E. coli* YidC

Nach der Identifizierung von YidC als Teil des Membranprotein-Insertionsprozesses (Samuelson *et al.*, 2000) wurden zahlreiche Studien zu Struktur und Funktion der Insertase durchgeführt. Kumazaki *et al.* (2014b) lösten die Kristallstruktur von *E. coli*-YidC ohne die erste Transmembrandomäne (Abbildung 8) und gaben damit tiefere Einblicke in den Aufbau der Insertase.

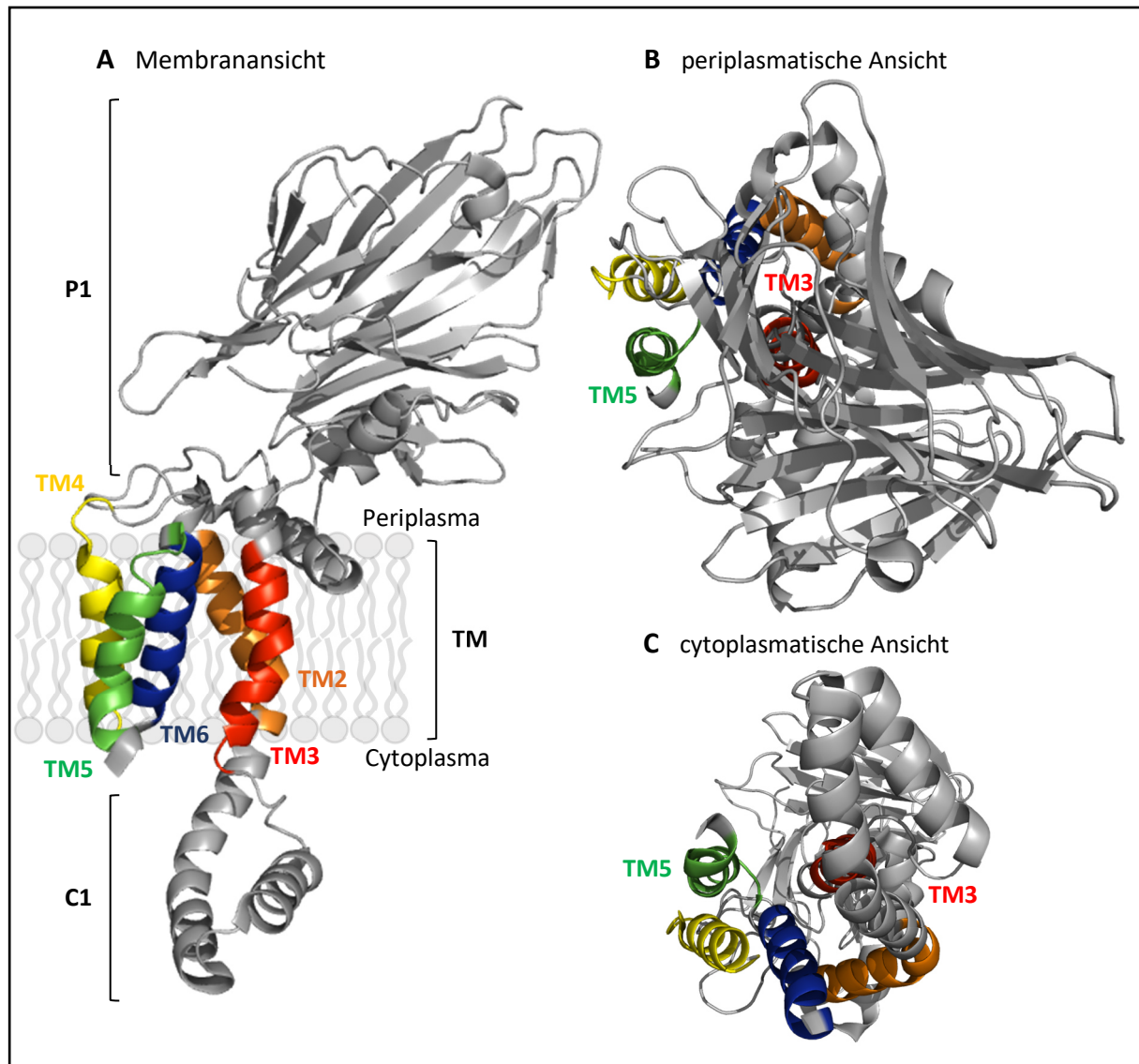


Abbildung 8: *E. coli* YidC Kristallstruktur (PDB 3WVF; Kumazaki *et al.*, 2014b). (A) Die Membranansicht der YidC-Struktur zeigt die periplasmatische Domäne P1 aus zwei antiparallelen β -Faltblättern, die Transmembranhelices 2-6 (TM2 orange, TM3 rot, TM4 gelb, TM5 grün, TM6 blau) und die *coiled-coil* Struktur der cytoplasmatischen Domäne C1. Durch die hydrophoben Reste an TM3 und 5 wirken diese beiden Helices bei der *YidC-only* Substratinsertion wie eine hydrophobe Rutsche. (A, B, C) Durch die Lücke dieser beiden Helices öffnet sich die hydrophile Tasche in Richtung Lipidbilayer. Die Tasche ist außerdem vom Cytoplasma aus zugänglich (C), in Richtung Periplasma ist sie geschlossen (B).

E. coli-YidC ist ein sechs-spänniges Membranprotein (Sääf *et al.*, 1998b) der inneren Membran bestehend aus 548 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 61 kDa (UniProt P25714). Die ersten beiden TM sind durch die große periplasmatische P1 Domäne verbunden. Die P1 Domäne besteht aus einem β -Sandwich mit 18 β -Strängen (Oliver & Paetzel, 2008) und macht mehr als die Hälfte der Größe von YidC aus (319 Aminosäuren; UniProt P25714). Die Deletion eines großen N-terminalen Teils der P1 Domäne ist nicht letal (Jiang *et al.*, 2003). Co-Reinigungs-Experimente haben gezeigt, dass die P1 Domäne mit SecF in Kontakt steht (Xie *et al.*, 2006).

Die TM 2-6 sind innerhalb der YidC/Oxa/Alb-Familie stark konserviert (Kiefer & Kuhn, 2018). Diese fünf Helices sind eng gepackt und bilden eine hydrophile Tasche, die sich in Richtung Cytoplasma und Membranbilayer öffnet. Auf der periplasmatischen Seite ist diese verschlossen. Im Gegensatz zu SecY bildet YidC also keinen durchgängigen Kanal. Die TM 3 und TM 5 sind am Rand der hydrophilen Tasche in Richtung Bilayer-Öffnung zu finden (Kumazaki *et al.*, 2014b) und bilden eine hydrophobe Rutsche (Kiefer & Kuhn, 2018), die mit den Substratproteinen in Kontakt steht (Klenner *et al.*, 2008; Klenner & Kuhn, 2012; Neugebauer *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2008). Die TM 1 konnte in der *E. coli* Struktur nicht dargestellt werden. Es wird daher vermutet, dass diese TM nicht fest mit den anderen Helices interagiert (Kumazaki *et al.*, 2014b). Außerdem scheint die erste TM nicht essentiell für die Aktivität von *E. coli*-YidC zu sein (Jiang *et al.*, 2002), stellt aber eine Signalankersequenz für die Membraninsertion von YidC selbst durch die Sec-Translokase dar (Sääf *et al.*, 1998b).

Die cytoplasmatische C1 Domäne zwischen TM 2 und TM 3 zeigt eine flexible *coiled-coil* Struktur, die essentiell für die YidC-Funktion ist (Kumazaki *et al.*, 2014b).

Da YidC keinen verlängerten C-Terminus wie einige der Homologen besitzt, ist die Affinität zu nicht-translatierenden Ribosomen gering. Im Gegensatz dazu haben RNCs mit einem YidC-Substrat eine hohe Bindungsaffinität zu YidC (Kuhn *et al.*, 2017a). Der positiv-geladene C-Terminus scheint auch in dieser kürzeren Version eine Rolle bei der RNC-Bindung zu spielen, ebenso wie die positiv geladene C2-Domäne (Geng *et al.*, 2015).

Die hydrophile Tasche von YidC schützt hydrophile Substratbereiche

Die hydrophilen periplasmatischen Bereiche von Substratproteinen müssen über die hydrophobe Membran gebracht werden. Daran wird vermutlich die hydrophile Tasche von YidC, die zwischen den Helices 2-6 gebildet wird, beteiligt sein (Abbildung 8 und 9). In der

Mitte der Tasche ist ein konservierter positiv geladener Argininrest (R366) zu finden (Kumazaki *et al.*, 2014a und b), der in *E. coli* aber nicht essentiell ist (Chen *et al.*, 2014). Die Tasche ist in Richtung Cytoplasma und Lipidbilayer durch eine Lücke zwischen TM3 und TM5 geöffnet (Kumazaki *et al.*, 2014b). Es wird angenommen, dass die hydrophile Domäne des Substratproteins kurzzeitig von der hydrophilen Tasche aufgenommen wird, bevor diese weiter ins Periplasma transloziert wird (Kiefer & Kuhn, 2018; Abbildung 10B). Nachdem dieser Bereich der Substratproteine damit etwa die Hälfte des Weges über die Membran zurückgelegt hat, die Tasche aber in Richtung Periplasma geschlossen ist, muss der weitere Weg durch die Membran auf eine andere Weise erleichtert werden. Zum einen könnten

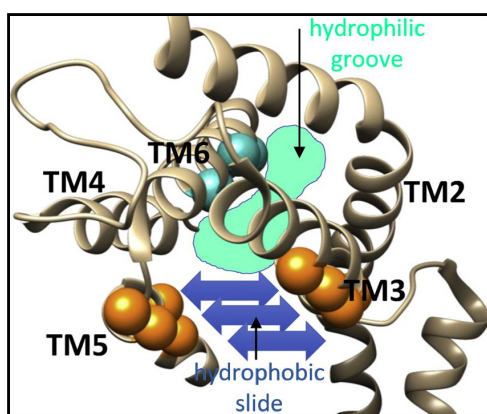


Abbildung 9: Die hydrophile Tasche und hydrophobe Rutsche von YidC. YidC-TM 3 und 5 bilden eine hydrophobe Rutsche (hydrophobic slide, blaue Pfeile), an denen die TM der Substrate entlanggleiten können, während die Kavität im Inneren der YidC-TM eine hydrophile Umgebung (hydrophilic groove, siehe grüner Bereich) für periplasmatische Substratbereiche darstellen. (Abbildung aus He *et al.*, 2020)

Konformationsänderungen innerhalb von YidC dazu beitragen (Imhof *et al.*, 2011; Kedrov *et al.*, 2016). Außerdem wird davon ausgegangen, dass YidC die Dicke des hydrophoben Teils der Membran von 33 Å auf etwa 28 Å verringert, wodurch die Distanz, welche die periplasmatische Domäne durch die Membran zurücklegen muss, verkürzt wird. Dadurch wird die Translokation der periplasmatischen Domäne energetisch erleichtert (Chen *et al.*, 2017). YidC kann nur Proteine mit relativ kleinen periplasmatischen Domänen eigenständig inserieren. Es wird vermutet, dass unter anderem der beschränkte Platz in der hydrophilen Tasche hierfür limitierend ist (Kiefer & Kuhn, 2018).

TM 3 und TM 5 bilden eine hydrophobe Rutsche für Substratproteine

Die beiden Membranhelices drei und fünf (Abbildung 8-10) interagieren mit YidC-abhängigen Membranproteinen (Klenner *et al.*, 2008; Klenner & Kuhn, 2012; Neugebauer *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2008). Zwischen diesen beiden Helices bildet sich eine Lücke (6 Å), die möglicherweise ein Substratprotein zwischen sich klemmen kann (Kumazaki *et al.*, 2014b). Die an den Kontakten mit dem Substratprotein beteiligten Aminosäuren sind hydrophob. Aus diesem Grund wird davon ausgegangen, dass der hydrophobe Bereich des Substratproteins an diesen

Resten entlang rutschen kann, die beiden TM 3 und 5 also eine hydrophobe Rutsche für Substrate bilden (Kiefer & Kuhn, 2018; Abbildung 9).

Das Modell der Pf3 *coat* Insertion (*N-out-C-in* Topologie) schlägt folgendes vor: Das Substrat bindet an YidC (Abbildung 10A). Es bildet dabei eine Haarnadel-Struktur, wobei beide Termini

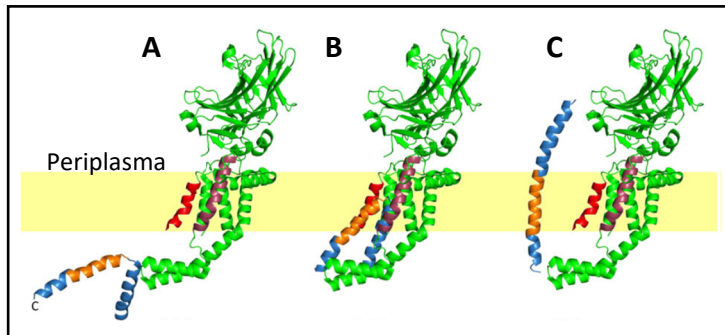


Abbildung 10: Modell der Membraninsertion von Pf3 *coat* durch die Insertase YidC. Nach der Bindung des Substrats Pf3 *coat* an YidC (A) rutscht die transmembrane Pf3 *coat*-Region (orange) an den hydrophoben Resten von TM3 (rot) und TM5 (lila) entlang (B). Der N-terminale hydrophile Pf3 *coat*-Bereich (blau) wird von der hydrophilen Tasche von YidC aufgenommen und Pf3 *coat* schließlich in die Membran entlassen (C). (Abbildung aus Kiefer & Kuhn, 2018)

im Cytoplasma bleiben. Anschließend gleitet die hydrophobe TM an der hydrophoben Rutsche, gebildet aus TM 3 und 5, entlang, während der N-terminale hydrophile Bereich, der die Membran passieren muss, kurzfristig in der hydrophilen Tasche zwischen TM 3 und 5 aufgenommen wird (Abbildung 10B). Im Anschluss wird das Substrat in die Membran

inseriert (Abbildung 10C). Dabei wird der TM-Bereich durch hydrophobe Wechselwirkungen in die Membran entlassen und der hydrophile N-Terminus unter Verwendung der PMF transloziert (He *et al.*, 2020; Kiefer & Kuhn, 2018; Tsukazaki, 2019). Der Kontakt zwischen YidC und seinem Substrat dauert von Bindung bis Entlassung in die Membran nur 20 ms (Winterfeld *et al.*, 2013).

Aufgrund der Position von TM 3 und 5 und der Beteiligung an der Substratbindung könnten bei der SecY/YidC-abhängigen Membraninsertion diese beiden Helices am SecY/YidC-Kontakt beteiligt sein und Substrate vom SecY *lateral gate* übernehmen oder an dieses übergeben.

YidC Oligomerisierung

Ob YidC als Monomer oder Dimer aktiv ist, wurde vielfach diskutiert. Boy und Koch (2009) zeigten, dass YidC Dimere bilden kann. Ob die Dimerisierung eine funktionelle Voraussetzung ist, blieb offen. Einige strukturelle Studien haben gezeigt, dass YidC als Monomer an Ribosomen bindet (Kedrov *et al.*, 2013; Seidl *et al.*, 2014; Wickles *et al.*, 2014). Auch die Kristallstrukturen lassen auf ein Monomer schließen (Kumazaki *et al.*, 2014a und b). Später

wurde außerdem gezeigt, dass bei einem YidC-YidC-Fusionsprotein nur eines der beiden Protomere für eine intakte YidC-Aktivität funktionell sein musste (Spann *et al.*, 2018). Dies lässt darauf schließen, dass YidC als Monomer aktiv ist.

Die YidC/Oxa/Alb Familie: YidC-Homologe finden sich in allen Reichen des Lebens

Die Membraninsertasen der YidC/Oxa/Alb-Familie sind in Prokaryonten und Organellen von Eukaryonten zu finden. Die Mitglieder dieser Protein-Familie zeichnen sich durch eine gemeinsame Kernregion bestehend aus fünf Helices aus, die den TM 2-6 in *E. coli*-YidC entsprechen. Ebenfalls konserviert ist die cytoplasmatische C1-Domäne mit ihrer *coiled-coil* Struktur. Die TM 1 und die große periplasmatische Domäne P1, die im bakteriellen YidC der Gram-negativen zu finden ist, ist bei den anderen Vertretern der Familie in den murenen Proteinen nicht vorhanden (Funes *et al.*, 2011). In einigen Fällen, wie zum Beispiel *B. subtilis* sowie weiteren *Bacillus*-Spezies, *Lactococcus lactis* oder *Staphylococcus aureus*, wird YidC aber als Präprotein mit einer N-terminalen Signalsequenz synthetisiert. Diese TM wird allerdings prozessiert und ist im murenen Protein nicht mehr vorhanden (Serrano *et al.*, 2003; Tjalsma *et al.*, 2003). In *E. coli* wird die TM1 nicht prozessiert und stellt eine Signalankersequenz dar (Jiang *et al.*, 2002; Sääf *et al.*, 1998b). In vielen Gram-positiven Bakterien, Mitochondrien und Chloroplasten wurden die *yidC*-Gene dupliziert, wodurch zwei YidC-Paraloge zu finden sind (Abbildung 11). Jeweils einer dieser Vertreter hat häufig einen verlängerten C-Terminus, der die Ribosomenbindung unterstützt (Funes *et al.*, 2011). *E. coli* YidC besitzt diesen verlängerten C-Terminus nicht. Das YidC aus manchen anderen Gram-negativen Bakterien wie *Rhodospirellula baltica* und *Oceanicaulis alexandrii* dagegen schon. Eine Fusion der C-Termini dieser marinen Bakterien an *E. coli* YidC zeigt eine Verstärkung der Bindungsaffinität für Ribosomen und kann sogar den Verlust der SRP-Rezeptor-Funktion ausgleichen (Seitl *et al.*, 2014).

Wird die YidC-Funktion in *E. coli* depletiert, kann diese sowohl von den beiden Paralogen der Gram-negativen Bakterien (Dong *et al.*, 2008; Saller *et al.*, 2009), als auch von den mitochondrialen (van Bloois *et al.*, 2005 und 2007) und Chloroplasten-Homologen (Benz *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2002) komplementiert werden. Man geht daher von teilweise ähnlichen Funktionen der YidC-Homologen aus. Dies wird auch durch die Beteiligung von YidC (van der Laan *et al.*, 2004b; Yi *et al.*, 2003), Oxa1 (Altamura *et al.*, 1996), Alb4 (Benz *et al.*, 2009) und

beiden Paralogen der Gram-negativen (Saller *et al.*, 2009) an der Insertion und Assemblierung der F₁F_o ATP Synthase unterstrichen.

Oxa1 und Oxa2 (Cox18) sind in der inneren Membran von Mitochondrien zu finden (Funes *et al.*, 2004b). Ursprünglich wurde Oxa1 als essentieller Bestandteil für die Assemblierung der Cytochrom-c-Oxidase Cox2 (*Oxidase assembly*; Oxa1) in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert (Bonney *et al.*, 1994). Es ist aber auch an der Insertion von vielen weiteren Zellkern- und mitochondrial kodierten Proteinen beteiligt. Proteine, die im Cytoplasma synthetisiert werden, werden vor der Insertion durch Oxa1 über den TOM/TIM-Komplex in die Mitochondrien transportiert. Oxa2 (Cox18) ist gemeinsam mit Oxa1 an der Insertion der Untereinheit 2 der Cytochrom Oxidase beteiligt (Fiumera *et al.*, 2009; Funes *et al.*, 2011).

In der Thylakoidmembran von Chloroplasten ist Alb3 für die Insertion von Lichtsammelkomplexproteinen (LHCP; *light-harvesting chlorophyll binding proteins*) verantwortlich (Bellafiore *et al.*, 2002). Blätter von Pflanzen ohne funktionelles Alb3 sind gelblich-weiß gefärbt, woher auch der Name (Alb = albino) stammt (Sundberg *et al.*, 1997). Alb4 ist wie oben erwähnt für die Assemblierung der ATP Synthase essentiell (Benz *et al.*, 2009). Ähnlich wie im Fall der Mitochondrien müssen Proteine, deren Synthese im Cytoplasma stattfindet, vor der Insertion mithilfe des TOC/TIC-Komplexes über die beiden Membranen in das Innere der Chloroplasten transportiert werden.

Im Modell-Organismus der Gram-positiven, *B. subtilis*, ist YidC1 essentiell für die Sporenbildung und wird auch SpoIIJ genannt (Errington *et al.*, 1992; Murakami *et al.*, 2002). Das zweite Homolog, YidC2 (YqjG), wird dann synthetisiert, wenn SpoIIJ ausgelastet ist, was auf eine teilweise überlappende Funktion der beiden Paraloge schließen lässt (Chiba *et al.*, 2009). Gestützt wird dies durch die Tatsache, dass nur eines der beiden Paraloge für das Zellwachstum nötig ist (Murakami *et al.*, 2002; Tjalsma *et al.*, 2003).

Bis zur Identifizierung von Get1 (*Golgi to ER traffic protein 1*) im Endoplasmatischen Retikulum (ER) war außerhalb der endosymbiontischen Organellen lange Zeit kein YidC-ähnliches Protein bekannt. Das Get-System inseriert *tail-anchored* Membranproteine, also Proteine mit einer C-terminalen TM und einer cytoplasmatischen Domäne am N-Terminus (Anghel *et al.*, 2017; F. Wang *et al.*, 2014; Zalisko *et al.*, 2017). Zwar ist die Sequenzähnlichkeit mit YidC sehr gering, Strukturvorhersagen deuten aber darauf hin, dass Get1 drei Transmembranhelices, die eine

hydrophile Substrat-bindende Tasche bilden, sowie eine cytoplasmatische *coiled-coil* Domäne besitzt (Anghel *et al.*, 2017).

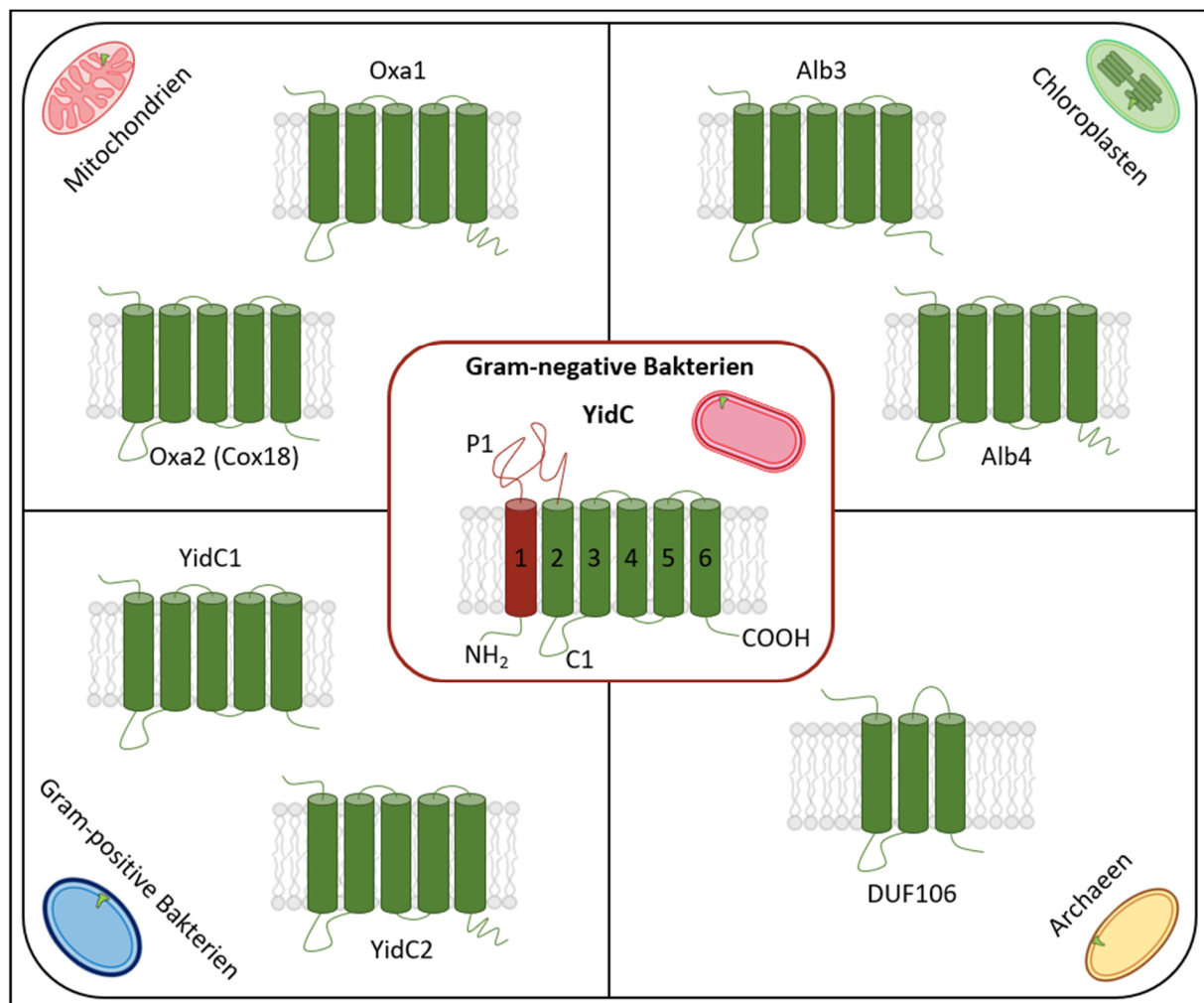


Abbildung 11: Die YidC/Oxa/Alb-Familie. Das YidC Gram-negativer Bakterien besitzt als einziges Homolog der Familie auch im murenen Protein eine zusätzliche N-terminale TM und eine große periplasmatische Domäne zwischen TM1 und 2. Gram-positive Bakterien, Mitochondrien und Chloroplasten verfügen über jeweils zwei YidC-Homologe mit fünf TM im murenen Protein. In den meisten Fällen besitzt eines der beiden Paraloge einen verlängerten C-Terminus. YidC2 aus beispielsweise *B. subtilis* weist diesen aber nicht auf, *Streptococcus mutans* und viele andere Gram-positive Bakterien wie hier dargestellt dagegen schon (Funes *et al.*, 2011). Mit DUF106 ist eine YidC-ähnliche Insertase bestehend aus nur drei TM auch in Archaeen vorhanden (Borowska *et al.*, 2015). (Abbildung nach Funes *et al.*, 2011)

Inzwischen wurden auch in der dritten Domäne des Lebens, den Archaeen, YidC/Oxa/Alb-ähnliche Insertasen in der inneren Membran gefunden (Borowska *et al.*, 2015; Kuhn & Kiefer, 2017). Die Sequenz-Übereinstimmung der als DUF106 (*Domain of Unknown Function* 106) bezeichneten Proteine mit den YidC/Oxa/Alb-Mitgliedern ist mit 10-15 % eher gering. Es werden zwar ebenfalls eine *coiled-coil*-Struktur der C1-Domäne, aber nur drei bis vier Transmembrandomänen vorhergesagt. Die Kristallstruktur des *Methanocaldococcus*

jannaschii DUF106-Vertreter *Mj0480* deckt die strukturellen Gemeinsamkeiten auf. Die drei Transmembranhelices von *Mj0480* bilden ähnlich wie *E. coli* und *B. subtilis* YidC eine hydrophile Tasche. Das Archaeen-Homolog scheint damit eine minimalistische Version der Vertreter der YidC/Oxa/Alb-Familie zu sein (Abbildung 11). Trotzdem kann DUF106 aus verschiedenen Archaeen *E. coli*-YidC und *S. cerevisiae*-Oxa1 nicht komplementieren (Borowska *et al.*, 2015).

Die große Verbreitung von YidC-Homologen über alle drei Reiche des Lebens unterstreicht die Wichtigkeit dieses Systems und weist auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung hin. Die Ähnlichkeiten und Unterschiede zeigen, wie sich die Homologen während der Evolution verändert haben könnten und verschiedene Eigenschaften dazukamen oder verloren gingen.

1.1.4 Insertion und Translokation von Sec- und YidC-abhängigen Substraten

Membranproteine können die Membran einmal, zweimal oder mehrfach durchspannen und ihren N- und C-Terminus auf der periplasmatischen oder cytoplasmatischen Seite der Membran lokalisiert haben. Einspännige Membranproteine werden in drei Klassen eingeteilt. Typ-1-Proteine zeigen eine *N-out-C-in* Topologie. Manche davon werden mit einer Signalsequenz synthetisiert, die nach der Insertion entfernt wird. Typ-2- und Typ-3-Proteine haben dagegen ihren N-Terminus im Cytoplasma und den C-Terminus im Periplasma. Sie unterscheiden sich darin, dass Typ-3-Proteine ihre TM am C-Terminus und damit eine längere N-terminale Domäne im Cytoplasma besitzen. Typ-3-Proteine werden auch als *C-tail-anchored* Proteine bezeichnet (Kuhn *et al.*, 2017a).

Doch wodurch wird bestimmt, wie genau ein Substratprotein in die Membran eingebaut wird? Geladene Reste, die an die TM angrenzen, spielen bei der Orientierung der Membranproteine eine wichtige Rolle, vor allem bei den YidC-abhängigen. Bei einspännigen Membranproteinen gilt die *positive inside rule*. Ist der Aminoterminus positiv geladen, bleibt dieser im Cytoplasma, während der C-Terminus in das Periplasma transloziert wird, und umgekehrt (Kiefer *et al.*, 1997; von Heijne, 1986). Durch Vertauschen der Ladungen an N- und C-Terminus werden die Proteine in der jeweils anderen Orientierung inseriert, was für Pf3 *coat* gezeigt wurde (Kiefer *et al.*, 1997). Bei mehrspännigen Proteinen ist die Ladung ebenfalls maßgebend, wobei vermutlich die als erstes inserierte TM die Orientierung bestimmt. Die Orientierung der folgenden TM ergibt sich (Boyd & Beckwith, 1989; Hartmann *et al.*, 1989; vonHeijne, 1989).

Für die Translokation von negativ geladenen Resten in periplasmatischen Regionen wird häufig das elektrochemische Membranpotential benötigt (Andersson & von Heijne, 1994; Cao *et al.*, 1995). Durch die positive Ladung auf der periplasmatischen Seite der Membran ist die für die Translokation der negativen Reste notwendige Aktivierungsenergie herabgesetzt. Die Stimulation der Translokation durch das Membranpotential wurde zum Beispiel für die negativ geladene periplasmatische Domäne des YidC-abhängigen Substrats M13 *procoat* gezeigt (Schuenemann *et al.*, 1999a). Die *positive inside rule* kann aber nicht mit dem Membranpotential erklärt werden, wie ursprünglich vermutet wurde (Andersson & von Heijne, 1994). Azidophile Bakterien besitzen ein umgekehrtes Membranpotential, die Membraninnenseite ist also positiv geladen (Cox *et al.*, 1979; Matin *et al.*, 1982; Michels & Bakker, 1985). Trotzdem gilt auch hier die *positive inside rule* (van de Vossenberg *et al.*, 1998). Warum genau positive Reste in den cytoplasmatischen Regionen häufiger vorkommen als in den periplasmatischen, ist noch nicht komplett geklärt. Möglicherweise könnten unter anderem anionische Lipide, die die positiven Reste auf der cytoplasmatischen Membranseite festhalten, zur *positive inside* Topologie beitragen (van Klompenburg, 1997). Für M13 *procoat* konnte gezeigt werden, dass die Bindung der positiven Reste im N-Terminus an die negativ geladenen Phospholipide für die Insertion erforderlich sind (Gallusser & Kuhn, 1990).

Die verschiedenen Substrate gelangen über unterschiedliche Wege in die Membran. Manche Membranproteine können unabhängig von Insertasen in die Membran integrieren. Hierzu gehören das Kalium Sensorprotein KdpD (Facey & Kuhn, 2003) und der Kaliumtransporter KcsA (Altrichter *et al.*, 2017; van Dalen *et al.*, 2002). Aber auch in diesen Fällen wird davon ausgegangen, dass Insertasen genutzt werden, wenn sie zur Verfügung stehen (Kuhn *et al.*, 2017a). Für Pf3 *coat* (Ernst *et al.*, 2011) und M13 *procoat* (Soman *et al.*, 2014) konnte gezeigt werden, dass durch Erhöhung der Hydrophobizität der TM ebenfalls eine SecY- und YidC-unabhängige Insertion möglich ist. Sehr hydrophobe Transmembrandomänen können spontan und unabhängig von Insertasen in die Membran integrieren, da dieser Prozess energetisch günstig ist (Soman *et al.*, 2014). Die TM der meisten Membranproteine sind dafür aber nicht hydrophob genug, zudem müssen hydrophile Bereiche über die Membran ins Periplasma gelangen. Diese Proteine benötigen Insertasen. Moderat hydrophobe TM führen deshalb zu einer YidC-Abhängigkeit (Ernst *et al.*, 2011; Price & Driessen, 2010; Zhu *et al.*, 2013a). Die für die Translokation notwendige Aktivierungsenergie wird durch den Beitrag der

hydrophoben Interaktion heruntergesetzt (Zhu *et al.*, 2013a). Durch Hinzufügen von geladenen Resten zur translozierten Region und damit der Erhöhung der Polarität kann ein YidC-*only*-Substrat abhängig von der Sec-Translokase werden und umgekehrt (Neugebauer *et al.*, 2012; Soman *et al.*, 2014; Stiegler *et al.*, 2011; von Heijne, 1989; Zhu *et al.*, 2013a). Die Erhöhung der Polarität der periplasmatischen Domäne erhöht die energetische Barriere, die bei der Translokation dieser Region über die hydrophobe Membran überwunden werden muss. Vermutlich kommt deshalb SecY ins Spiel (Soman *et al.*, 2014). Ob ein Substrat Sec- oder YidC-abhängig ist, hängt aber letztendlich von einigen weiteren Faktoren ab. Dazu gehören die Anzahl seiner TM, deren Hydrophobizität, die Größe der translozierten Bereiche und die Ladung in den verschiedenen Segmenten.

Sec-abhängige Insertion und Translokation

Wie oben beschrieben kann das Sec-Translokon unabhängig von YidC Membranproteine meist cotranslational an SRP gebundene Substratproteine in die Cytoplasmamembran inserieren oder sekretorische Proteine meist posttranslational über den SecB/A-Weg translozieren (Abbildung 12A). Die Energie hierfür kann aus unterschiedlichen Quellen stammen. Die ATPase-Aktivität von SecA (Karamanou *et al.*, 1999; Lill *et al.*, 1989), die PMF (Knyazev *et al.*, 2018) und das Fortschreiten der Translation am Ribosom bzw. die GTP-Hydrolyse zur Initiation der cotranslationalen Insertion (Knyazev *et al.*, 2018) spielen dabei je nach Substrat eine Rolle. In dieser Arbeit wurde mit dem Substrat proPhoA als Sec-abhängiges sekretorisches Protein gearbeitet.

Die Alkalische Phosphatase PhoA

Die Alkalische Phosphatase PhoA ist ein periplasmatisches Enzym. Die Translokation ihres Präproteins proPhoA erfolgt in Abhängigkeit von SecYEG und SecA (Chatzi *et al.*, 2017; Gouridis *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013). Die 21 N-terminalen Aminosäuren des Präproteins dienen als Signalpeptid, ab Aminosäure 22 (Größe proPhoA: 471 Aminosäuren) beginnt das mature PhoA (UniProtKB-P00634). In dieser Arbeit wurde mit einer verkürzten Variante von proPhoA als Modell-Protein für die Sec-abhängige Translokation gearbeitet. Nach den Aminosäuren 1-221 (Δ Cys) folgt ein Cystein und ein 6-facher His-Tag. Diese verkürzte Version ist unabhängig von SecA und kann damit auch in Abwesenheit von SecA transloziert werden (unveröffentlichte Daten von Isabel Ernst, Arbeitsgruppe A. Kuhn, Universität Hohenheim; Gouridis *et al.*, 2010). Das Molekulargewicht dieser proPhoA-Variante beträgt 24 kDa.

YidC-abhängige Insertion

Ein- und zwispännige Membranproteine können von YidC eigenständig inseriert werden (Abbildung 12B; Dalbey *et al.*, 2014). Große periplasmatische Domänen über etwa 80-100 Aminosäuren kann YidC nicht selbstständig translozieren (Kuhn, 1988; Wickström *et al.*, 2011). YidC besitzt keine Energie-liefernde Domäne und nutzt vermutlich hydrophobe Wechselwirkungen, um die Membraninsertion energetisch zu begünstigen (Dalbey *et al.*, 2014). Bei der Insertion hydrophober TM in die Membran kann Energie freiwerden, die dann zur Translokation von hydrophilen Segmenten verwendet werden kann (Soman *et al.*, 2014). Reicht die Energie nicht aus, kommt SecY ins Spiel (Kiefer & Kuhn, 2018). Wie oben beschrieben können die hydrophoben Bereiche eines Substrats an den hydrophoben Resten von YidC-TM3 und 5 entlanggleiten, während periplasmatische Bereiche kurzfristig in der hydrophilen Tasche aufgenommen werden.

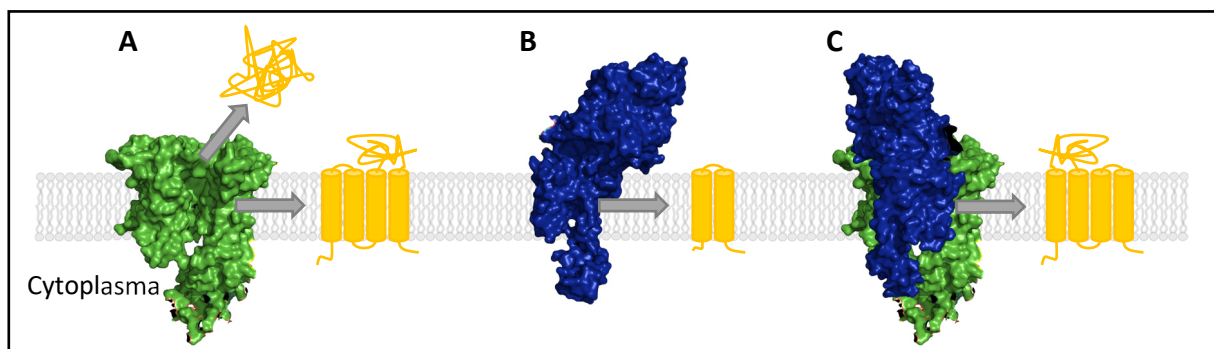


Abbildung 12: Insetion und Translokation von SecY- und YidC-abhängigen Substraten. (A) SecYEG (grün) kann sekretorische Proteine translozieren und Membranproteine in die innere Membran inserieren. (B) Kleinere ein- und zwispännige Membranproteine können auch Sec-unabhängig von YidC (blau) inseriert werden. (C) Die YidC-abhängige Insertion von mehrspännigen Membranproteinen oder Membranproteinen mit großen periplasmatischen Domänen erfolgt in Kooperation mit SecYEG. Wie genau SecY und YidC interagieren und kooperieren, ist noch nicht vollständig geklärt. (Zur Vereinfachung wurden weitere Komponenten des Insetions- und Translokationsprozesses in der Abbildung nicht gezeigt.)

Zu den Substraten, die über den *YidC-only* Insetionsweg in die Membran gelangen, zählen unter anderem die Untereinheit c der ATP Synthase (van der Laan *et al.*, 2004b; Yi *et al.*, 2003), die Hüllproteine der Phagen Pf3 und M13, Pf3 *coat* (Chen *et al.*, 2002a; Serek *et al.*, 2004) und M13 *procoat* (Samuelson *et al.*, 2000; Stiegler *et al.*, 2011), und der mechanosensitive Kanal MscL (Facey *et al.*, 2007; Neugebauer *et al.*, 2012). SciP (TssL) als *C-tail-anchored* Protein gehört ebenfalls zu den *YidC-only* Substraten (Aschtgen *et al.*, 2012; Pross *et al.*, 2016).

Das Hüllprotein des Bakteriophagen Pf3: Pf3 *coat protein*

Das Hüllprotein des filamentösen Bakteriophagen Pf3 (Pf3 *coat protein*, *Major coat protein*, *Gene 8 protein*, g8p) wird vor der Assemblierung in die Phagenhülle ohne Signalsequenz synthetisiert und in die innere Membran von *Pseudomonas aeruginosa* inseriert (Luiten *et al.*, 1983). Pf3 *coat* kann außerdem rekombinant in *E. coli* exprimiert werden, wo es ebenfalls in die innere Membran eingebaut wird. Die Insertion ist unabhängig von der Sec-Translokase, benötigt aber YidC (Chen *et al.*, 2002a; Ernst *et al.*, 2011; Rohrer & Kuhn, 1990; Serek *et al.*, 2004). Das Protein ist 44 Aminosäuren lang und besitzt ein Molekulargewicht von 4,63 kDa (Luiten *et al.*, 1983). Es durchspannt die Membran einmal mit einer *N-out-C-in* Topologie (Ernst *et al.*, 2011; Kuhn *et al.*, 2017a; Welsh *et al.*, 1998). In dieser Arbeit wurde es als Beispiel-Substrat für eine YidC-abhängige Insertion eingesetzt.

Kooperation von YidC und der Sec-Translokase

In Kooperation mit dem Sec-Translokon ist YidC auch bei der Insertion von mehrspännigen Membranproteinen mit größeren periplasmatischen Domänen beteiligt (Abbildung 12C). Sachelaru *et al.* (2013) konnten Interaktionen zwischen YidC und dem SecY *lateral gate* zeigen. Man geht davon aus, dass YidC die TM der Substrate am *lateral gate* von SecY entgegennimmt und ihre Entlassung in die Membran erleichtert. Die Interaktion von SecY und YidC scheint von SecDFYajC unterstützt zu werden (Nouwen & Driessen, 2002; Xie *et al.*, 2006), aber nicht davon abhängig zu sein (Sachelaru *et al.*, 2013). Der Komplex aus den sieben Untereinheiten SecYEG/YidC/SecDFYajC, dem eine höhere Insertionseffizienz zugeschrieben wird als SecYEG und YidC allein, wird als Holotranslokon bezeichnet (Komar *et al.*, 2016; Schulze *et al.*, 2014). In einer Struktur des Holotranslokons mit geringer Auflösung (14 Å) von Botte *et al.* (2016) zeigt sich, dass sich YidC in der Nähe des *lateral gates* befindet. Aufgrund der unterschiedlichen Anzahl an SecY (200-1300, je nach Quelle; Crane & Randall, 2017) und YidC (2500-3000; Urbanus *et al.*, 2002) und der deutlich geringeren Anzahl an SecDFYajC (Crane & Randall, 2017) pro Zelle kann es nur einige wenige Holotranslokons geben. Die Komponenten befinden sich vermutlich in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen dem Holotranslokon und anderen Zusammensetzungen in der Membran (Kuhn *et al.*, 2017a).

Zu den Sec/YidC-abhängigen Substraten gehören unter anderem die Untereinheit a der F₁F₀ ATP Synthase (Kol *et al.*, 2009; Yi *et al.*, 2003), CyoA (van Bloois *et al.*, 2006; van der Laan *et al.*, 2003), eine Untereinheit der Cytochrom *o* Oxidase, die Laktose-Permease LacY (Nagamori

et al., 2004), MalF (Wagner *et al.*, 2008a), eine Komponente des Maltosetransportkomplexes, und TatC (Zhu *et al.*, 2012), eine Untereinheit der Twin Arginin Translokase. Bei manchen SecY/YidC-Substraten läuft die Insertion des gesamten Membranproteins abhängig von SecY und YidC ab. Bei anderen Substraten wie zum Beispiel CyoA ist dies nicht der Fall. CyoA ist ein zweispänniges Membranprotein, welches als preCyoA mit einer weiteren N-terminalen TM als Signalsequenz synthetisiert und inseriert wird. Die Insertion der N-terminalen Signalsequenz und der ersten TM sind nur abhängig von YidC, die Insertion der zweiten TM und die Translokation der großen periplasmatischen Domäne sind dagegen SecY-abhängig (Celebi *et al.*, 2006; van Bloois *et al.*, 2006). Neben der Insertion selbst kann auch die korrekte Faltung und Assemblierung der inserierten Proteine zu den Chaperon-Aufgaben von YidC gehören. Im Falle von MalF (Wagner *et al.*, 2008a) und LacY (Nagamori *et al.*, 2004; Serdiuk *et al.*, 2016, 2017 und 2019; Zhu *et al.*, 2013b) ist die Insertion abhängig von SecY, nicht aber von YidC. Trotzdem sind diese Substrate auch abhängig von YidC, das für die Faltung der Proteine verantwortlich ist. Im Falle von LacY konnte überraschenderweise gezeigt werden, dass *in vitro* YidC allein für die Insertion und Faltung ausreicht, in Anwesenheit von SecYEG dieses aber die Führung übernimmt und YidC dann vermutlich wieder nur noch an der Faltung beteiligt ist (Serdiuk *et al.*, 2019).

Die Frage, wie genau SecY und YidC interagieren und zusammenarbeiten, ist noch nicht vollständig geklärt und das Thema dieser Arbeit.

1.2 Disulfid-Cross-Linking von Proteinen

Zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen, in dieser Arbeit zwischen dem SecY *lateral gate* und YidC, werden *in vivo* Cross-Links durchgeführt. Beim Protein-Cross-Linking wird durch einen chemischen Vorgang, zum Beispiel eine Oxidation von zwei Thiolgruppen (-SH), eine kovalente Bindung zwischen den Proteinen ausgebildet. Die Proteine werden also quervernetzt (*Cross-Link*). Hierfür werden Einzelcystein-Mutanten von SecY und YidC generiert, die ein Cystein an einer möglichen Interaktionsposition tragen. Mithilfe eines Oxidationsmittels, zum Beispiel DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure); Ellmans Reagenz), können Disulfidbrücken zwischen diesen Cystein-Positionen gebildet und die beiden Proteine miteinander vernetzt werden (Abbildung 13). Der *Cross-Link* findet nur statt, wenn die beiden Cysteine in unmittelbarer Nähe (4-7 Å) zueinander stehen. Findet keine Interaktion statt, wird

kein *Cross-Link* gebildet. Zur Kontrolle kann ein gebildetes *Cross-Link*-Produkt mithilfe von DTT wieder reduziert werden. Durch die Vernetzung der Proteine verändert sich deren Laufverhalten im SDS-Gel. So kann der *Cross-Link* und damit die Interaktion über eine zusätzliche Bande im SDS-Acrylamid-Gel nachgewiesen werden. Spann *et al.* (2018) haben so zum Beispiel Interaktionen zwischen YidC und M13 *procoat* nachgewiesen. Disulfid-*Cross-Linking* kann sowohl *in vivo* als auch *in vitro* durchgeführt werden.

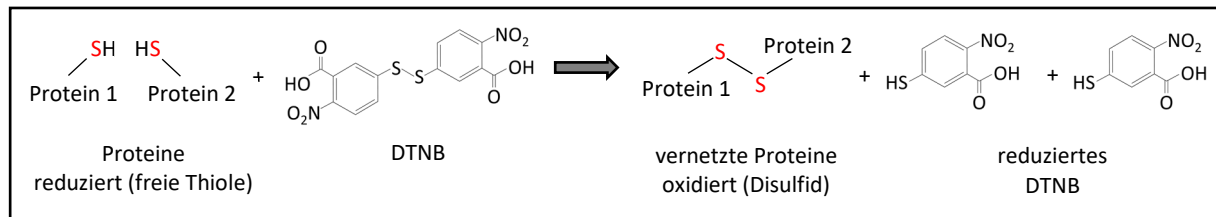


Abbildung 13: Oxidation von zwei Proteinen mittels DTNB. Mithilfe des Oxidationsmittels DTNB können die Thiolgruppen der Cysteine von Proteinen oxidiert werden, wodurch eine kovalente Disulfidbrücke gebildet wird. DTNB selbst wird bei dieser Reaktion reduziert.

Um auf dem Gel nur das Ziel-Protein über eine radioaktive Markierung zu detektieren, wird eine Immunpräzipitation durchgeführt. Das Ziel-Protein wird von einem spezifischen Antikörper erkannt und der Protein-Antikörper-Komplex mit Staph A präzipitiert. Bei Staph A handelt es sich um abgetötete *Staphylococcus aureus* Zellen, die Protein A-positiv sind. Das Protein A an der Zellwand von *S. aureus* bindet die Fc-Region des Antikörpers (Goding, 1978). Der Komplex aus Zielprotein mit gebundenem Antikörper und Staph A lässt sich durch Zentrifugation vom Überstand, der die restlichen vom Antikörper nicht erkannten Proteine enthält, abtrennen.

1.3 Fluoreszenz und FRET

1.3.1 Fluoreszenz

Als Fluoreszenz wird die kurzzeitige spontane Lichtemission bezeichnet, die beim Übergang eines elektronisch angeregten Systems zurück in seinen Grundzustand niedrigerer Energie auftritt. Zur Anregung muss hierbei Licht einer bestimmten Wellenlänge (Anregungswellenlänge) auf ein Molekül treffen, wobei Photonen absorbiert werden und Elektronen des Moleküls in ein energetisch höheres Orbital angehoben (angeregt) werden. Diese Elektronen fallen dann rasch auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück. Dabei wird

die Differenz an Energie zwischen den beiden Zuständen frei. Diese wird in Form von Wärme und Fluoreszenz (Photonen) abgegeben.

Die Elektronenübergänge lassen sich mithilfe des Jablónski-Diagramms (Abbildung 14), einem Energie-Diagramm, darstellen. Durch die Absorption eines Anregungsphotons ($h\nu$) wird ein Elektron aus seinem Grundzustand S_0 in einen angeregten Zustand S_1 angehoben (Abbildung

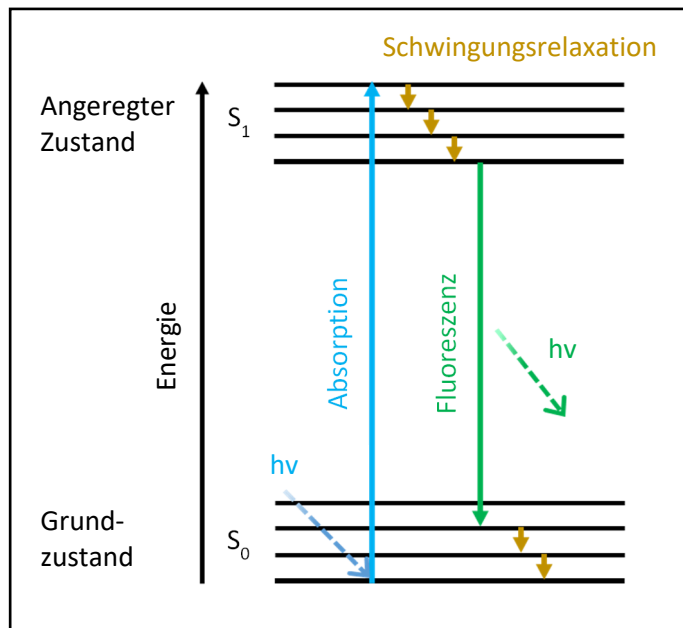


Abbildung 14: Vereinfachtes Jablónski-Diagramm. Durch die Absorption eines Anregungsphotons ($h\nu$) wird ein Elektron aus seinem Grundzustand S_0 in einen angeregten Zustand S_1 angehoben (blau). Da dieser Zustand energetisch ungünstig und damit nicht stabil ist, kommt es zu einem strahlungslosen Übergang von höher angeregten Schwingungszuständen des S_1 -Niveaus in den S_1 -Schwingungsgrundzustand. Die dabei freigesetzte Energie wird in Form von Wärme abgegeben und als Schwingungsrelaxation bezeichnet (ocker). Der Übergang vom S_1 -Schwingungsgrundzustand zu höher angeregten Schwingungszuständen des S_0 -Niveaus erfolgt durch Fluoreszenz (grün). Der Übergang von den höher angeregten Schwingungszuständen des S_0 -Niveaus zum S_0 -Schwingungsgrundzustand erfolgt wieder strahlungsfrei durch Relaxation (ocker).

14, blau). Dieser angeregte Zustand ist energetisch ungünstig und damit nicht stabil, weshalb ein strahlungsloser Übergang von höher angeregten Schwingungszuständen des S_1 -Niveaus in den S_1 -Schwingungsgrundzustand erfolgt. Die freigesetzte Energie wird in Form von Wärme abgegeben und als Schwingungsenergie oder Schwingungsrelaxation bezeichnet (Abbildung 14, ocker). Der Übergang vom S_1 -Schwingungsgrundzustand zu höher angeregten Schwingungszuständen des S_0 -Niveaus erfolgt durch die Emission von Photonen, also Fluoreszenz (Abbildung 14, grün). Der Übergang von den höher angeregten Schwingungszuständen des S_0 -Niveaus zum S_0 -Schwingungsgrundzustand erfolgt wieder strahlungsfrei durch Relaxation (Hochreiter *et al.*, 2015).

Dadurch, dass nur ein Teil der Energie als Licht abgegeben wird, ist das emittierte Fluoreszenzlicht energieärmer, also langwelliger, als das Anregungslicht. Die Differenz

zwischen der Anregungs- und der Fluoreszenzwellenlänge wird als Stokes-Differenz (*'Stokes-Shift'*) bezeichnet und liegt bei 20-50 nm (Hochreiter *et al.*, 2015; Wannas *et al.*, 2019).

Durch die Wechselwirkung mit zum Beispiel Kaliumiodid (KI) kann die Fluoreszenz gequencht, das heißt gelöscht, werden. Dabei wird Energie auf den Quencher übertragen, ohne dass Licht emittiert wird. Die Fluoreszenz wird also gelöscht. Dies kann sich zu Nutze gemacht werden, um zum Beispiel die Zugänglichkeit eines Fluorophors zu untersuchen. In dieser Arbeit wurde auf diese Weise getestet, ob Substrate in Proteoliposomen inseriert bzw. transloziert wurden.

1.3.2 FRET: Förster-Resonanzenergietransfer zur Untersuchung von SecY/YidC-Interaktionen

Die Methode der FRET-Messungen (Förster- oder Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer) macht sich den physikalischen Prozess der Energieübertragung von einem Farbstoff auf einen anderen zu Nutze. Der Effekt wurde 1946 von Theodor Förster beschrieben (Förster, 1946 und 1948). Hierbei wird ein sogenannter Donor-Fluoreszenzfarbstoff angeregt. Die Energie des Donors wird unter bestimmten Voraussetzungen nicht nur als Fluoreszenz wie oben beschrieben frei, sondern durch dipolare Wechselwirkungen teilweise auf einen sogenannten Akzeptor-Fluoreszenzfarbstoff strahlungsfrei übertragen (Hochreiter *et al.*, 2015). Förster geht davon aus, dass sich die Fluorophore wie schwingende elektrische Dipole verhalten, die in Resonanz treten und Energie von einem auf den anderen übertragen können (Förster, 1946 und 1948).

In Abbildung 15 ist diese Energieübertragung im Jablónski-Diagramm dargestellt. Der Übergang vom S_1 -Schwingungsgrundzustand zu höher angeregten Schwingungszuständen des S_0 -Zustands des Donor-Farbstoffs erfolgt anders als in Abbildung 14 beschrieben nicht nur durch messbare Fluoreszenz (Abbildung 15, grün). Ein Teil der Energie wird strahlungsfrei auf den Akzeptor-Farbstoff übertragen (FRET, Abbildung 15, grau). Dadurch wird der Akzeptor-Farbstoff angeregt. Entsprechend den energetischen Übergängen beim Donor-Farbstoff fällt auch das Elektron des Akzeptor-Farbstoffs auf energetisch günstigere Niveaus zurück. Ein Teil der Energie wird dabei als Fluoreszenz (Abbildung 15, rot) frei (Hochreiter *et al.*, 2015). Durch die Energieübertragung sinkt das Fluoreszenzsignal des Donor-Farbstoffs, das des Akzeptors steigt an.

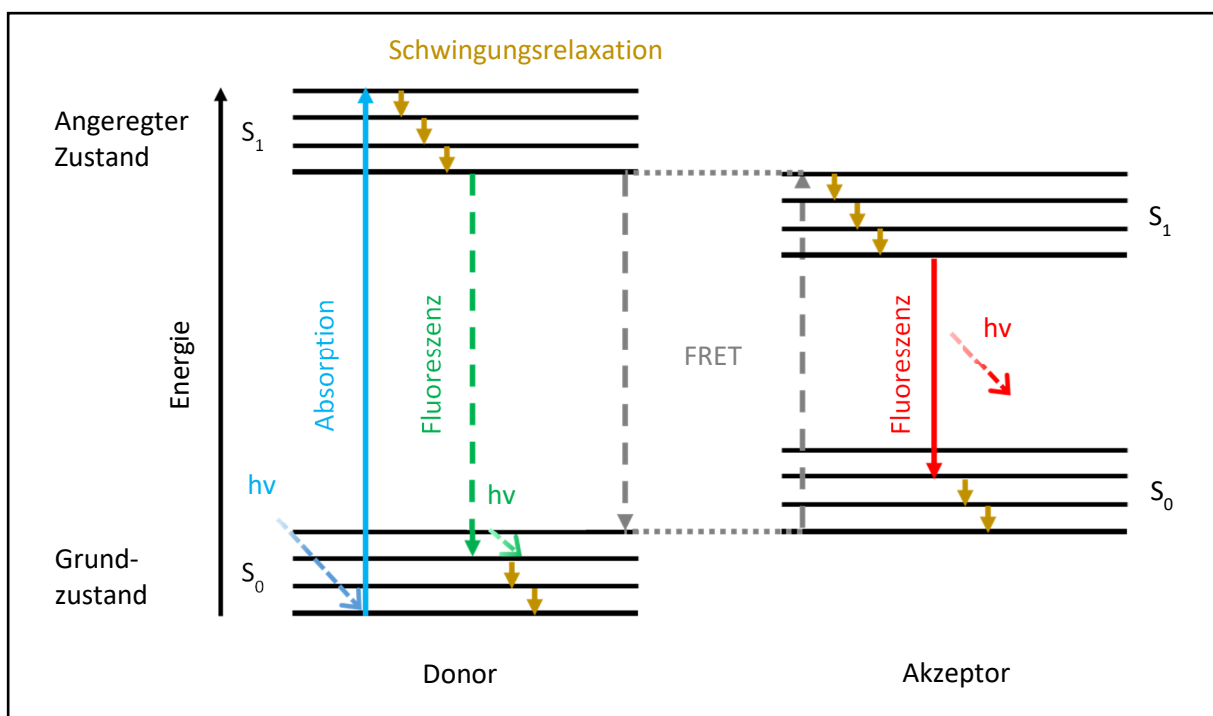


Abbildung 15: Jablónski-Diagramm mit strahlungsfreiem Energietransfer (FRET). Durch die Absorption eines Anregungsphotons ($h\nu$) wird ein Elektron des Donor-Farbstoffs aus seinem Grundzustand S_0 in einen angeregten Zustand S_1 angehoben (blau). Der Übergang vom S_1 -Schwingersgrundzustand zu höher angeregten Schwingungszuständen des S_0 -Niveaus erfolgt durch Fluoreszenz (grün). Anders als in Abbildung 14 wird aber nur ein Teil der Fluoreszenz als messbare Strahlung abgegeben. Der andere Teil der Energie wird strahlungsfrei auf den Akzeptor-Farbstoff übertragen (FRET, grau), der angeregt wird. Auch in diesem Fall ist der angeregte Zustand energetisch ungünstig und das Elektron fällt durch Relaxation (ocker) und Fluoreszenz (rot) in seinen S_0 -Schwingersgrundzustand zurück.

Für den Energietransfer gibt es drei Voraussetzungen, die erfüllt sein müssen, damit dieser stattfindet:

1. Überlappung der Emissions- und Absorptionsspektren

Die Voraussetzung für den Energietransfer ist zum einen, dass das Spektrum der Donor-Emission mit dem Spektrum der Akzeptor-Absorption überlappt (Abbildung 16A, 17C). Das heißt, die Wellenlänge der Donor-Fluoreszenz muss mit der Wellenlänge übereinstimmen, bei der der Akzeptor angeregt wird (Bajar *et al.*, 2016; Hochreiter *et al.*, 2015). Der Donor ist immer kurzwelliger (high-energy fluorophore) als der Akzeptor (lower-energy fluorophore) (Hohlbein *et al.*, 2014). In dieser Arbeit wurden die Fluoreszenzfarbstoffe ATTO520 (Donor), der sein Absorptionsmaximum bei 516 nm und sein Fluoreszenzmaximum bei 538 nm hat (Abbildung 17A), und ATTO647N (Akzeptor), welcher bei 644 nm maximal absorbiert und bei 669 nm sein Fluoreszenzmaximum zeigt (Abbildung 17B), als FRET-Paar verwendet (ATTO-TEC, 2009).

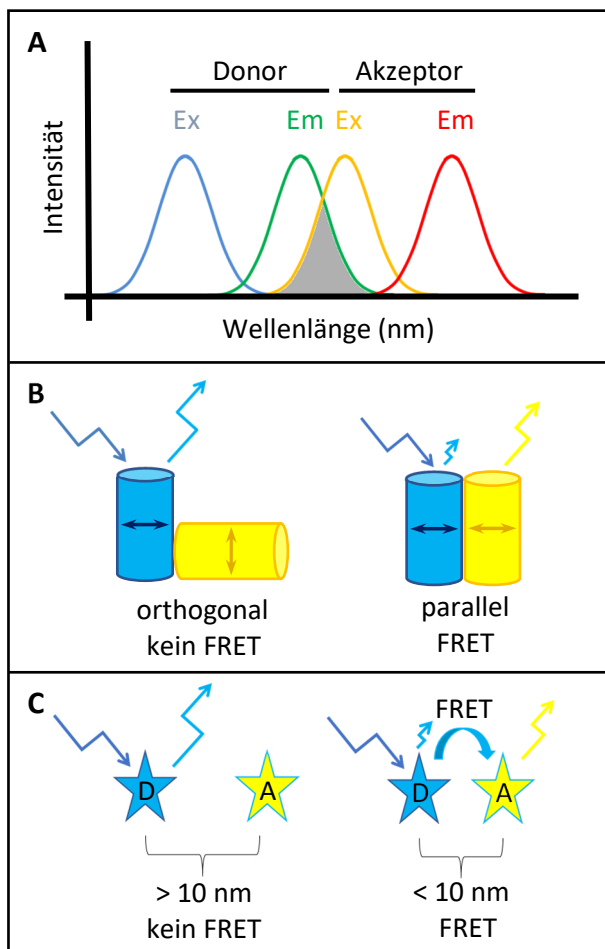


Abbildung 16: Bedingungen für FRET. Die Voraussetzungen für einen strahlungsfreien Energietransfer von einem Donor-Fluorophor auf ein Akzeptor-Fluorophor sind (A) die Überlappung (grau) des Donor-Emissionsspektrums (Em, grün) mit dem Akzeptor-Absorptionsspektrum (Ex, gelb), (B) die Orientierung der Dipolmomente und (C) die unmittelbare Nähe der FRET-Partner.

2. Orientierung der Dipolmomente

Die Vektoren der Schwingungsebenen der Dipole müssen parallel zueinander orientiert sein, um Energie von einem auf den anderen übertragen zu können (Abbildung 16B). Bei einer orthogonalen Anordnung findet kein Energietransfer statt (Förster, 1946 und 1948).

3. Abstandsabhängigkeit

Die Energietransferrate ist zudem besonders vom Abstand r zwischen den beiden Fluorophoren abhängig. Die Abhängigkeit des Abstands geht mit der sechsten Potenz in die Berechnung der Effizienz des Energietransfers ein. FRET ist also nur effizient, wenn sich Donor und Akzeptor in unmittelbarer Nähe zueinander befinden (Bajar *et al.*, 2016; Förster, 1948; Hochreiter *et al.*, 2015). Bei den typischen FRET-Farbstoffen wird die FRET-Effizienz bei einem Abstand über 10 nm unbedeutend klein (Abbildung 16C).

Der Abstand, bei dem die FRET-Effizienz 50 % beträgt, also die Energietransferrate genauso groß ist wie die Donor-Fluoreszenzrate, wird Förster-Radius R_0 genannt (Hochreiter *et al.*, 2015). Bei dem hier verwendeten FRET-Farbstoffpaar ATTO520/ATTO647N beträgt der Förster-Radius $R_0 = 53 \text{ \AA}/5,3 \text{ nm}$ (ATTO-TEC, 2009). Durch diese Abstandsabhängigkeit kann FRET als optischer Abstandsmesser in den Dimensionen von biologischen Makromolekülen genutzt werden. Das Auflösungsvermögen liegt dabei deutlich unterhalb konventioneller optischer Methoden wie der Mikroskopie. Die Eigenschaft der Abstandsabhängigkeit wurde sich in dieser Arbeit zu Nutze gemacht, um Interaktionen von SecY und YidC *in vitro* zu untersuchen.

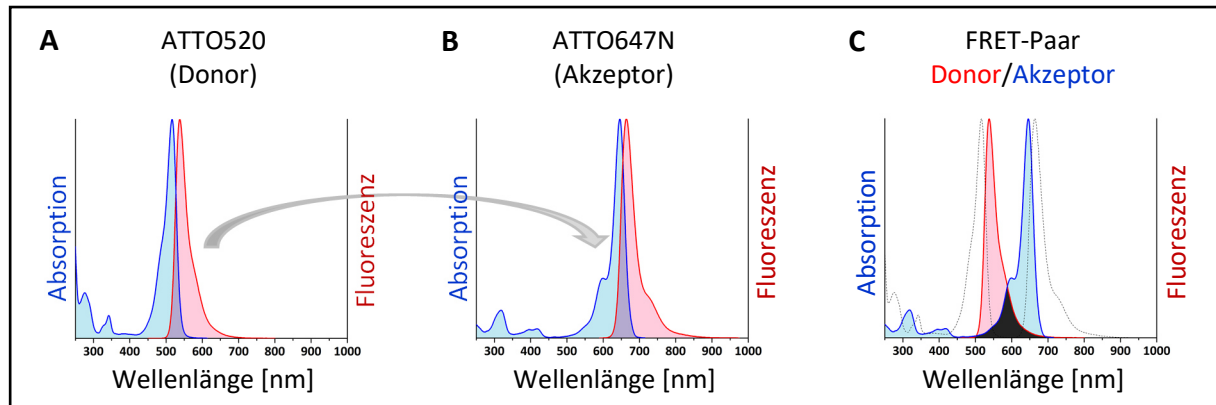


Abbildung 17: Absorptions- und Fluoreszenzspektren des verwendeten FRET-Paares ATTO520/ATTO647N (ATTO-TEC, 2009). Die Absorptionsspektren von ATTO520 (A) und ATTO647N (B) sind blau dargestellt, die Fluoreszenzspektren rot. (C) Das Fluoreszenzspektrum des Donors ATTO520 (rot) überlappt mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors ATTO647N (blau).

1.4 Ziele der Arbeit

Der Transport von Proteinen in und über die Cytoplasmamembran ist ein essentieller Prozess in allen Zellen. Zu verstehen, wie der molekulare Mechanismus des Proteintransports funktioniert und wie die einzelnen Komponenten miteinander interagieren, ist von zentraler Bedeutung in der Membranbiochemie. Ein Großteil der Proteine der inneren Membran gelangen über die Sec-Translokase und die YidC-Insertase in die Membran. SecY sowie YidC können unabhängig voneinander oder in Zusammenarbeit miteinander agieren. Es wird vermutet, dass hierfür das *lateral gate* von SecY mit der hydrophoben Rutsche von YidC in Kontakt steht. Viele strukturelle Details des Insertionsprozesses sind bereits bekannt. Wie die Kooperation von SecY und YidC genau abläuft, ist noch nicht geklärt.

Ein Ziel dieser Arbeit war, Kontaktstellen zwischen dem SecY *lateral gate* und der hydrophoben Rutsche von YidC *in vivo* zu bestimmen. Daher wurden Einzelcystein-Mutanten an möglichen Interaktionspositionen generiert und diese über Disulfid-Cross-Linking untersucht.

Der zweite Teil der Arbeit befasst sich ebenfalls mit der Kooperation zwischen SecY und YidC, allerdings wurden die Proteine hier *in vitro* über FRET-Messungen genauer betrachtet. Unter anderem wurden die Affinität und die Stöchiometrie der SecY/YidC-Interaktion in Detergens sowie in Proteoliposomen über FRET-Analysen bestimmt. Um die Kontaktstellen an der hydrophoben Rutsche von YidC genauer zu analysieren, wurden Messungen mit einer Fünffach-Serinmutante von YidC (YidC 5S), die Serin-Substitutionen in den Transmembrandomänen 3-5 aufweist, im Vergleich zum Wildtyp durchgeführt.

Um sicherzustellen, dass SecY und YidC *in vitro* in der richtigen Stöchiometrie, in unmittelbarer Nähe und der richtigen Orientierung zueinander vorlagen, wurde ein Fusionsprotein kloniert und ebenfalls in Fluoreszenz-Experimenten eingesetzt. Mit diesem Fusionsprotein wurden außerdem die Insertion und Faltung der Laktose-Permease in Proteoliposomen analysiert. Dies wurde mit der Einzel-Molekül-Kraftspektroskopie von einer Arbeitsgruppe der ETH Zürich in einer Zusammenarbeit mit unserem Institut durchgeführt. In zukünftigen Experimenten kann daher der molekulare Mechanismus der SecYEG/YidC vermittelten Membraninsertion an einem rekonstituierten System genauer studiert werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Kulturmedien und Zusätze

2.1.1 LB-Medium (Luria Bertani)

10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl

Der pH-Wert wird mit NaOH auf 7,5 eingestellt. Sollen LB-Agar-Platten gegossen werden, werden außerdem 15 g/L Agar zugegeben. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf etwa 60°C können Antibiotika und andere Zusätze zugegeben werden.

2.1.2 M9 Minimalmedium für *Pulse-labeling* Experimente

M9 Minimalmedium

Für 50 mL des Minimalmediums werden 38 mL H₂O_{dd} vorgelegt und folgendes zugegeben: 5 mL 10x M9 Salzlösung, 50 µL 1 M MgSO₄, 5 µL 1 M CaCl₂, 5 mL Aminosäuremix (19 AS -Met), 250 µL Thiamin/Vitamin B1 (1 mg/ml), 250 µL Eisencitrat (0,1 % Eisen(III)-Ammoniumcitrat), 500 µL 40 % Glukose. Nach dem Auffüllen auf 50 mL mit H₂O_{dd} wird das Medium sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

10x M9 Salzlösung

60 g/L Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 30 g/L KH₂PO₄, 10 g/L NH₄Cl, 5 g/L NaCl

Aminosäuremix ohne L-Met (19 AS - Met)

Im Aminosäuremix liegen alle 19 Aminosäuren in einer Konzentration von 1 mM vor. Hierfür werden 2 mL der Tyrosinlösung, je 100 µL der 100 mM Aminosäurelösungen und je 200 µL der 50 mM Lösungen (Tabelle 1) mit 6 mL H₂O_{dd} gemischt und mit 10 µL HCl_{konz.} neutralisiert.

Tabelle 1: Masse und Molarität für die einzelnen Aminosäurelösungen

Aminosäure	Masse für 1,5 mL H ₂ O _{dd} [mg] * in 1,5 mL 0,5 N HCl ** in 10 mL 0,1 N NaOH	Molarität [mM]
Alanin	89,09	100
Arginin	15,8	50
Asparagin	19,825	100
Aspartat	19,965*	100
Cystein	18,18	100
Glutamin	21,915	100
Glutamat	11,03	50
Glycin	11,26	100
Histidin	31,44	100
Isoleucin	19,68	100
Leucin	19,68	100
Lysin	27,39	100
Phenylalanin	24,78	100
Prolin	17,265	100
Serin	15,765	100
Threonin	17,865	100
Tryptophan	15,315	50
Tyrosin	9,06**	5
Valin	17,565	100

2.1.3 SOB-Medium für Transformationen

20 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 0,6 g/L NaCl, 2,5 mM KCl

Der pH-Wert wird mit NaOH auf 7,0 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wird 10 mM MgCl₂ zugegeben. Das SOB-Medium wird aliquotiert bei -20°C gelagert.

2.1.4 Antibiotika

Tabelle 2: Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin (Amp)	200 mg/mL in 50 % Ethanol	100-200 µg/mL
Chloramphenicol (Cap)	25 mg/mL in 100 % Ethanol	12,5-25 µg/mL

2.1.5 Zucker

Tabelle 3: Zucker

Zucker	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Arabinose (Ara)	20 %	0,2 %
Glukose (Glc)	40 %	0,2 %

2.2 Bakterienstämme

2.2.1 *Escherichia coli* XL-1 Blue (Stratagene GmbH)

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (r_K⁻ m_K⁺) supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]

Der Tetrazyklin-resistente *E. coli*-Stamm XL-1 Blue eignet sich durch die Endonuklease (*endA*)- und Rekombinations (*recA*)-Defizienz sowie die *hsdR*-Mutation für die Vervielfältigung und Isolation von Plasmid-DNA. Durch die Mutation des *lacZ*-Gens (ZΔM15) ist eine Blau-Weiß-Selektion möglich.

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

E. coli B F⁻ *dcm ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal λ* (DE3) + weitere nicht genau definierte Mutationen (=Genotyp BL21(DE3) + weitere nicht genau definierte Mutationen)

Der *E. coli* B Stamm C43(DE3) ist ein Derivat von C41(DE3), der wiederum von BL21(DE3) (Studier & Moffatt, 1986) abstammt. C41(DE3) und C43(DE3) wurden in einem Screening selektiert, in dem Derivate von BL21 mit verbesserter Toleranz gegenüber toxischen Proteinen und einer hohen Expression von Membranproteinen isoliert werden sollten. Die Stämme tragen Mutationen, die zu einer verbesserten Überexpression von toxischen und Membranproteinen beitragen, die in BL21 nicht exprimiert werden oder zum Zelltod führen. Wagner *et al.* konnten zeigen, dass der Schlüssel zur verbesserten Membranprotein-Überexpression der Walker-Stämme Mutationen im T7 RNA Polymerase-Promotor *lacUV5* sind, die zu einer schwächeren Expression der Polymerase und damit zu einer langsameren Expression der Zielproteine führen (Wagner *et al.*, 2008b). C41 und C43 können teils unterschiedliche Proteine überexprimieren. Gene, die unter Kontrolle des T7-Promotors liegen, können exprimiert werden (DE3).

2.2.3 *Escherichia coli* Lemo21(DE3) (Schlegel *et al.*, 2012; Wagner *et al.*, 2008b)

E. coli B F⁻ *dcm ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal λ* (DE3) + pLemo (=Genotyp BL21(DE3) + pLemo)
pLemo = pACYC184-*PrhaBAD-lysY*

Der *E. coli* Stamm Lemo21(DE3) ist ein Expressionssystem für schwierige Targets wie Membranproteine. Die genauere Charakterisierung der Walker-Stämme erlaubte Wagner *et al.* (2008b) die Entwicklung eines in der Expression von Proteinen einstellbaren Stammes. Hierfür wurde BL21(DE3) mit dem sogenannten Lemo-System (pLemo) transformiert. Das Plasmid pLemo ist ein pACYC-Plasmid, auf dem das Gen des T7 RNA Polymerase-Inhibitors T7Lys (K128Y) unter die Kontrolle eines L-Rhamnose induzierbaren Promotors gestellt wurde. Durch die Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von Rhamnose kann die Expression der T7 RNA Polymerase angepasst und somit die Expression des Zielproteins kontrolliert werden. Durch eine langsamere Expression von Membranproteinen kann eine Sättigung des Sec-Systems und damit die Aggregation des Zielproteins und anderer Membranproteine verhindert werden. Durch die Abstimmung von Translation und Membraninsertion werden

toxische Effekte der Überexpression minimiert, was zu einer höheren Biomasse und damit zu einer höheren Proteinausbeute führt.

2.2.4 *Escherichia coli* BL21.19 (DE3) (Mitchell & Oliver, 1993)

secA13(Am) supF(Ts) trp(Am) zch::Tn10 recA::CAT clpA::KAN

E. coli BL21.19 (DE3) ist ein Derivat von BL21 (DE3) (Studier & Moffatt, 1986). Das chromosomale *secA*-Gen trägt eine *Amber*-Mutation an Position 13. Dies führt bei nicht-permissiven Wachstumsbedingungen (37°C und 42°C) zu einem verkürzten nicht-funktionalen SecA. Bei permissiven Bedingungen (30°C) wird der Temperatur-sensitive *Amber*-Suppressor *supF* exprimiert, die Transkription des *secA*-Gens wird nicht unterbrochen und die Temperatur-sensitive Mutante wächst. Der Stamm ist somit für die Expression und Reinigung von SecA-abhängigen Präproteinen wie proPhoA (Zhang *et al.*, 2013) geeignet. Durch Ausschalten von *secA* bleibt das Protein als Präprotein erhalten anstatt transloziert und prozessiert zu werden.

2.2.5 *Escherichia coli* SF100 (Baneyx & Georgiou, 1990; Meerman & Georgiou, 1994)

F⁻ ΔlacX74 galE galk thi rpsL (Str^r) ΔphoA ΔompT

Der *E. coli* Stamm SF100 entstand durch die Deletion von *ompT* im Stamm KS272. Durch die Abwesenheit der Protease OmpT, durch die SecY in der C4-Domäne geschnitten wird, ist der Stamm für die Expression und anschließende Reinigung von SecY geeignet.

2.2.6 *Escherichia coli* MK6S (Klenner *et al.*, 2008)

F⁻ Δ(ara-leu)7697 [araD139]_{B/r} Δ(codB-lacI)3 galk16 galE15 λ⁻ e14⁻ mcrA0 relA1 rpsL150(Str^r) spoT1 mcrB1 hsdR2(r^{m+}) (ΔPYidC, araC-PBAD)

Bei dem *E. coli* Stamm MK6S handelt es sich um einen Depletionsstamm (*depletion* (englisch) = Auszehrung/Abbau), der mithilfe der Datsenko/Wanner-Methode hergestellt wurde (Datsenko & Wanner, 2000; Meynial-salles *et al.*, 2005). Das chromosomale *yidC*-Gen steht unter Kontrolle des *araBAD*-Promotors, wodurch der Stamm Arabinose-abhängig ist. Durch Zugabe von Arabinose wird die YidC-Expression induziert, durch Glukose-Zugabe ist

eine Depletion möglich. Der Stamm eignet sich daher für YidC-Komplementationstests und Versuche, bei denen nur ein Plasmid-codiertes YidC anwesend sein soll.

2.2.7 *Escherichia coli* AF659 (Baba *et al.*, 1990; Pogliano *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 2005)

F^- *araD139* Δ (*argF-lac*)169 *rpsL150 relA1 flhD5301 deoC1 fruA25 rbsR22 secY39*

Der *E. coli* Stamm AF659 (SecY cs) ist ein Derivat des *E. coli* K-12 Stamms MC4100, der die *secY39*-Mutation (R357H, cytoplasmatische Domäne 5) trägt. Durch diese Mutation werden die Zellen Kälte-sensitiv (cs = cold sensitive). Auf eine Temperaturverschiebung von 37°C auf 15-23°C reagieren die Zellen schnell. Die Proteinsekretion wird bei Erreichen nicht-permissiver Temperaturen innerhalb einer Minute verlangsamt. Die Zellen wachsen bei 37°C, bei 20°C kann kein Wachstum beobachtet werden. Der Stamm eignet sich daher für SecY-Komplementationstests.

2.3 Plasmide und verwendete Mutanten

Tabelle 4: Plasmid-Liste

Vektor	Insert	erhalten von	Quelle
pGZ119EH	<i>E. coli</i> YidC	Dorothee Kiefer	pGZ: Lessl <i>et al.</i> , 1992
pMS119EH	<i>E. coli</i> YidC	Dorothee Kiefer	pMS: Balzer <i>et al.</i> , 1992; Strack <i>et al.</i> , 1992
pTrc99A			Amann <i>et al.</i> , 1988
	<i>E. coli</i> SecYEG	Tassos Economou/ Dorothee Kiefer	van der Does <i>et al.</i> , 1998; Kaufmann <i>et al.</i> , 1999
	<i>E. coli</i> SecY-YidC SecEG	diese Arbeit	diese Arbeit
pET22b	<i>E. coli</i> proPhoA	Tassos Economou	Gouridis <i>et al.</i> , 2009

2.3.1 *E. coli* SecY Mutanten

Tabelle 5: *E. coli* SecY Mutanten

Vektor	Gen	Bezeichnung	Mutation	His-Tag
<i>in vivo</i> Cross-Linking-Experimente:				
pTrc99a	<i>E. coli</i> SecY(EG)	SecY C ₀	C329A, C385S	10x, N-term.
pTrc99a	<i>E. coli</i> SecY(EG)	SecY 122C	C329A, C385S, Y122C	10x, N-term.
pTrc99a	<i>E. coli</i> SecY(EG)	SecY 123C	C329A, C385S, G123C	10x, N-term.
pTrc99a	<i>E. coli</i> SecY(EG)	SecY 124C	C329A, C385S, T124C	10x, N-term.
pTrc99a	<i>E. coli</i> SecY(EG)	SecY 328C	C329A, C385S, F328C	10x, N-term.
<i>in vitro</i> FRET-Experimente:				
pTrc99a	<i>E. coli</i> SecY(EG)	SecY 142C	C329A, C385S, M142C	10x, N-term.

2.3.2 *E. coli* YidC Mutanten

Tabelle 6: *E. coli* YidC Mutanten

Vektor	Gen	Bezeichnung	Mutation	His-Tag
<i>in vivo</i> Cross-Linking-Experimente:				
pGZ119EH	<i>E. coli</i> YidC	YidC 18C	C423S, M18C	10x, C-term.
pGZ119EH	<i>E. coli</i> YidC	YidC 428C	C423S, I428C	10x, C-term.
pGZ119EH	<i>E. coli</i> YidC	YidC 429C	C423S, Q429C	10x, C-term.
pGZ119EH	<i>E. coli</i> YidC	YidC 430C	C423S, M430C	10x, C-term.
pGZ119EH	<i>E. coli</i> YidC	YidC 431C	C423S, P431C	10x, C-term.
pGZ119EH	<i>E. coli</i> YidC	YidC 432C	C423S, I432C	10x, C-term.
pGZ119EH	<i>E. coli</i> YidC	YidC 433C	C423S, F433C	10x, C-term.
pGZ119EH	<i>E. coli</i> YidC	YidC 434C	C423S, L434C	10x, C-term.
pGZ119EH	<i>E. coli</i> YidC	YidC 498C	C423S, M498C	10x, C-term.
pGZ119EH	<i>E. coli</i> YidC	YidC 499C	C423S, P499C	10x, C-term.
pGZ119EH	<i>E. coli</i> YidC	YidC 500C	C423S, V500C	10x, C-term.
pGZ119EH	<i>E. coli</i> YidC	YidC 501C	C423S, I501C	10x, C-term.
<i>in vitro</i> FRET-Experimente:				
pMS119EH	<i>E. coli</i> YidC	YidC WT	-	10x, C-term.
pMS119EH	<i>E. coli</i> YidC	YidC 23C	C423S, W23C	10x, C-term.
pGZ119EH	<i>E. coli</i> YidC	YidC 23C/5S	C423S, W23C, M430S, A435S, P468S, F505S, F509S	10x, C-term.

2.3.3 *E. coli* SecY-YidC-Fusionsprotein

Tabelle 7: *E. coli* SecY-YidC-Fusionsprotein

Vektor	Gen	Bezeichnung	Mutation	His-Tag
<i>in vitro</i> FRET-Experimente:				
pTrc99a	<i>E. coli</i> SecY-YidC SecEG	SecY-YidC	SecY: C329A, C385S YidC: C423S	10x, N-term. 10x, C-term.

2.3.4 *E. coli* proPhoA

Tabelle 8: *E. coli* proPhoA

Vektor	Gen	Bezeichnung	Mutation	His-Tag
<i>in vitro</i> FRET-Experimente:				
pET22b	<i>E. coli</i> proPhoA	proPhoA 1-221	1-221: C190A, C200A; 222C, 223L, 224E	6x, C-term.

2.4 Antikörper

Antikörper für Immunoblotting

Tabelle 9: Primäre Antikörper für Immunoblots

Antikörper	Herkunft	Arbeitskonzentration	Hersteller
anti-His IgG	Maus	1:7500 in PBS-T	Sigma-Aldrich
anti-YidC (YidC100)	Kaninchen	1:7500 in PBS-T	Institutsbestand
anti-SecY	Kaninchen	1:7500 in PBS-T	Arbeitsgruppe Koch, Freiburg
anti-SecE	Kaninchen	1:1000 in PBS-T	Arbeitsgruppe Koch, Freiburg
anti-SecG	Kaninchen	1:1000 in PBS-T	Arbeitsgruppe Koch, Freiburg

Tabelle 10: Sekundäre Antikörper für Immunoblots (Peroxidase-gekoppelt)

Antikörper	Herkunft	Arbeitskonzentration	Hersteller
anti-Maus IgG	Ziege	1:10000 in PBS-T	Sigma-Aldrich
anti-Kaninchen IgG	Ziege	1:10000 in PBS-T	Sigma-Aldrich

Antikörper für die Immunpräzipitation

Tabelle 11: Antikörper für die Immunpräzipitation

Antikörper	Herkunft	Einsatz (pro 400 µL Zellen)	Hersteller
anti-YidC (YidC100)	Kaninchen	1 µL	Institutsbestand

2.5 Molekularbiologische Methoden**2.5.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen (RbCl-Methode)**

Mit einer Über-Nacht-Kultur der Zellen werden 50 mL Medium 1:100 angeimpft und die Kultur bis zum Erreichen einer Optischen Dichte (OD_{600nm}) von 0,6 inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Eis (ca. 20 min) wird die Kultur zentrifugiert (3000g, 5 min, 4°C) und das Pellet in 6 mL eiskaltem TFB1-Puffer (30 mM KAc, 50 mM $MnCl_2$, 100 mM RbCl, 10 mM $CaCl_2$, 15 % Glycerin; pH 5,8 mit 2 N Essigsäure) resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 90 min auf Eis wird erneut zentrifugiert und das Pellet in 1,5 mL eiskaltem TFB2-Puffer (10 mM Na-MOPS pH 7,0, 75 mM $CaCl_2$, 10 mM RbCl, 15 % Glycerin; pH 7,0 mit HCl) aufgenommen. Die Zellen werden aliquotiert und anschließend direkt für eine Transformation eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.5.2 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen

Ein Zell-Aliquot wird auf Eis aufgetaut, 1 µL Plasmid-DNA dazu pipettiert und vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubation von 30-60 min auf Eis wird für 1,5 min ein Hitzeschock bei 42°C durchgeführt und die Zellen anschließend sofort wieder für 2 min auf Eis gestellt. Zur Ausbildung der Antibiotika-Resistenz werden 200 µL SOB-Medium (ohne Antibiotika) zu den

Zellen gegeben und für 20-60 min bei 37°C geschüttelt. Die Zellsuspension wird auf LB-Agar-Platten (mit Antibiotikum zur Selektion) ausplattiert.

2.5.3 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* XL-1 Blue-Zellen wird das Monarch Plasmid Miniprep Kit von NEB nach Handbuch verwendet. Eluiert wird mit 30-40 µL H₂O_{dd}.

Die Konzentration und Reinheit der isolierten Plasmid-DNA werden mit dem NanoDrop™ 2000c Spektrophotometer von Thermo Scientific bestimmt.

2.5.4 Zielgerichtete Mutagenese (QuikChange)

Der PCR-Ansatz und der PCR-Ablauf setzen sich wie folgt zusammen:

<i>PCR-Ansatz</i>	Stammlösung	Volumen
DNA-Template		1 µL
Forward-Primer	10 µM	1 µL
Revers-Primer	10 µM	1 µL
dNTP-Mix	10 mM	1,25 µL
PfuUltra II Reaktionspuffer	10X	5 µL
PfuUltra II Fusion HS DNA-Polymerase (Agilent)		1 µL
H ₂ O _{dd}		ad 50 µL

<i>PCR-Ablauf</i>	Temperatur	Zeit	PCR-Schritt	Anmerkung
1	95°C	2 min	Denaturierung	
2	95°C	30 sec	Denaturierung	5-10°C unter Primer-T _m
3		30 sec	Primer- <i>Annealing</i>	
4		X	Elongation	
5	72°C	10 min	finale Elongation	
6	12°C	∞		

Nach der PCR wird die methylierte Template-DNA mit dem Restriktionsenzym *DpnI* (New England BioLabs, NEB) geschnitten. Hierfür wird 1 µL *DpnI* zum PCR-Ansatz zugegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wird die DNA mit Ethanol gefällt und *E. coli*

XL-1 Blue-Zellen transformiert. Alternativ kann ohne Ethanol-Fällung direkt mit 5 μL transformiert werden.

2.5.5 Ethanol-Fällung von Plasmid-DNA

Dem PCR-Ansatz der Mutagenese werden 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,3) zugefügt und 45 min bei -20°C gefällt. Nach der Zentrifugation (16000g, 4°C , 20 min) wird der Überstand abgenommen. Letzte Reste des Überstands werden bei 60°C für ca. 5 min verdampft. Die DNA wird in 10 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ aufgenommen und mit dem gesamten Ansatz 100 μL kompetente *E. coli* XL-1 Blue-Zellen transformiert.

2.5.6 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA wird von der Firma SEQLAB - Sequence Laboratories Göttingen GmbH durchgeführt. Hierzu werden 480-1200 ng Plasmid-DNA mit 3 μL Primer (10 mM) gemischt, auf 15 μL mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ aufgefüllt und an SEQLAB geschickt.

2.5.7 Restriktionsverdau von DNA

Zur Klonierung von DNA-Konstrukten werden die DNA, die als Vektor dienen soll, und die DNA, die das Insert trägt, welches in den Vektor kloniert werden soll, mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen (Thermo Fisher Scientific, NEB) geschnitten. Bei der späteren Überprüfung der Klonierung wird ein Kontrollverdau durchgeführt. Der Restriktionsverdau setzt sich wie folgt zusammen:

<i>Restriktionsverdau</i>	Vektor	Insert	Kontrollverdau
Plasmid-DNA	7 μL	16 μL	3-4 μL
Reaktionspuffer (10x)	1 μL	2 μL	0,5 μL
Restriktionsenzym 1	1 μL	1 μL	0,5 μL
Restriktionsenzym 2	1 μL	1 μL	
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	ad 10 μL	ad 20 μL	ad 5 μL

Die Ansätze werden bei 37°C für zwei bis drei Stunden inkubiert, anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen und der Größe nach aufgetrennt (2.5.8).

2.5.8 Agarose-Gelelektrophorese

Plasmid-DNA, die zuvor geschnitten wurde, kann auf einem Agarosegel der Größe nach aufgetrennt werden. Hierfür wird, je nach Größe der DNA-Fragmente, 0,7-1 % Agarose in 40 mL 1x TBE-Puffer (10x TBE: 0,89 M Trizma Base, 0,89 M Borsäure, 0,02 M EDTA, pH 8,0) aufgekocht. Nach dem Abkühlen (ca. 10 min) wird die Lösung mit 3 µL Ethidiumbromid (10 mg/mL) in den Gelschlitten gegossen und der Kamm gesetzt. Nach dem Polymerisieren wird der Kamm gezogen, die Pufferkammer mit TBE-Puffer befüllt und die DNA-Proben mit Probenladepuffer aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei 100 V. Das DNA-Bandenmuster kann unter UV-Licht detektiert werden. Wird die geschnittene DNA für eine Ligation benötigt, wird sie aus dem Gel extrahiert (Gelextraktionskit nach Handbuch: GeneJET™ Gel Extraction Kit, Fermentas) und anschließend ligiert (2.5.9).

2.5.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation werden die aus dem Agarosegel extrahierte geschnittene Vektor-DNA und die Insert-DNA im Verhältnis 1:3 gemischt (Gesamtvolumen 17 µL) und 2 µL Ligase-Reaktionspuffer (10x) sowie 1 µL T4 DNA-Ligase (Promega) zu einem Gesamtvolumen von 20 µL zugegeben. Als Kontrollansatz kann ein zweiter Ansatz ohne Insert angesetzt werden. Nach einer Inkubation bei 4°C über Nacht (alternativ drei Stunden bei Raumtemperatur) wird die Ligase bei 70°C für 10 min inaktiviert. Nach Transformation von *E. coli* XL-1 Blue-Zellen mit dem Ligationsansatz wird die Plasmid-DNA isoliert, mittels eines Kontrollverdaus die Größe des Konstrukts überprüft und sequenziert.

2.5.10 TCA-Fällung von Proteinen

Zur Fällung von Proteinen mittels Trichloressigsäure (TCA) wird die Proteinprobe mit 15-20 % TCA versetzt und über Nacht bei 4°C oder für eine Stunde auf Eis oder für 15 min bei -20°C inkubiert. Anschließend wird 10 min bei 16000g und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet mit eiskaltem Aceton gewaschen. Hierfür wird das Pellet in Aceton aufgenommen, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das restliche Aceton wird bei 65°C für ca. 5 min verdampft und das Proteinpellet in SDS-Probenpuffer (2.5.11) aufgenommen.

2.5.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine ihrer Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel besteht aus einem Sammelgel, in dem die Proteine konzentriert werden, um schärfere Banden zu erhalten, und einem Trenngel, in dem die Auftrennung erfolgt. Die beiden Gellösungen setzen sich wie in Tabelle 12 aufgeführt zusammen.

Tabelle 12: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Lösungen

	Stammlösung	Arbeitskonzentration	
		Trenngel	Sammelgel
Acrylamid	30 % (w/v) Acrylamid:0,8 % (w/v) Bis-Acrylamid (37,5:1)	10/12/15 %	5,1 %
Tris-HCl pH 8,8	2 M	375 mM	-
Tris-HCl pH 6,8	1 M	-	125 mM
SDS	25 %	0,1 %	0,025 %
TEMED	99 %	0,033 % (1:3000)	0,05 % (1:2000)
APS	10 %	0,05 %	0,05 %
H ₂ O _{dd}		ad gewünschtes Volumen	

Es ist zu beachten, dass TEMED und APS erst kurz vor dem Gießen dazu pipettiert werden, da anschließend die Polymerisation startet. Das Trenngel wird so gegossen, dass noch genügend Platz für das Sammelgel bleibt. Nach Gießen des Trenngels wird dieses mit Wasser überschichtet, um eine gerade Kante zu erhalten. Ist das Trenngel polymerisiert, wird das Wasser entfernt, das Sammelgel gegossen und der Kamm gesetzt. Wenn das Sammelgel ebenfalls fertig polymerisiert ist, wird der Kamm gezogen und die Taschen vorsichtig mit Wasser ausgespült. Das fertige Gel kann einige Tage eingepackt in befeuchteten Tüchern bei 4°C aufbewahrt oder direkt verwendet werden.

Hierfür wird es in die Gelelektrophorese-Apparatur eingebaut und diese mit 1x Gelelektrophorese-Laufpuffer befüllt (10x Laufpuffer: 250 mM Trizma base, 1,92 M Glycin, 1 % SDS). Die Proteinproben werden in SDS-Probenpuffer (Solution I : Solution II : 1 M DTT = 5:4:1 mit Solution I: 0,2 M Trizma base, 0,02 M EDTA-Na, pH 7; Solution II: 83,3 mM Trizma base, 8,3 % SDS, 29,16 % Glycin, 0,15 % Bromphenolblau;

nach Laemmli (Laemmli, 1970)) aufgenommen, 5 min bei 95°C gekocht und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Spannung für die Auftrennung richtet sich nach der verwendeten Apparatur. Das Gel wird im Anschluss mit Coomassie gefärbt oder ein Western Blot durchgeführt.

2.5.12 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Um die Proteinbanden auf einem SDS-Gel sichtbar zu machen, kann dieses mit Coomassie angefärbt werden. Dazu wird das Gel mit Coomassie-Färbelösung (0,2 % Coomassie R-250, 7,5 % Essigsäure, 50 % Ethanol) bedeckt, in der Mikrowelle kurz erhitzt und für 15 min leicht geschüttelt. Anschließend wird das Gel mit Wasser gespült und mit 10 %iger Essigsäure entfärbt. Durch Erhitzen wird das Entfärben beschleunigt.

2.5.13 Western Blot und Immundetektion von Proteinbanden

Bei einem Western Blot werden die durch eine Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran übertragen und das Zielprotein mit Antikörpern detektiert.

Semidry-Blotting

Das SDS-Gel und eine gleichgroße Membran (Nitrocellulose Blottingmembran, 0,2 µm) werden in Transferpuffer (10x Transferpuffer: 1,92 M Glycin, 250 mM Trizma base) getränkt. Das Gel wird auf die Membran und beides zwischen zwei ebenfalls in Transferpuffer getränkte Filterpapiere in die Blotting-Apparatur gelegt und die Luftblasen herausgedrückt. Nach Zusammenbau der Apparatur wird für eine Stunde bei 12 V geblottet.

Immundetektion

Nach dem Blotting werden freie Stellen auf der Membran mit einer 5 % Milchpulverlösung in PBS-T (10x PBS: 1,4 M NaCl, 27 mM KCl, 101 mM Na₂HPO₄, 18 mM KH₂PO₄, pH 6,8; PBS-T: 1x PBS, 0,1 % Tween 20) blockiert (eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C). Anschließend wird die Membran dreimal 5 min mit PBS-T gewaschen. Der primäre Antikörper (in PBS-T) wird für zwei bis drei Stunden mit der Membran inkubiert, die Membran anschließend wieder gewaschen und mit dem sekundären Enzym (HRP)-gekoppelten Antikörper bedeckt. Nach einer Stunde wird erneut gewaschen und das Substrat (Immobilon Western HRP Substrat, Millipore) für das Enzym HRP (Horseradish peroxidase) zugegeben. Die

Detektion erfolgt über Chemolumineszenz am ImageQuant LAS 500 oder ImageQuant LAS 4000.

2.5.14 Entfernen von Antikörpern von einer Membran

Soll eine Detektion mit einem weiteren Antikörper erfolgen, kann der bereits gebundene wieder entfernt werden. Hierfür wird Stripping-Puffer (0,1 M Glycin, 20 mM Magnesiumacetat, 50 mM KCl, pH 2,2) auf die Membran gegeben und diese bei Raumtemperatur 10 min leicht geschüttelt. Der Puffer wird ausgetauscht und nochmal 10 min inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS-T (dreimal 5 min) wird die Membran erneut mit Milchpulverlösung blockiert und der Immunoblot wie unter 2.5.13 beschrieben fortgeführt.

2.6 *In vivo* Komplementationstest

2.6.1 YidC-Komplementation

Um die Funktionalität von YidC-Mutanten zu überprüfen, wird ein *in vivo* Komplementationstest durchgeführt. Dazu wird der *E. coli* Stamm MK6S verwendet, dessen chromosomales *yidC*-Gen unter Kontrolle des *araBAD*-Promotors steht (Klenner *et al.*, 2008). Nur in Anwesenheit von Arabinose können die Zellen das chromosomale YidC exprimieren und wachsen.

Der Stamm wird mit Plasmiden, die das Gen einer YidC-Mutante oder das *yidC*-Wildtyp-Gen als Positiv-Kontrolle exprimieren, oder mit einem Vektor ohne Insert als Negativ-Kontrolle transformiert und Über-Nacht-Kulturen in je 3 mL LB-Medium (25 µg/mL Chloramphenicol), dem 0,2 % Arabinose und 0,4 % Glukose zugegeben wurde, angelegt. Am Folgetag werden die Kulturen zur Entfernung der Arabinose mit LB-Medium gewaschen und je 3 mL LB-Medium (25 µg/mL Chloramphenicol), angereichert mit 0,4 % Glukose, mit den gewaschenen Kulturen 1:200 angeimpft ($OD_{600nm} \leq 0,05$). Die Kulturen werden bei 37°C bis zum Erreichen einer Optischen Dichte (OD_{600nm}) von 1,0 geschüttelt. Um eine vollständige Depletion von YidC zu erreichen, müssen die Zellen mindestens drei Stunden in Abwesenheit von Arabinose und Anwesenheit von Glukose wachsen. Von den Kulturen werden Verdünnungsreihen in LB-Medium von 10^{-1} bis 10^{-4} angelegt und je 2 µL auf LB-Agar-Platten (25 µg/mL Chloramphenicol) aufgetragen, die entweder mit 0,2 % Arabinose (Kontrolle) oder 0,4 % Glukose zur Depletion des chromosomalen YidC versetzt wurden. Nach einer Inkubation bei

37°C über Nacht sollte unter Kontrollbedingungen (Arabinose) in allen Fällen Wachstum zu beobachten sein. Unter Depletionsbedingungen (Glukose) kann nur in Anwesenheit eines Plasmids, das für ein funktionales YidC codiert, die Bildung von Kolonien beobachtet werden.

2.6.2 SecY-Komplementation (Karamanou *et al.*, 2008)

Um zu testen, ob SecY-Mutanten funktional sind, wird ein *in vivo* Komplementationstest durchgeführt. Hierfür wird der *E. coli* Stamm AF659 verwendet, der die *secY39*-Mutation (R357H) enthält, durch die die Zellen Kälte-sensitiv werden, also bei 20°C nicht wachsen (Baba *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 2005). Die Zellen wachsen bei nicht-permissiven Temperaturen erst wieder, wenn ein funktionales SecY exprimiert wird.

Die AF659-Zellen werden mit Plasmiden, die das Gen einer SecY-Mutante oder das SecY C₀-Gen als Positiv-Kontrolle exprimieren, oder mit einem Vektor ohne Insert als Negativ-Kontrolle transformiert. Mit einer Über-Nacht-Kultur werden 3 mL LB-Medium (200 µg/mL Ampicillin) 1:100 angeimpft und bis zu einer Optischen Dichte (OD_{600nm}) von 0,5 bei 37°C wachsen gelassen. Von den Kulturen werden Verdünnungsreihen in LB-Medium von 10⁻¹ bis 10⁻⁴ angelegt und je 2 µL auf 2 LB-Agar-Platten (200 µg/mL Ampicillin) aufgetragen. Die Kontrollplatte wird über Nacht bei 37°C, die andere Platte für 72 Stunden bei 20°C inkubiert.

2.7 *In vivo* Cross-Links – Pulse-labeling und Immunopräzipitation

Expression, Pulse-labeling und Crosslink

Für die *in vivo* Crosslinks werden *E. coli* MK6S-Zellen mit den beiden Plasmiden, die das Gen für die Einzelcystein-Mutanten von YidC und SecY tragen, co-transformiert und Über-Nacht-Kulturen in 3 mL LB-Medium (200 µg/mL Ampicillin, 25 µg/mL Chloramphenicol), das mit 0,2 % Arabinose und 0,4 % Glukose versetzt wurde, angelegt. Am Folgetag werden die Kulturen zur Entfernung der Arabinose mit LB-Medium gewaschen und je 3 mL LB-Medium (100 µg/mL Ampicillin, 12,5 µg/mL Chloramphenicol), angereichert mit 0,4 % Glukose zur Depletion von YidC, mit den gewaschenen Kulturen 1:200 angeimpft (OD_{600nm} ≤ 0,05). Die Kulturen werden bei 37°C bis zum Erreichen einer Optischen Dichte (OD_{600nm}) von 0,4-0,5 geschüttelt. Um eine vollständige Depletion von YidC zu erreichen, müssen die Zellen mindestens drei Stunden in Abwesenheit von Arabinose und Anwesenheit von Glukose wachsen. Nach Erreichen der OD werden 400 µL der Zellen zweimal mit 400 µL 1x-M9-

Salzlösung (2.1.2) gewaschen (1 min, 6000g), in 400 μ L vorgewärmtem M9-Minimalmedium (2.1.2) aufgenommen, in Plastik-Kulturröhrchen überführt und 45-60 min bei 37°C geschüttelt. Durch Zugabe von 1 mM IPTG wird die Co-Expression der Einzelcystein-Mutanten von SecY und YidC induziert. Nach 20 min werden 2 μ L radioaktiv-markiertes [³⁵S]-(L)-Methionin (10 μ Ci/ μ L) zugegeben und weitere 3 min geschüttelt. Um die Cysteine der beiden Einzelcystein-Mutanten zu oxidieren, werden 200 μ M DTNB (Stammlösung: 5 mM in 100 mM Kalium-Phosphatpuffer pH 7,4) zugegeben. Nach 10 min werden die Proben mit TCA gefällt (2.5.10). Nach Trocknen der TCA-gefällten Pellets bei 95°C werden diese in 100 μ L 2 % SDS/10 mM Tris-Puffer (pH 8,0) resuspendiert und für 5 min bei 95°C gekocht.

Immunpräzipitation

Zu den gekochten Proben werden 1 mL kalter TENTX-Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 2% Triton-X 100, pH 8,0) und 20 μ L Staph A (Zysorbin, USBiological, 10 % in PBS) zugegeben und 45 min bei 4° auf dem Drehrad inkubiert, um unspezifisch an Staph A bindende Proteine zu entfernen. Nach Zentrifugation (5-10 min, 16000g, 4°C) der Proben wird der Überstand mit dem entsprechenden Antikörper (2.4) über Nacht auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von 30 μ L Staph A und einer weiteren Stunde auf dem Drehrad werden die Proben zweimal mit 1 mL TENTX-Puffer gewaschen (1 min, 6000g, 4°C) und anschließend in 1 mL TEN-Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen. Die Proben werden halbiert, zentrifugiert und der Puffer abgenommen (ein zweites Mal zentrifugieren, um restlichen Überstand komplett abzunehmen). Die Pellets werden in 30 μ L SDS-Probenpuffer aufgenommen: Die eine Hälfte der Pellets in Probenpuffer mit DTT zur Reduktion eventuell entstandener *Crosslink*-Produkte, die zweite Hälfte in Probenpuffer ohne DTT (ersetzt durch H₂O_{dd}).

Detektion radioaktiv-markierter Proteine

Nach Kochen der Proben bei 95°C für 5 min werden die Proben zentrifugiert (2 min 16000g) und der Überstand auf ein SDS-Acrylamid-Gel aufgetragen. Da die *gecross-linkten* Proben groß sind und dadurch schwer sowohl in die Taschen als auch in das Trenngel laufen, werden Gele mit 7 % Acrylamid im Trenngel und 3 % Acrylamid im Sammelgel verwendet. Nach der Auftrennung wird das Gel in Fixierlösung (45 % Ethanol, 10 % Essigsäure) für 30 min fixiert und anschließend für zwei Stunden unter Vakuum bei 80°C getrocknet. Der *Prestained*-Proteinmarker wird mit radioaktivem Abfall markiert, um ihn später detektieren zu können.

Das getrocknete Gel wird in einer Expositionskassette mit einer Phosphorspeicherfolie (Phosphor-Imaging-Platte, DÜRR MEDICAL) inkubiert. Die Energie der radioaktiven Strahlung wird von den Speicherleuchtstoffen aufgenommen. Nach ein bis drei Tagen wird die Bildspeicherplatte am CR-Scanner (CR 35 BIO, DÜRR MEDICAL) ausgelesen. Bei der Computer-Radiografie (CR) werden mithilfe eines Laserstrahls die Speicherzentren angeregt und die Strahlung in Form von sichtbarem Licht abgegeben. Dieses Licht wird vom Scanner in digitale Signale umgewandelt.

2.8 Protein-Reinigung

2.8.1 Reinigung von *E. coli* YidC

Expression und Zellernte

Für die Reinigung von YidC werden *E. coli* C43-Zellen, die mit dem entsprechenden YidC-His-Konstrukt transformiert wurden, in 2 L LB-Medium (100 µg/mL Ampicillin bzw. 12,5 µg/mL Chloramphenicol) angezogen. Hierfür werden 2 L Medium 1:40 angeimpft und bei 37°C bis zum Erreichen einer Optischen Dichte (OD_{600nm}) von 0,6 geschüttelt. Induziert wird mit 0,5 mM IPTG für zwei Stunden. Nach Abkühlen der Zellen auf Eis werden diese durch Zentrifugieren bei 7000g und 4°C für 10 min geerntet. Alle weiteren Arbeitsschritte werden auf Eis durchgeführt, die Puffer werden vorgekühlt. Das Zellpellet wird in 10 mL YidC-Puffer 1 (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 300 mM NaCl, 10 % Glycerin) resuspendiert, 1 mM PMSF sowie 1 mM DTT zugegeben und in Flüssigstickstoff schockgefroren. Die Zellen können bei -80°C gelagert werden.

Zellaufschluss und Membranpräparation

Die gefrorenen Zellen werden über Nacht auf Eis oder kurz in lauwarmem Wasser aufgetaut. Danach werden 1 mM $MgCl_2$, DNase I (Roche Diagnostics) und 1 mM PMSF zugegeben. Der Zellaufschluss erfolgt durch den Hochdruckhomogenisator One Shot (Constant Systems LTD; 2 Durchgänge, 2,4 kbar) oder durch eine French Press (American Instrument Company; 3 Durchgänge, 10000 psi). Nach dem Abtrennen der Zelltrümmer (Zentrifugation bei 17500g, 20 min, 4°C) werden aus dem Überstand die Membranen geerntet (Ultrazentrifugation: 140000g, 90 min, 4°C). Das Membranpellet wird mithilfe eines Potter-Elvehjem-Homogenisators in YidC-Puffer 1 resuspendiert (maximal 10 mL Endvolumen bei späterer

Solubilisierung). Die Membranen können an dieser Stelle bis zur weiteren Verwendung in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert werden.

Solubilisierung der membrangebundenen Proteine durch Detergens

Zur Solubilisierung der membrangebundenen Proteine wird 1 % DDM (CMC = 0,008 %) und 1 mM PMSF zugegeben und die Membranen bei 4°C auf dem Drehrad (für mindestens zwei Stunden bis) über Nacht inkubiert. Die nicht solubilisierten Membranen werden abgetrennt (Ultrazentrifugation: 95000g, 30 min, 4°C).

IMAC (Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie)

Der Überstand wird mit 1 mL equilibrierter Ni-NTA und 20 mM Imidazol (pH 7,5) in einem Gesamtvolumen von 50 mL für eine Stunde bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Über eine Minisäule wird die Ni-NTA-Matrix mit den gebundenen Proteinen vom Puffer (Durchlauf) getrennt. Zum Abtrennen von unspezifisch schwach gebundenen Proteinen von der Ni-NTA-Matrix wird mit 10-fachem Säulenvolumen (10 CV) YidC-Waschpuffer (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 300 mM NaCl, 10 % Glycerin, 30 mM Imidazol pH 7,5, 0,03 % DDM) gewaschen. YidC-His wird anschließend mit 10 CV YidC-Elutionspuffer (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 300 mM NaCl, 10 % Glycerin, 300 mM Imidazol pH 7,5, 0,03 % DDM) in Fraktionen zu je 1 mL eluiert. Von Durchlauf, Waschfraktion und den Elutionsfraktionen werden je 20 µL mit 10 µL SDS-Probenpuffer gemischt, auf ein SDS-Gel (12 % Acrylamid) aufgetragen und mit Coomassie angefärbt. Die Elutionen werden in Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Ni-NTA-Matrix kann mehrfach verwendet werden. Hierfür wird sie mit 2 M Imidazol gewaschen, anschließend mit H₂O_{dd} gespült und in 20 % Ethanol bei 4°C aufbewahrt.

Dialyse

Zum Entfernen von Imidazol oder Glycerin werden die entsprechenden Elutionsfraktionen dreimal eine Stunde (bis über Nacht) gegen das 100-fache an Volumen in YidC-Dialysepuffer (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 300 mM NaCl) dialysiert (Dialyseschläuche: Thermo Scientific, SnakeSkin™ Dialysis Tubing, 10K MWCO, 16 mm dry diameter). Nach Entfernen des Glycerins kann YidC nicht wieder eingefroren werden.

2.8.2 Reinigung von *E. coli* SecYEG

Expression und Zellernte

Für die Reinigung von SecY werden *E. coli* SF100-Zellen, die mit dem entsprechenden SecY-His-Konstrukt transformiert wurden, in 2 L LB-Medium (100 µg/mL Ampicillin) angezogen. Hierfür werden 2 L Medium 1:40 angeimpft und bei 37°C bis zum Erreichen einer Optischen Dichte (OD_{600nm}) von 0,9 geschüttelt. Induziert wird mit 0,5 mM IPTG für zwei Stunden. Nach Abkühlen der Zellen auf Eis werden diese durch Zentrifugieren bei 7000g und 4°C für 10 min geerntet. Alle weiteren Arbeitsschritte werden auf Eis durchgeführt, die Puffer werden vorgekühlt. Das Zellpellet wird in 10 mL SecY-Puffer 1 (20 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 10 % Glycerin) resuspendiert, 1 mM PMSF sowie 2 mM DTT zugegeben und in Flüssigstickstoff schockgefroren. Die Zellen können bei -80°C gelagert werden.

Zellaufschluss und Membranpräparation

Die gefrorenen Zellen werden über Nacht auf Eis oder kurz in lauwarmem Wasser aufgetaut und 1 mM MgCl₂, DNase I und 1 mM PMSF zugegeben. Der Zellaufschluss erfolgt durch den Hochdruckhomogenisator One Shot (Constant Systems LTD; 2 Durchgänge, 2,4 kbar) oder durch eine French Press (American Instrument Company; 3 Durchgänge, 10000 psi). Nach dem Abtrennen der Zelltrümmer (Zentrifugation bei 17500g, 20 min, 4°C) werden aus dem Überstand die Membranen geerntet (Ultrazentrifugation: 175000g, 90 min, 4°C). Das Membranpellet wird mithilfe eines Potter-Elvehjem-Homogenisators in SecY-Puffer 1 resuspendiert (maximal 10 mL Endvolumen bei späterer Solubilisierung). Die Membranen können an dieser Stelle bis zur weiteren Verwendung in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert werden.

Solubilisierung der membrangebundenen Proteine durch Detergens

Zur Solubilisierung der membrangebundenen Proteine wird 2 % DDM (CMC = 0,008 %) und 1 mM PMSF zugegeben und die Membranen bei 4°C auf dem Drehrad für zwei Stunden inkubiert. Die nicht solubilisierten Membranen werden abgetrennt (Ultrazentrifugation: 95000g, 30 min, 4°C).

IMAC (Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie)

Der Überstand wird mit 0,5 mL equilibrierter Ni-NTA und 30 mM Imidazol (pH 8,0) in einem Gesamtvolumen von 50 mL für eine Stunde bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Über eine

Minisäule wird die Ni-NTA-Matrix mit den gebundenen Proteinen vom Puffer (Durchlauf) getrennt. Zum Abtrennen von unspezifisch schwach gebundenen Proteinen von der Ni-NTA-Matrix wird mit 10-fachem Säulenvolumen (10 CV) SecY-Waschpuffer (20 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 10 % Glycerin, 50 mM Imidazol pH 8, 0,03 % DDM) gewaschen. SecY-His wird anschließend mit 10 CV SecY-Elutionspuffer (20 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 10 % Glycerin, 300 mM Imidazol pH 8, 0,03 % DDM) in Fraktionen zu je 1 mL eluiert. Von Durchlauf, Waschfraktion und den Elutionsfraktionen werden je 20 µL mit 10 µL SDS-Probenpuffer gemischt, auf ein SDS-Gel (15 % Acrylamid) aufgetragen und mit Coomassie angefärbt. Die Elutionen werden in Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Ni-NTA-Matrix kann mehrfach verwendet werden. Hierfür wird sie mit 2 M Imidazol gewaschen, anschließend mit H₂O_{dd} gespült und in 20 % Ethanol bei 4°C aufbewahrt.

Dialyse

Zum Entfernen von Imidazol oder Glycerin werden die entsprechenden Elutionsfraktionen dreimal eine Stunde (bis über Nacht) gegen das 100-fache an Volumen in SecY-Dialysepuffer (20 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl) dialysiert (Dialyseschläuche: Thermo Scientific, SnakeSkin™ Dialysis Tubing, 10K MWCO, 16 mm dry diameter). Nach Entfernen des Glycerins kann SecY nicht wieder eingefroren werden.

2.8.3 Reinigung des SecY-YidC-Fusionsproteins

Expression und Zellernte

Für die Reinigung des SecY-YidC-Fusionsproteins werden *E. coli* Lemo21(CE3)-Zellen, die mit dem SecY-YidC-His-Fusionsprotein-Konstrukt transformiert wurden, in insgesamt 4 L LB-Medium (100 µg/mL Ampicillin, 12,5 µg/mL Chloramphenicol) angezogen. Hierfür werden 8 x 0,5 L Medium 1:40 angeimpft und bei 37°C bis zum Erreichen einer Optischen Dichte (OD_{600nm}) von 0,4-0,5 geschüttelt. Anschließend werden die Kolben unter kaltem Wasser kurz abgekühlt und bei 30°C weiter geschüttelt. Nach Erreichen einer Optischen Dichte von 0,6-0,7 wird mit 0,5 mM IPTG für eine Stunde bei 30°C induziert. Alternativ kann am Vorabend angeimpft und über Nacht bei 30°C bis zum Erreichen der Optischen Dichte von 0,6-0,7 geschüttelt und anschließend induziert werden. Nach Abkühlen der Zellen auf Eis werden diese durch Zentrifugieren bei 7000g und 4°C für 10 min geerntet. Alle weiteren Arbeitsschritte werden auf Eis durchgeführt, die Puffer werden vorgekühlt. Das Zellpellet wird

in 10 mL YidC-Puffer 1 (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 300 mM NaCl, 10 % Glycerin) resuspendiert, 1 mM PMSF sowie 1 mM DTT zugegeben und in Flüssigstickstoff schockgefroren. Die Zellen können bei -80°C gelagert werden.

Zellaufschluss und Membranpräparation

Die gefrorenen Zellen werden über Nacht auf Eis oder kurz in lauwarmem Wasser aufgetaut und 1 mM MgCl₂, DNase I und 1 mM PMSF zugegeben. Der Zellaufschluss erfolgt durch den Hochdruckhomogenisator One Shot (Constant Systems LTD; 1 Durchgang, 2,5 kbar) oder durch eine French Press (American Instrument Company; 3 Durchgänge, 10000 psi). Das gesamte Zelllysat wird direkt in der Ultrazentrifuge bei 125000g für 90 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird mithilfe eines Potter-Elvehjem-Homogenisators in YidC-Puffer 1 resuspendiert (maximal 15 mL Endvolumen für die anschließende Solubilisierung). Die Membranen können an dieser Stelle bis zur weiteren Verwendung in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert werden.

Solubilisierung der membrangebundenen Proteine durch Detergens

Zur Solubilisierung der membrangebundenen Proteine wird 1,5 % DDM (CMC = 0,008 %) und 1 mM PMSF zugegeben und die Membranen bei 4°C auf dem Drehrad für zwei bis drei Stunden inkubiert. Die nicht solubilisierten Membranen werden abgetrennt (Ultrazentrifugation: 95000g, 30 min, 4°C).

IMAC (Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie)

Der Überstand wird mit 1 mL equilibrierter Ni-NTA in einem Gesamtvolumen von 50 mL für eine Stunde bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Über eine Minisäule wird die Ni-NTA-Matrix mit den gebundenen Proteinen vom Puffer (Durchlauf) getrennt. Zum Abtrennen von unspezifisch schwach gebundenen Proteinen von der Ni-NTA-Matrix wird mit 10-fachem Säulenvolumen (10 CV) Waschpuffer (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 300 mM NaCl, 10 % Glycerin, 30 mM Imidazol pH 7,5, 0,03 % DDM) gewaschen. Das Fusionsprotein wird anschließend mit 0,7 CV Elutionspuffer (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 300 mM NaCl, 10 % Glycerin, 300 mM Imidazol pH 7,5, 0,03 % DDM) in Fraktionen zu je 1 mL eluiert. Von Durchlauf, Waschfraktion und den Elutionsfraktionen werden je 20 µL mit 10 µL SDS-Probenpuffer gemischt, auf ein SDS-Gel (12 % Acrylamid) aufgetragen und mit Coomassie angefärbt. Falls neben dem Fusionsprotein noch andere Banden zu sehen sind, werden die entsprechenden Fraktionen vereint, das

Imidazol durch Dialyse wie unten beschrieben entfernt und mit equilibrierter Ni-NTA und 15 mM Imidazol (pH 7,5) erneut inkubiert (Gesamtvolumen 15 mL). Gewaschen und eluiert wird wie oben beschrieben. Die Elutionen, die das gewünschte Protein enthalten, werden in Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Ni-NTA-Matrix kann mehrfach verwendet werden. Hierfür wird sie mit 2 M Imidazol gewaschen, anschließend mit H₂O_{dd} gespült und in 20 % Ethanol bei 4°C aufbewahrt.

Dialyse

Zum Entfernen von Imidazol oder Glycerin werden die entsprechenden Elutionsfraktionen dreimal eine Stunde (bis über Nacht) gegen das 100-fache an Volumen in YidC-Dialysepuffer (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 300 mM NaCl) dialysiert (Dialyseschläuche: Thermo Scientific, SnakeSkin™ Dialysis Tubing, 10K MWCO, 16 mm dry diameter). Nach Entfernen des Glycerins kann das Protein nicht wieder eingefroren werden.

2.8.4 Reinigung von *E. coli* proPhoA (Gouridis *et al.*, 2010)

Expression und Zellernte

Für die Reinigung des Präproteins proPhoA werden *E. coli* BL21.19-Zellen, die mit dem entsprechenden proPhoA-Konstrukt transformiert wurden, in 4 L LB-Medium (100 µg/mL Ampicillin) angezogen. Hierfür werden 4 L Medium 1:40 angeimpft und bei 30°C bis zum Erreichen einer Optischen Dichte (OD_{600nm}) von 0,6-0,8 geschüttelt. Anschließend wird die Temperatur auf 42°C erhöht. Nach 30 min wird mit 0,5 mM IPTG für zwei Stunden bei 42°C induziert. Nach Abkühlen der Zellen auf Eis werden diese durch Zentrifugieren bei 7000g und 4°C für 10 min geerntet. Das Zellpellet wird in kaltem Puffer A (50 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl, 5 % Glycerin, 2 mM DTT) resuspendiert und in Flüssigstickstoff schockgefroren. Die Zellen können bei -80°C gelagert werden.

Zellaufschluss und Solubilisierung des Proteins

Die gefrorenen Zellen werden über Nacht auf Eis oder kurz in lauwarmem Wasser aufgetaut und 1 mM MgCl₂, DNase I (Roche Diagnostics) und 1 mM PMSF zugegeben. Der Zellaufschluss erfolgt durch eine French Press (American Instrument Company; 3 Durchgänge, 10000 psi). Das Zelllysate wird 30 min bei 4°C und 58500g zentrifugiert. Das Pellet, welches das proPhoA als Inklusionskörper (*inclusion bodies*) enthält, wird in so viel Puffer B (50 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl, 5 % Glycerin, 2 mM DTT, 8 M Urea; Raumtemperatur) resuspendiert, wie zuvor

Überstand abgenommen wurde. Zur Solubilisierung der Proteine aus den Inklusionskörpern wird über Nacht auf dem Drehrad bei Raumtemperatur inkubiert.

IMAC (Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie)

Nach 30-minütiger Zentrifugation (58500g, 22°C) wird der Überstand mit Puffer A (RT) verdünnt, sodass die Urea-Konzentration 6 M beträgt. Für die IMAC werden 5 mL Ni-NTA mit 10-fachem Säulenvolumen (10 CV) Waschpuffer C (50 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl, 5 % Glycerin, 6 M Urea; Raumtemperatur) equilibriert. Das Ni-NTA und 5 mM β -Mercaptoethanol werden zu dem verdünnten Überstand gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Drehrad inkubiert. Nach Trennen der Ni-NTA-Matrix mit den gebundenen Proteinen vom Puffer (Durchlauf) über eine Minisäule wird mit 10 CV Waschpuffer C und anschließend mit 15 CV Waschpuffer D (50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl, 5 % Glycerin, 6 M Urea; 10 mM Imidazol pH 8,0; Raumtemperatur) gewaschen. Eluiert wird mit 10 CV Elutionspuffer E (50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl, 5 % Glycerin, 6 M Urea; 100 mM Imidazol pH 8,0; Raumtemperatur) in einer einzelnen Fraktion (zu stark konzentriertes proPhoA fällt aus). ProPhoA wird bei Raumtemperatur gelagert. Die Ni-NTA-Matrix kann mehrfach verwendet werden. Hierfür wird sie mit 2 M Imidazol gewaschen, anschließend mit H₂O_{dd} gespült und in 20 % Ethanol bei 4°C aufbewahrt. Von den Wasch- und Elutionsfraktionen werden je 50 μ L gefällt, in 100 μ L SDS-Probenpuffer aufgenommen und davon 20 μ L auf ein SDS-Gel aufgetragen, das anschließend mit Coomassie gefärbt wird. Die Fraktion, die proPhoA enthält, wird mit 30 mM EDTA pH 8 und 1 mM DTT versetzt und für mindestens drei Stunden bzw. bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur inkubiert.

Dialyse

Zum Entfernen von Imidazol und Urea, zum Austauschen von NaCl gegen KCl und zum Ändern der Glycerin- und EDTA-Konzentration wird dialysiert. Alle Puffer müssen gekühlt sein, die Dialyse findet bei 4°C statt. Dialysiert wird mit den Dialysepuffern F-K (50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA pH 8; F: + 5 % Glycerin und 6 M Urea; G: + 10 % Glycerin und 4 M Urea; H: + 10 % Glycerin und 2 M Urea; I: + 10 % Glycerin und 1 M Urea; J: + 10 % Glycerin und 0,5 M Urea; K: + 10 % Glycerin) für jeweils mindestens zwei Stunden gegen das 100-fache an Volumen (Dialyseschläuche: Thermo Scientific, SnakeSkin™ Dialysis Tubing, 10K MWCO, 16 mm dry diameter). Soll proPhoA im Anschluss mit einem Maleimid-Fluoreszenzfarbstoff markiert werden, wird in den letzten beiden Dialysepuffern das DTT

weggelassen. Nach der Entfernung von Urea ist proPhoA bei Proteinkonzentrationen zwischen 30 μM und 3 mM nur unter 12°C löslich. Bei einer Konzentration unter 30 μM ist proPhoA auch bei Raumtemperatur und sogar bis 37°C löslich (Gouridis *et al.*, 2010).

2.9 Fluoreszenzfarbstoff-Markierung von Proteinen (*Labeling*)

Zur spezifischen Fluoreszenzfarbstoff-Markierung von Proteinen wurden Maleimid-gekoppelte Farbstoffe verwendet, die an die Thiol-Gruppe von Cysteinresten binden. Es wurden die Farbstoffe ATTO520 und ATTO647N (ATTO-TEC) eingesetzt. Die optischen Eigenschaften der Farbstoffe sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13: Optische Eigenschaften der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe (ATTO-TEC, 2009)

	ATTO520	ATTO647N
λ_{abs}	516 nm	644 nm
λ_{fl}	538 nm	669 nm
ϵ_{max}	$1,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
CF_{280}	0,18	0,05

Der Fluoreszenzfarbstoff sowie die Fluoreszenzfarbstoff-markierten Proteine müssen vor Licht geschützt werden. Der in DMSO gelöste Farbstoff wird in 1,3-fach molarem Überschuss zur Proteinlösung gegeben, 30 min bei Raumtemperatur auf dem Drehrad und anschließend über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Alternativ kann zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Drehrad markiert werden. Damit nicht gebundener Farbstoff reduziert wird und sich leichter abtrennen lässt, wird das Protein-Farbstoff-Gemisch mit 10 mM DTT für zwei Stunden auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert. Ungebundener Farbstoff wird über eine Gelfiltration (2.10) abgetrennt. Zur Überprüfung der Farbstoffabtrennung werden Proben der Elutionsfraktionen in Probenpuffer ohne DTT auf ein 15 %-iges SDS-Gel aufgetragen und die Auftrennung gestoppt, bevor die Lauffront komplett durchgelaufen ist. Das Gel wird am Fluoreszenz-Scanner (Typhoon TRIO+, Amersham Biosciences) bei entsprechender Anregungswellenlänge gescannt (Anregungslaser: ATTO647N, Red (633 nm); ATTO520, Blue (488 nm); Emissionsfilter: ATTO647N, 670 BP 30 Cy5; ATTO520, 526 SOP Fluorescein Cy2 AlexaFluor488)

und anschließend mit Coomassie gefärbt. Fluoreszenzfarbstoff-markierte Proteine werden lichtgeschützt bei -80°C gelagert.

2.10 Größenausschluss-Chromatographie

Der freie Farbstoff aus der *Labeling*-Reaktion kann über eine Größenausschluss-Chromatographie (Gelfiltration) abgetrennt werden. Hierbei werden Proteine und andere Moleküle der Größe nach aufgetrennt. Größere Moleküle wandern schneller durch das Säulenmaterial als kleinere. Das markierte Protein eluiert zu Beginn, der freie Farbstoff muss einen größeren Weg durch die Säulenmatrix zurücklegen.

Die Farbstoff-markierte Probe wird über einen Konzentrator (Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter, Regenerated Cellulose, Millipore) auf $500\ \mu\text{L}$ eingeengt, filtriert (Ultrafree-MC Zentrifugen-Filtereinheiten, PVDF $0,45\ \mu\text{m}$, Millipore) und auf eine equilibrierte Superdex 200 (10/30)-Säule (GE Healthcare Life Sciences) geladen. Über ein ÄKTA-Proteinaufreinigungssystem (ÄKTApurifier; GE Healthcare Life Sciences) wird mit dem gewünschten Puffer, der zuvor filtriert und entgast wurde, lichtgeschützt mit einer Flussgeschwindigkeit von $0,5\ \text{mL}/\text{min}$ eluiert und Fraktionen von $500\ \mu\text{L}$ gesammelt. Die Detektion erfolgt bei $280\ \text{nm}$ und am Absorptionsmaximum des Farbstoffs. Fraktionen, die laut Chromatogramm Protein enthalten, werden wie in 2.9 beschrieben auf einem SDS-Gel überprüft.

2.11 Bestimmung der Proteinkonzentration und der *Labeling*-Effizienz (DOL)

Zur Berechnung der Proteinkonzentration und der *Labeling*-Effizienz (DOL = *degree of labeling*) wird die Absorption bei $280\ \text{nm}$ und am Absorptionsmaximum des Farbstoffs (ATTO520: $\lambda_{\text{abs}} = 516\ \text{nm}$; ATTO647N: $\lambda_{\text{abs}} = 644\ \text{nm}$) photometrisch bestimmt (Cary 50 UV-Vis Spectrophotometer; Varian). Der Extinktionskoeffizient des Proteins ϵ wird über die Aminosäuresequenz mithilfe von Online-Tools (z.B. ExpASy - ProtParam tool) bestimmt. Der molare Extinktionskoeffizient des Farbstoffs am Absorptionsmaximum ϵ_{max} sowie dessen Korrekturfaktor CF_{280} ($= \epsilon_{280}/\epsilon_{\text{max}}$) werden den optischen Eigenschaften des Farbstoffs entnommen (siehe Tabelle 13). Außerdem muss die Schichtdicke d der Küvette bekannt sein.

Die Konzentration von Farbstoff-markierten Proteinen berechnet sich wie folgt:

$$c \text{ [M]} = \frac{A_{280} - A_{\text{Farbstoff}} \times CF_{280}}{\epsilon_{\text{Protein}} \times d}$$

Ist das Protein nicht Farbstoff-markiert, entfällt die Farbstoff-Korrektur ($A_{\text{Farbstoff}} = 0$).

Die *Labeling*-Effizienz wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{DOL [\%]} = \frac{A_{\text{Farbstoff}} \times \epsilon_{\text{Protein}}}{(A_{280} - A_{\text{Farbstoff}} \times CF_{280}) \times \epsilon_{\text{max}}} \times 100$$

2.12 Herstellung von Liposomen (Olson *et al.*, 1979; Szoka *et al.*, 1980)

Vor der Herstellung der Lipide werden alle Glasgefäße und –werkzeuge (Spatel, Glaskügelchen) mit Dichlormethan gespült. Die aufgetauten Lipide (Avanti® Polar Lipids) werden in einen gespülten 250 mL-Rundkolben eingewogen (100 mg) und in 10 mL Dichlormethan gelöst. Mithilfe eines Rotationsverdampfers wird das Dichlormethan langsam verdampft (Wasserbad 30°C, Vakuum 850 mbar), bis sich ein gleichmäßiger Lipidfilm gebildet hat. Nach dem Verdampfen wird das Wasserbad ausgeschaltet und die Lipide über Nacht weiter getrocknet. Der Kolben wird mit Stickstoff begast, um eine Oxidation der Lipide zu verhindern. Nach Zugabe von 10 mL H₂O_{dd} wird der Lipidfilm mithilfe von zwei Glaskügelchen gelöst. Die gelösten Liposomen haben eine Konzentration von 10 mg/mL und sind multilamellar. Nach dem Aliquotieren der fertigen Liposomen werden diese in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.13 Rekonstitution von Membranproteinen mittels Extruder und Bio-Beads

Die Liposomen und Proteine werden im gewünschten Verhältnis gemischt (molares Verhältnis Protein:Lipid ≈ 1:1000). Für die spätere Zentrifugation der Proteoliposomen ist es wichtig, dass die Proteinlösung kein Glycerin enthält. Der Mini-Extruder-Apparat (Avanti® Polar Lipids) wird nach Herstellerangaben zusammengebaut. Er besteht aus zwei Spritzen, zwei Teflon-Zylindern mit zwei Filtern und einer Polycarbonat-Membran (Whatman® Nuclepore™ Track-Etched Membrane; 19 mm Durchmesser, Porengröße 400 nm) dazwischen. Zur Reduktion des

Totvolumens wird vor der eigentlichen Extrusion Puffer von der einen in die andere Spritze gedrückt. Um die gewünschte Temperatur von 37°C während der Extrusion zu erreichen, wird der Temperaturblock der Apparatur auf einem Heizblock erwärmt. Die Protein-Liposomen-Suspension wird mit einer der beiden Spritzen luftblasenfrei aufgenommen und 20-30 Mal langsam durch die Polycarbonat-Membran gedrückt. Die zu Beginn milchige Suspension wird dabei klar. Durch einen letzten Extrusionsschritt endet die Suspension in der anderen Spritze. So bleiben mögliche Aggregate und andere größere Partikel in der Ausgangsspritze. Die Suspension wird in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und mit den hydrierten Bio-Beads (Bio-Beads™ SM-2 Adsorbent; Bio-Rad), die vorgelegt wurden, bei 4°C auf dem Drehrad zweimal eine Stunde bis über Nacht inkubiert. Die Bio-Beads adsorbieren das Detergens aus der Lösung, wodurch die Proteoliposomen stabiler werden. Nach der Detergensadsorption werden die Proteoliposomen geerntet. Hierfür werden sie zentrifugiert (Beckman Airfuge, 20 psi, 10 min, 4°C) und das Proteoliposomen-Pellet im gewünschten Puffer aufgenommen. Die Proteoliposomen können für 3-4 Tage bei 4°C (oberhalb der Phasenübergangstemperatur T_c) gelagert werden (Avanti Polar Lipids, 2019).

Für die Fluoreszenzmessungen wurden DOPC-Liposomen (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin; Avanti® Polar Lipids) verwendet, da diese bei den Messungen wenig Hintergrund zeigen. Die Phasenübergangstemperatur von DOPC beträgt je nach Quelle zwischen -17°C (Avanti Polar Lipids, 2019) und -22°C (Ladbrooke & Chapman, 1969; Szoka *et al.*, 1980).

2.14 Bestimmung der Partikelgröße über dynamische Lichtstreuung

Die Größenverteilung der Proteoliposomen kann unter Verwendung der dynamischen Lichtstreuung (*dynamic light scattering*, DLS) bestimmt werden. Die Intensität der Lichtstreuung eines Lasers, der auf die Proteoliposomen-Suspension trifft, ändert sich ständig durch die Brownsche Molekularbewegung der Proteoliposomen in der Suspension. Die Änderung der Intensität über die Zeit ergibt eine Information über die Geschwindigkeit der Partikel und letztendlich über deren Größe.

Es werden 20 µL der Proteoliposomen in eine Küvette pipettiert und anschließend im Lichtstreuungsdetektor Avid Nano W130i zehn Messungen über je 10 Sekunden durchgeführt.

Die Software berechnet aus diesen Daten den hydrodynamischen Radius beziehungsweise Durchmesser der Proteoliposomen und die Polydispersität der Partikel.

2.15 Fluoreszenz-Messungen

2.15.1 Messungen am Fluorometer

Für die Fluoreszenz-Messungen werden die Fluoreszenz-markierten Proteine im gewünschten Verhältnis und der gewünschten Konzentration gemischt bzw. mit DOPC-Liposomen rekonstituiert, sodass die Proben ein Mindestvolumen von 120 μL (Küvettenvolumen) aufweisen. Für einfache Fluoreszenz-Messungen ist nur eines der Proteine markiert, für FRET-Messungen sind entsprechend beide Interaktionspartner mit dem Donor- bzw. Akzeptor-Farbstoff markiert. Für die Interaktionsmessungen zwischen SecY und YidC wurde in dieser Arbeit YidC mit dem Donor-Farbstoff ATTO520, SecY mit dem Akzeptor-Farbstoff ATTO647N markiert. Das Fluoreszenz-Spektrometer (Fluorolog[®], HORIBA Jobin Yvon GmbH) muss eine halbe Stunde vor der Messung angeschaltet werden, damit die Lampe auf Betriebstemperatur kommt. Die Küvette (Quarzglas SUPRASIL[®] Mikro-Küvette, Schichtdicke 10 mm, Füllvolumen 120 μL , Hellma Analytics) wird mit destilliertem Wasser gespült und mit Stickstoff trocken gepustet. Gemessen wird bei Raumtemperatur und einer konstanten Anregungswellenlänge von 516 nm (Absorptionsmaximum von ATTO520). Mithilfe der Fluoreszenz-Software FluorEssence[™] für Windows[®] wird ein Emissionsspektrum oberhalb der Anregungswellenlänge je nach gemessenem Farbstoff aufgenommen (520-720 nm für die Fluoreszenzmaxima von ATTO520 und ATTO647N). Im Falle eines Energietransfers (FRET) sinkt das Donor-Signal, das des Akzeptors steigt an. Falls die Fluoreszenzlöschung gemessen werden soll, wird vor der Messung 500 mM Kaliumiodid (KI, Sigma) zugegeben.

2.15.2 Auswertung der Fluoreszenzmesdaten

Die Auswertung der gemessenen Daten erfolgt mithilfe der Datenanalyse- und Grafiksoftware OriginPro (OriginLab Corporation), mit der die Fluoreszenz-Software FluorEssence[™] gekoppelt ist.

Normierung der Messdaten

Um die Daten aus verschiedenen Messungen besser vergleichen zu können, werden sie auf einen ausgewählten Wert, der als Basiswert fungiert, normiert. Alle Werte werden dazu durch diesen Wert dividiert. Der Basiswert beträgt damit eins.

Um die Zu- bzw. Abnahme der Fluoreszenz im Vergleich zu diesem Basiswert darzustellen, kann von den Messdaten der Basiswert eins abgezogen werden.

Bestimmung der Affinität (K_d -Wert) und der Stöchiometrie (n) durch Titration

Um die Affinität, also den K_d -Wert, und die Stöchiometrie der Interaktion von SecY und YidC zu bestimmen, wird SecY mit dem Akzeptor-Farbstoff ATTO647N (im Folgenden als Akzeptor bezeichnet) und YidC mit dem Donor-Farbstoff ATTO520 (Donor) markiert. Im Falle einer Interaktion kommt es zu FRET, wodurch das Donor-Signal sinkt, das des Akzeptors steigt. Der Donor wird vorgelegt, der Akzeptor wird in kleinen Titrationsschritten dazu titriert. Für jeden Titrationsschritt wird das Fluoreszenzspektrum von 520-750 aufgenommen. Ziel ist es, die jeweiligen Fluoreszenzmaxima des Donors bzw. des Akzeptors gegen die entsprechende Akzeptor-Konzentration aufzutragen, um später eine Kurvenanpassung zur Bestimmung von K_d und n durchzuführen.

A) Rechnerische Korrektur der Messergebnisse um Verdünnungs- und Konzentrationseffekte:

Durch die Zugabe des Akzeptors in jedem Titrationsschritt kommt es zu einer Volumenvergrößerung und damit zu einer Verdünnung der Donor-Konzentration. Das Donor-Signal sinkt also nicht nur durch den FRET-Effekt, sondern auch durch die Verdünnung. Der FRET-Effekt muss um den Verdünnungseffekt rechnerisch korrigiert werden. Um diesen Fehler korrigieren zu können, wird der Puffer, in dem der Akzeptor vorliegt (Akzeptor-Puffer), in den gleichen Schritten wie zuvor der Akzeptor zum vorgelegten Donor titriert. In Abbildung 18A ist die Berechnung des korrigierten Donor-Signals anhand eines einzelnen Titrationsschritts dargestellt. Dargestellt ist nur der Wellenlängenbereich, in dem der Donor fluoresziert. Die schwarze Kurve (D) stellt das Spektrum des Donor-Farbstoffs dar, der bei der Titration vorgelegt wurde. Die blaue Kurve (D+P) entsteht, wenn zu diesem Donor Akzeptor-Puffer pipettiert wird. Dadurch sinkt bereits die Fluoreszenz, ohne dass es zu einem Energietransfer kommt (b = Signalabnahme durch Verdünnungseffekt). Wird zum vorgelegten Donor das gleiche Volumen Akzeptor pipettiert, sinkt das Signal nicht nur durch den Verdünnungseffekt,

sondern auch durch den strahlungsfreien Energietransfer auf den Akzeptor (c = Signalabnahme durch Energietransfer und Verdünnungseffekt; rote Kurve (D+A)). Die grüne Kurve stellt das errechnete korrigierte Signal des Donors dar, das durch den Energietransfer ohne Verdünnungseffekt (= a) entsteht. Rechnerisch erhält man a, indem b von c subtrahiert wird: $a = c - b$ mit $b = D - (D+P)$ und $c = D - (D+A)$. Der FRET-Effekt a muss dann vom Ausgangssignal des Donors D abgezogen werden, um das korrigierte Signal zu erhalten. Die Berechnung wird für jeden Titrationschritt durchgeführt.

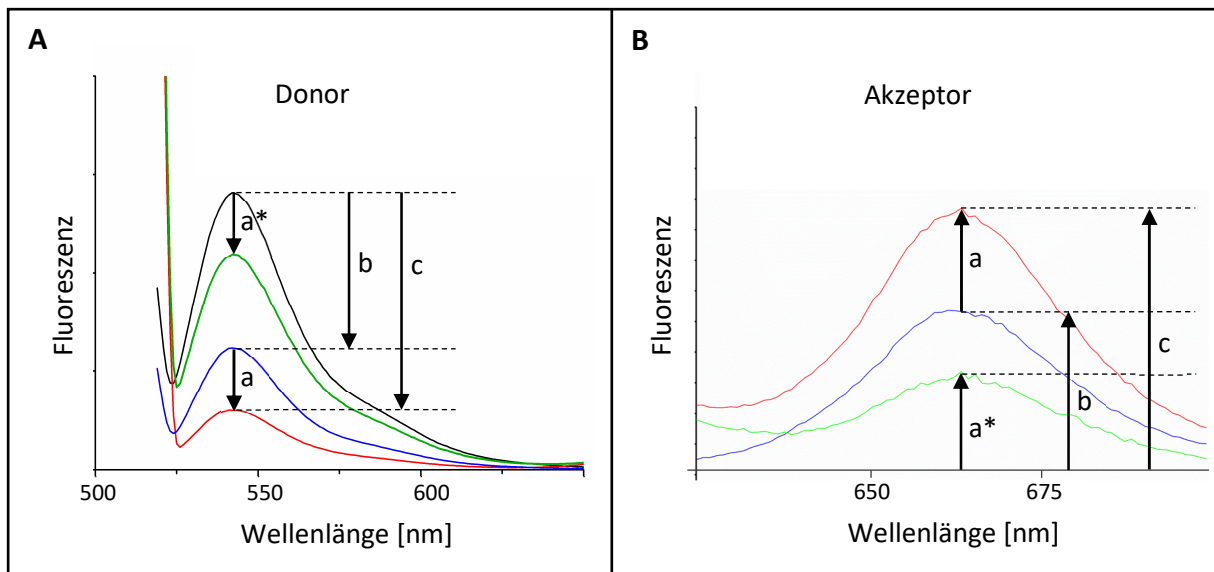


Abbildung 18: Korrektur der Maxima um Verdünnungseffekt bzw. Eigenfluoreszenz.

(A) Rechnerische Korrektur des Donor-Signals um den Verdünnungseffekt.

schwarze Kurve: Donor-Signal (D) ohne FRET (vorgelegter Donor allein gemessen)

rote Kurve: Zugabe von Akzeptor zum vorgelegten Donor (D+A)

blaue Kurve: Zugabe von A-Puffer zu vorgelegten Donor (D+P)

grüne Kurve: korrigiertes Donor-Signal ohne Verdünnungseffekt = $D - a = D - (D+P) + (D+A)$

a = Signalabnahme durch Energietransfer (=FRET)

b = Signalabnahme durch Verdünnungseffekt

c = Signalabnahme durch Energietransfer und Verdünnungseffekt

$a = c - b$ mit $b = D - (D+P)$ und $c = D - (D+A) \rightarrow a = (D+P) - (D+A) = \text{FRET}$

(B) Rechnerische Korrektur des Akzeptor-Signals um die Eigenfluoreszenz.

rote Kurve: Zugabe von Akzeptor zum vorgelegten Donor

blaue Kurve: Zugabe von Akzeptor zu Donor -Puffer

grüne Kurve: korrigiertes Akzeptor-Signal ohne Eigenfluoreszenz = $0 + a = (D+A) - (P+A)$

a = Signalzunahme durch Energietransfer (=FRET)

b = Signalzunahme durch Eigenfluoreszenz

c = Signalzunahme durch Energietransfer und Eigenfluoreszenz

$a = c - b$ mit $b = (P+A)$ und $c = (D+A) \rightarrow a = (D+A) - (P+A)$

Neben dem Donor-Signal muss auch das Akzeptor-Signal korrigiert werden. Durch die Zugabe des Akzeptor-Farbstoffs bei jedem Titrationschritt wird dieser aufkonzentriert. Außerdem wird durch die Anregung des Donors bei 516 nm auch der Akzeptor schwach mit angeregt

(Abbildung 17). Diese Eigenfluoreszenz, die nicht durch den Energietransfer zustande kommt, muss vom Akzeptor-Signal abgezogen werden. Dazu wird Akzeptor zu vorgelegtem Donor-Puffer titriert und die Spektren gemessen. In Abbildung 18B wird die Berechnung beispielhaft an einem Titrationsschritt dargestellt. Die rote Kurve (D+A) stellt das Spektrum im Akzeptor-Fluoreszenzbereich, das bei der Zugabe von Akzeptor zu vorgelegtem Donor entsteht, dar. Das Signal entsteht durch den Energietransfer vom Donor auf den Akzeptor (FRET) und durch die Eigenfluoreszenz des Akzeptor-Farbstoffs, die sich mit jedem Titrationsschritt durch die steigende Akzeptor-Konzentration erhöht (c = Signalzunahme durch Energietransfer und Eigenfluoreszenz). Hiervon müssen der Konzentrationseffekt und die zunehmende Eigenfluoreszenz abgezogen werden, den die blaue Kurve (P+A) zeigt. Diese ist das Spektrum, das bei der Zugabe von Akzeptor zu Donor-Puffer gemessen wird. Das Signal entsteht durch die Eigenfluoreszenz (b = Signalzunahme durch Eigenfluoreszenz) des Akzeptor-Farbstoffs. Die eigentliche Zunahme des Signals, das auf den Energietransfer, also FRET, zurückzuführen ist, ist kleiner und wird durch a dargestellt. Rechnerisch erhält man a , indem b von c subtrahiert wird: $a = c - b$ mit $b = (P+A)$ und $c = (D+A)$. Das korrigierte Akzeptor-Signal (grüne Kurve), das nur auf den Energietransfer zurückzuführen ist, erhält man also durch Subtrahieren des blauen Spektrums (Puffermessung P+A) vom roten (D+A). Die Berechnung wird für jeden Titrationsschritt durchgeführt.

Des Weiteren ist beim Akzeptor-Signal zu beachten, dass der Donor-Farbstoff auch bei 669 nm, also am Fluoreszenzmaximum des Akzeptors, noch schwach fluoresziert (Abbildung 17A). Diese Fluoreszenz verfälscht das Signal. Eine Messung ohne Akzeptor, also mit dem Donor allein, bei 669 nm kann aber nicht einfach vom Akzeptor-Signal abgezogen werden, da bei der Messung mit Akzeptor ein Teil der Donor-Fluoreszenz in FRET übergeht, bei der Messung des Donors allein nicht. Dadurch ist die Donor-Fluoreszenz, die vom Akzeptor-Maximum abgezogen werden müsste, tatsächlich niedriger als bei der Messung des Donors allein. Damit wird der Anteil der Donor-Fluoreszenz am Akzeptor-Maximum, also der gemessene Fehler, kleiner mit steigendem FRET-Effekt: Die Donor-Fluoreszenz bei 669 nm ist also auch davon abhängig, ob es zu FRET kommt oder nicht und wie viel Energie dabei auf den Akzeptor übertragen wird. Wird wenig oder keine Energie auf den Akzeptor übertragen, bleibt viel der Donor-Fluoreszenz bei 669 nm übrig, wird mehr Energie auf den Akzeptor übertragen, bleibt weniger Donor-Fluoreszenz übrig und es würde zu viel abgezogen und der FRET-Effekt

in die andere Richtung verfälscht werden. Zu Beginn der Titration ist der Fehler also größer, da der Donor-Einfluss größer ist (dieser wird mit der Zeit verdünnt) und weniger FRET auftritt, also mehr an Fluoreszenz übrigbleibt. Mit der Zeit wird der Donor verdünnt, womit der Einfluss sinkt, und der FRET-Effekt steigt, wodurch weniger Fluoreszenz übrigbleibt, die abgezogen werden müsste. Der Fehler nimmt also im Lauf der Titration ab, zu Beginn müsste mehr abgezogen werden als im Verlauf der Titration. Die Konzentrationsänderung des Donors könnte zwar durch die entsprechende Donor+Puffer (D+P)-Messung berücksichtigt werden, die unterschiedlichen FRET-Effekte sind aber nicht abschätzbar. Aus diesem Grund wird eine Fehlerabschätzung gemacht, indem die Extremfälle `1.) Komplette Energieübertragung von Donor auf Akzeptor´ und `2.) Keine Energieübertragung von Donor auf Akzeptor´ betrachtet werden. In Fall 1 (100 % FRET) wird angenommen, dass die komplette Donor-Fluoreszenz bei jeder Einzel-Messung der Titration auf den Akzeptor übertragen wird. Damit gibt es keine Donor-Fluoreszenz bei 669 nm, also am Akzeptor-Maximum, mehr, die abgezogen werden müsste. Im zweiten Fall (0 % FRET) wird angenommen, dass keine Donor-Fluoreszenz auf den Akzeptor übertragen wird, also kein FRET stattfindet. Damit bleibt die gesamte Donor-Fluoreszenz bei 669 nm als Fluoreszenz erhalten und geht nicht strahlungsfrei durch FRET an den Akzeptor über. Die Donor-Fluoreszenz ist also bei der Messung mit und ohne Akzeptor gleich groß. Somit muss die gesamte Donor-Fluoreszenz, die in der Puffer-Kontrolle (Donor + Puffer) am Akzeptor-Maximum von 669 nm gemessen wird, vom Wert der Messung mit Akzeptor abgezogen werden. Durch die beiden betrachteten Extremfälle `0 % FRET´ und `100 % FRET´ ergibt sich für den K_d -Wert eine Spanne, zwischen der der tatsächliche Wert liegt. Das Eintreten beider Fälle ist unwahrscheinlich, da FRET im Falle von SecY und YidC auftritt (mehr als 0 %), aber nie die gesamte Energie übertragen wird (100 % wird nicht erreicht). Der tatsächliche K_d -Wert liegt also dazwischen. Zudem kann ein dritter Fall unter Annahme, dass 50 % der Donor-Fluoreszenz durch FRET übertragen werden, betrachtet werden. Es ist zu beachten, dass bei diesen theoretischen Betrachtungen alle Messpunkte der Titration in Hinblick auf die FRET-Effizienz gleich behandelt werden, obwohl sich diese über den Titrationsverlauf hinweg durch das sich verändernde Donor/Akzeptor-Verhältnis ändert. Durch die Betrachtung der beiden Extremfälle wird aber auch dies mit abgedeckt.

B) Lineare und nichtlineare Kurvenanpassung:

Die Kurvenanpassung zur Bestimmung des K_d -Werts und der Stöchiometrie werden im Folgenden anhand des Beispiels der SecY/YidC-Interaktion in Detergens und dem Akzeptor-Signal (3.2.3) erläutert. Hier wurde der Donor vorgelegt, der Akzeptor dazu titriert.

Nach der rechnerischen Korrektur von Akzeptor- und Donor-Signal werden die Fluoreszenzmaxima gegen die Konzentration der variablen Komponente, hier des Akzeptors, aufgetragen (Abbildung 32A). Mit steigender Akzeptor-Konzentration steigt die Fluoreszenz, es kommt zu einer Sättigung und letztendlich wieder zu einer Abnahme des Signals.

Zur Berechnung der Dissoziationskonstanten K_d wird eine Lineweaver-Burk Linearisierung der Daten durchgeführt. Da diese Berechnung nur für Sättigungskurven vorgesehen ist, wird nur der Bereich bis $0,55 \mu\text{M}$ (vor Signalabnahme) zur Berechnung berücksichtigt. Für die Linearisierung nach Lineweaver-Burk werden die reziproken x - und y -Werte aufgetragen. Anschließend wird durch die Datenpunkte eine lineare Regressionsgerade gelegt (Abbildung 32B). Mithilfe der Gleichung der Regressionsgeraden kann der K_d -Wert bestimmt werden: Er berechnet sich als negativer reziproker Wert des Schnittpunkts der Regressionsgeraden mit der x -Achse: **$x = -1/K_d$ mit $y = 0$.**

Außerdem kann die Asymptote der Sättigungskurve als reziproker Wert des y -Achsenabschnitts bestimmt werden: **$y = 1/\text{Asymptote}$ mit $x = 0$.**

Diese beiden errechneten Werte werden in einer nichtlinearen Regressionsanalyse (nicht linearisiertes Diagramm, Abbildung 32A) zur Berechnung des stöchiometrischen Faktors n eingesetzt. Dieser Analyse liegt folgende Formel zugrunde:

$$y = F_i + n \times F_f \times \left\{ \frac{(K_d + X + c) - \sqrt{[(K_d + X + c)^2 - 4cX]}}{2c} \right\}$$

mit X : Konzentrationen der titrierten Komponente (hier: Akzeptor) [μM]

F_i (Anfangsfluoreszenz) = 0

F_f (Endfluoreszenz) = Asymptote \rightarrow Wert aus linearer Regression

c : vorgelegte (hier: Donor-)Konzentration [mM]

K_d : Dissoziationskonstante \rightarrow Wert aus linearer Regression [μM]

n (stöchiometrischer Parameter): wird hier bestimmt

Auch in diesem Fall wird nur der Bereich bis 0,55 μM herangezogen, da die Formel nur für eine Sättigungskurve vorgesehen ist.

Die Auswertung der Messung über die Fluoreszenzmaxima des Donors werden entsprechend durchgeführt. Auch hier werden die Fluoreszenzmaxima des Donor-Signals gegen die Konzentration des Akzeptors (variable Komponente) aufgetragen. Da die Signale sinken, die Formel der nichtlinearen Regressionsanalyse aber für eine steigende Sättigungskurve vorgesehen ist, wird der reziproke Wert der Fluoreszenz aufgetragen. So wird eine steigende Sättigungskurve für die Analyse erhalten. Entsprechend wird für die Lineweaver-Burk Linearisierung die Fluoreszenz (als reziproker Wert der reziproken Fluoreszenz aus der steigenden Sättigungskurve) gegen die reziproke Akzeptor-Konzentration aufgetragen.

Mit der Regressionsgleichung gibt OriginPro automatisch Kennzahlen zur Beurteilung der Anpassung an.

Der Korrelationskoeffizient (Pearson R) ist ein dimensionsloses Maß für den linearen Zusammenhang von Messpunkten und kann Werte zwischen -1 und +1 annehmen. Bei einem Wert von +1 (-1) besteht ein vollständig positiver (negativer) linearer Zusammenhang zwischen den Messpunkten. Beträgt der Wert des Korrelationskoeffizienten null besteht kein linearer Zusammenhang (Burkschat *et al.*, 2012).

Das Bestimmtheitsmaß R^2 beurteilt, wie gut Messwerte zu einem Modell passen. Bei der linearen Regression entspricht das Bestimmtheitsmaß dem Quadrat des Korrelationskoeffizienten und liegt damit in seinem Wert immer unter dem des Korrelationskoeffizienten. Da R^2 mit zunehmender Anzahl an unabhängiger Variablen automatisch ansteigt, auch wenn diese nur einen minimalen linearen Zusammenhang aufweisen, kann R^2 durch eine größere Anzahl an Variablen künstlich erhöht werden. Darum wird mit dem sogenannten korrigierten R^2 gearbeitet, welches die Anzahl der verwendeten Variablen berücksichtigt und immer einen kleineren Wert als das nicht korrigierte Bestimmtheitsmaß annimmt. Ein Wert von R^2 (korrigiert) = 1 weist dabei auf eine ideale Beschreibung der Anpassung für alle Messpunkte hin (Burkschat *et al.*, 2012).

3 ERGEBNISSE

3 ERGEBNISSE

3.1 YidC interagiert *in vivo* mit dem SecY *lateral gate*

Das Sec-Translokon inseriert Membranproteine in die innere Bakterienmembran, indem es die integrierten Transmembransegmente eines Substratproteins durch das *lateral gate* von SecY in die Membran entlässt (Botte *et al.*, 2016; Frauenfeld *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2019; van den Berg *et al.*, 2004). Dabei kann SecYEG, je nach Substrat, in Kooperation mit YidC (Petriman *et al.*, 2018; Sachelaru *et al.*, 2017; Samuelson *et al.*, 2000; Scotti *et al.*, 2000) oder unabhängig von der Insertase arbeiten (Chen *et al.*, 2002b; Koch & Müller, 2000; Samuelson *et al.*, 2000). Wie genau YidC mit SecYEG interagiert, ist noch nicht komplett aufgeklärt.

Um Interaktionen von YidC mit dem *lateral gate* von SecY *in vivo* nachweisen zu können, wurden *Cross-Linking*-Experimente mithilfe eines Oxidationsmittels durchgeführt. Über Einzelcystein-Mutanten wurden Positionen im *lateral gate* von SecY (Abbildung 19A und B) und in den Transmembransequenzen (TM) 3 und 5 von YidC (Abbildung 19C und D) untersucht.

Bei diesen *Cross-Linking*-Experimenten mit Einzelcystein-Mutanten besitzen beide potentiellen Interaktionspartner, in diesem Fall SecY und YidC, jeweils ein einziges Cystein in ihrer Sequenz an genau der Position, die auf eine Interaktion hin untersucht werden soll. Unter oxidativen Bedingungen kann es zur Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den beiden Cysteinen von SecY und YidC kommen, wenn diese in unmittelbarer Nähe (4-7 Å) zueinander stehen und miteinander interagieren. Durch die Ausbildung der kovalenten Disulfidbrücke im Falle einer Interaktion entsteht ein Komplex mit größerem Molekulargewicht, der auf einem SDS-Gel nachgewiesen werden kann. Interagieren die untersuchten Positionen nicht miteinander, entsteht kein *Cross-Link*-Produkt.

Um endogenes YidC depletieren zu können, wurde der *E. coli*-Stamm MK6S (2.2.6) unter Glukose-Bedingungen eingesetzt. Dadurch war ein falsch-positives Ergebnis durch einen *Cross-Link* mit endogenem YidC ausgeschlossen. Als Oxidationsmittel wurde Dithionitrobenzoesäure (DTNB), auch als Ellmans Reagenz bekannt, eingesetzt (1.2). Die Detektion der Proteine erfolgte radioaktiv. Hierbei wurde der Kultur radioaktives Methionin

(³⁵S) zugegeben, was zur radioaktiven Markierung der in diesem Zeitraum synthetisierten Proteine führte (*Pulse-labeling*). Durch eine Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen YidC konnte dieses genauso wie das *Cross-Link*-Produkt aus YidC mit SecY spezifisch nachgewiesen und über eine zusätzliche Bande im SDS-Gel sichtbar gemacht werden (2.7). Das *Cross-Link*-Produkt aus SecY und YidC wird auf einer Höhe von etwa 90-95 kDa erwartet (Petriman *et al.*, 2018; Sachelaru *et al.*, 2013).

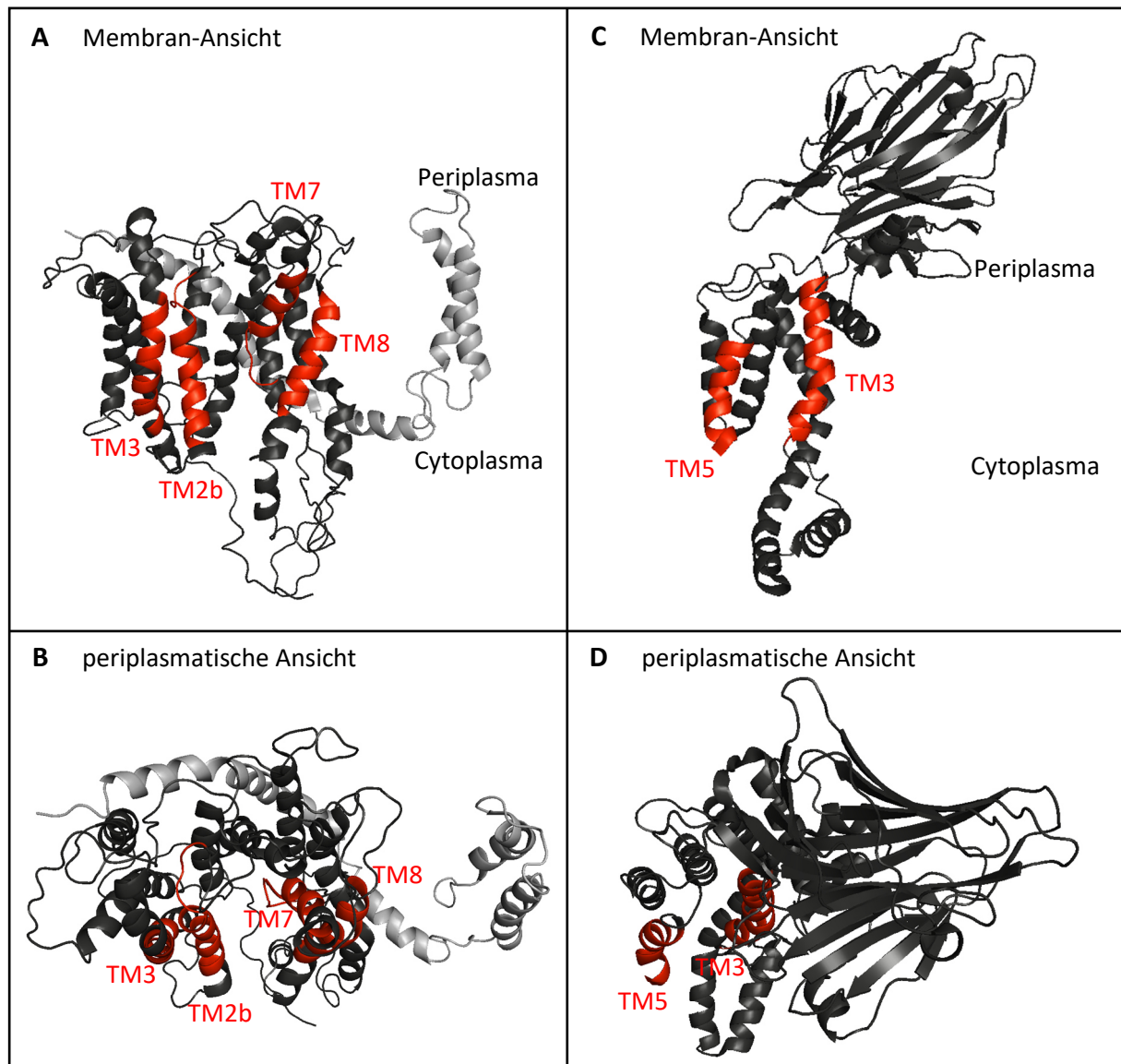


Abbildung 19: Kristallstrukturen von SecYE (A, B) und YidC (C, D). In der Kristallstruktur von *E. coli* SecYE (PDB 3J01, Frauenfeld *et al.*, 2011) ist SecY aus Sicht der Membran (A) und aus periplasmatischer Sicht (B) dunkelgrau dargestellt. SecE ist hellgrau gefärbt. Rot markiert sind die Helices 2b, 3, 7 und 8 des *lateral gates* von SecY, welches auf Interaktionen mit YidC untersucht wurde. Die Kristallstruktur von YidC aus *E. coli* (PDB 3WVF, Kumazaki *et al.*, 2014b) ist aus Sicht der Membran (C) und aus periplasmatischer Sicht (D) dunkelgrau dargestellt. Rot gefärbt sind die Transmembranhelices 3 und 5, die auf Interaktionen mit SecY untersucht wurden.

3.1.1 Depletion von YidC in *E. coli* MK6S

Zur Überprüfung der Depletion von YidC in *E. coli* MK6S wurde der Stamm in Anwesenheit von Arabinose bzw. in Abwesenheit von Arabinose und Anwesenheit von Glukose für drei Stunden

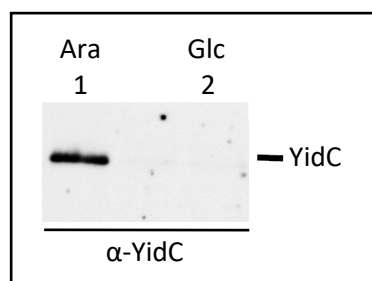


Abbildung 20: Depletion von YidC in *E. coli* MK6S unter Glukose-Bedingungen. YidC wird nur in Anwesenheit von Arabinose (Ara, Spur 1) in *E. coli* MK6S exprimiert. In Abwesenheit von Arabinose und Anwesenheit von Glukose (Glc, Spur 2) wird YidC depletiert.

bis zu einer Optischen Dichte von 0,5 bei 37°C geschüttelt und anschließend je 1 mL der Proben mit TCA gefällt. Von den TCA-gefällten Proben wurden 10 % auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Banden im Western Blot mit einem anti-YidC-Antikörper detektiert. In Anwesenheit von Arabinose (Abbildung 20, Spur 1) wird YidC exprimiert. Unter Glukose-Bedingungen (Abbildung 20, Spur 2) kann kein YidC detektiert werden. Es wurde erfolgreich depletiert. Damit ist sichergestellt, dass es sich bei dem durch den anti-YidC-Antikörper präzipitierten YidC in den *Cross-Linking*-Experimenten um die Plasmid-codierte Mutante und nicht um endogenes YidC handelt.

3.1.2 Die SecY-Transmembrandomäne 3 interagiert mit der YidC-Transmembrandomäne 3

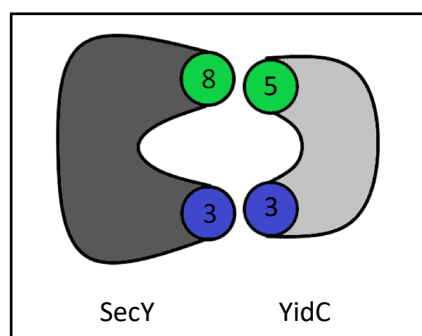


Abbildung 21: Schematische Darstellung des möglichen SecY/YidC Kontakts. Stehen sich SecY und YidC gegenüber, sodass das *lateral gate* von SecY auf die Lücke zwischen TM3 und TM5 von YidC trifft, könnten SecY-TM3 und YidC-TM3 bzw. SecY-TM8 und YidC-TM5 interagieren.

Die Positionen 122-124 der Transmembrandomäne 3 von SecY wurden auf Interaktionen mit den Positionen 428-434 der YidC-Transmembrandomäne 3 getestet. Diese beiden Transmembrandomänen könnten nebeneinander liegen, wenn SecY und YidC sich in der Membran direkt gegenüberstehen, sodass die Lücke, die sich zwischen TM 3 und TM 5 von YidC öffnet (Kumazaki *et al.*, 2014b), auf das *lateral gate* von SecY trifft (Abbildung 21). Die untersuchten Positionen befinden sich jeweils etwa in der Mitte der Membran (Abbildung 22C).

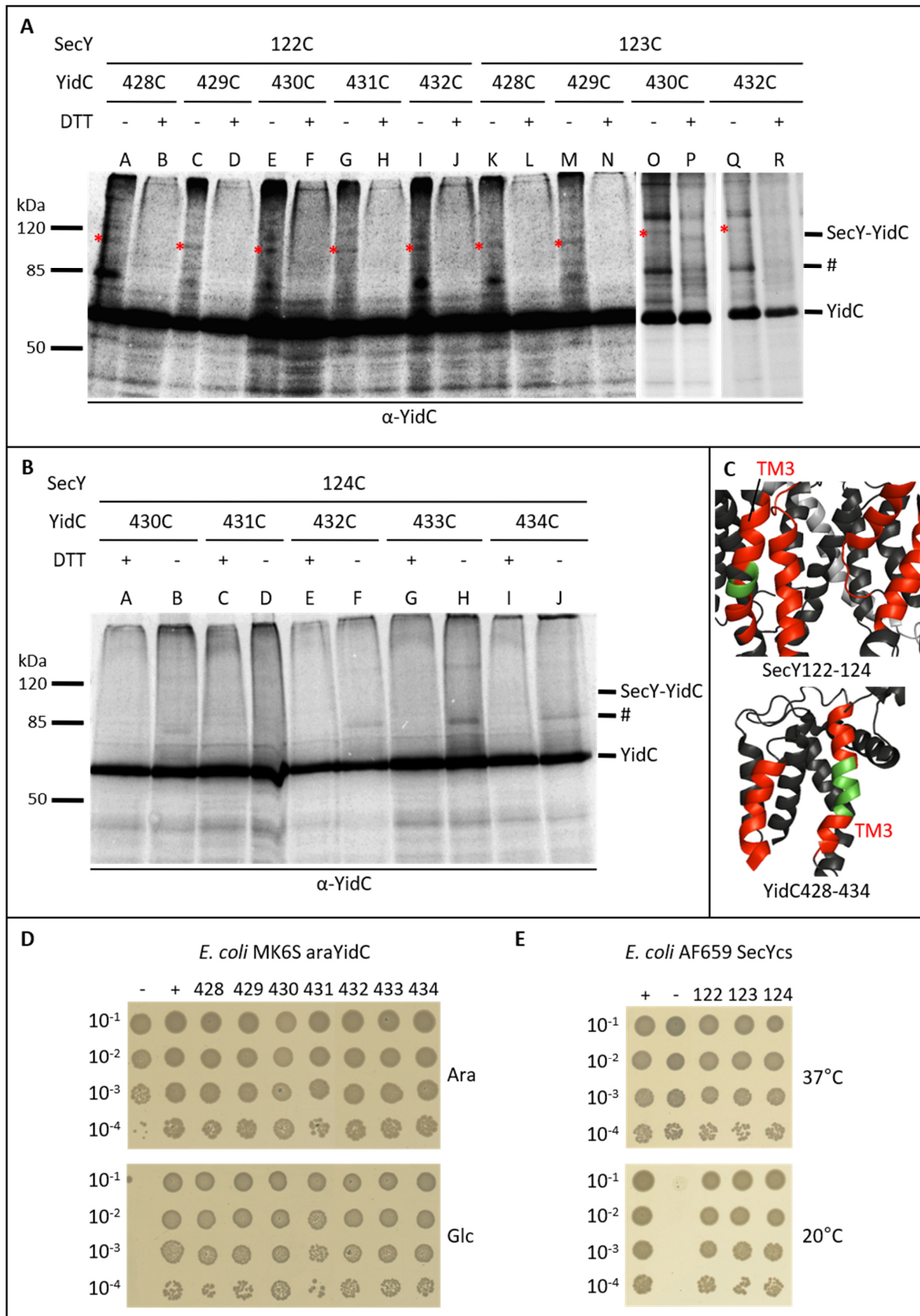


Abbildung 22: Die Transmembrandomänen 3 von SecY und YidC interagieren miteinander *in vivo*. (A) Nach der Oxidation mit DTNB und einer Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen YidC zeigen die SecY-Positionen 122 und 123 in Kombination mit verschiedenen YidC-Positionen eine Bande auf

der Höhe, auf der das *Cross-Link*-Signal (*) von SecY und YidC zu erwarten ist (~ 95 kDa). (B) Für die Position 124 von SecY wurden keine *Cross-Link*-Signale mit den getesteten YidC-Positionen detektiert. (C) Die Kristallstrukturen zeigen einen Ausschnitt von SecY (oben, PDB 3J01, Frauenfeld *et al.*, 2011) bzw. YidC (unten, PDB 3WVF, Kumazaki *et al.*, 2014b). SecE ist hellgrau dargestellt. Rot eingefärbt sind die Transmembrandomänen 3 und 5 von YidC und das *lateral gate* von SecY, grün zeigt die untersuchten Positionen von SecY (122-124) bzw. YidC (428-434). (D und E) Die Funktionalität der SecY- und YidC-Mutanten wurde in Komplementationstests nachgewiesen. Sowohl die YidC-Cysteinmutanten 428C-434C (D) als auch die SecY-Cysteinmutanten 122C-124C (E) wachsen unter nicht permissiven Bedingungen (Glc bzw. 37°C) ebenso gut wie die Positiv-Kontrollen (+), wildtypisches YidC und SecY. Die Negativ-Kontrollen (-), leerer Vektor, wachsen nur auf den Kontrollplatten (Ara bzw. 37°C).

Bei allen getesteten YidC-Positionen ist eine DTT-abhängige Bande auf der Höhe, auf der ein *Cross-Link*-Produkt aus SecY und YidC erwartet wird, mit den SecY-Positionen 122 und 123 zu sehen (Abbildung 22A). Die SecY-Position 122 zeigt mit den YidC-Positionen 430 (Spur E) und 432 (Spur I) den stärksten *Cross-Link*. Das schwächste Signal ist in Kombination mit der YidC-Position 428 (Spur A) zu finden. SecY123 zeigt etwas schwächere *Cross-Link*-Signale als SecY122 an allen untersuchten YidC-Positionen. Die *Cross-Link*-Signale weisen auf eine Interaktion der beiden Proteine an den entsprechenden Positionen hin. An der SecY-Position 124 ist dagegen kein *Cross-Link* mit YidC zu detektieren (Abbildung 22B).

Eine weitere DTT-abhängige Bande, die etwas unter 85 kDa zu finden ist (Abbildung 22A/B, markiert mit #), zeigen fast alle Kombinationen der SecY- und YidC-Positionen. Dieses Signal ist auch bei SecY124 zu finden. Auf was dieses Signal zurückzuführen ist, ist nicht geklärt. Möglicherweise handelt es sich um einen *Cross-Link* von YidC mit einem anderen Interaktionspartner. Verschiedene Möglichkeiten werden in Kapitel 4.2.1 diskutiert.

Es ist außerdem zu beobachten, dass in den Spuren, in denen die Proben nicht mit DTT reduziert wurden, ein größerer Teil der Proben nicht in das Trenngel hineinläuft, sondern an der Grenze zum Sammelgel, zu sehen am oberen Rand der Gelabbildung, hängen bleibt.

Um sicherzustellen, dass die Cysteinmutanten funktional sind, wurden Komplementationstests durchgeführt (2.6). Der Depletionsstamm *E. coli* MK6S, bei dem das chromosomale *yidC*-Gen unter Kontrolle des *araBAD*-Promotors steht, wurde verwendet, um die YidC-Mutanten auf ihre Komplementation zu untersuchen. Es wurden Verdünnungsreihen von Kulturen des Depletionsstamms angelegt, der mit einem Plasmid transformiert wurde, das das wildtypische *yidC*-Gen, das *yidC*-Gen mit der jeweiligen Cysteinmutation oder kein Insert trägt. Die Zellen wurden auf Agarplatten mit 0,2 % Arabinose bzw. 0,4 % Glukose

aufgetragen (Abbildung 22D). Unter Depletionsbedingungen (Glc) wachsen alle *E. coli* MK6S-Zellen, die die Cysteinmutanten exprimieren, ebenso gut wie der Wildtyp (+). Die Negativ-Kontrolle (-), deren Plasmid kein Insert trägt, wächst nicht. Auf der Kontrollplatte (Ara) ist in allen Fällen Wachstum zu beobachten. Die Funktionalität der SecY-Mutanten wurde im Stamm *E. coli* AF659, der eine kälte-sensitive Mutation im chromosomalen *secY*-Gen trägt, getestet. Es wurden Verdünnungsreihen von Kulturen des Temperatur-sensitiven Stamms angelegt, der mit einem Plasmid transformiert wurde, welches die wildtypischen *secYEG*-Gene, die *secYEG*-Gene mit den Cysteinmutationen oder kein Insert zur Kontrolle trägt. Die Zellen wurden auf Agarplatten aufgetragen und bei 37°C bzw. 20°C inkubiert (Abbildung 22E). Die Cysteinmutanten wuchsen bei 20°C ebenso gut wie der SecY-Wildtyp. Die Negativ-Kontrolle ohne Insert (-) bildete dagegen keine Kolonien. Auf der Kontrollplatte (37°C) ist in allen Fällen Wachstum zu beobachten. Die Funktionalität aller verwendeten SecY- und YidC-Cysteinmutanten ist damit sichergestellt.

3.1.3 Die SecY-Transmembrandomäne 8 interagiert mit der YidC-Transmembrandomäne 5

Eine Position (328) in der SecY-Transmembrandomäne 8 wurde auf Interaktionen mit der YidC-Transmembrandomäne 5 (Positionen 498-501) untersucht (Abbildung 23B). SecY-TM8 und YidC-TM5 stehen sich, wie die beiden Transmembrandomänen 3 auf der anderen Seite des *lateral gates*, direkt gegenüber und könnten somit miteinander interagieren (Abbildung 21).

Ein schwaches *Cross-Link*-Signal und damit eine mögliche Interaktion zwischen SecY und YidC wurde bei der Kombination von SecY328 mit YidC499 (Abbildung 23A, Spur 3) detektiert. Die anderen Kombinationen, mit YidC498, YidC500 und YidC501, zeigen keine Interaktion. Auch in diesem Fall ist eine kleinere DTT-abhängige Bande kurz unterhalb von 85 kDa zu finden (Abbildung 23A, Spur 3, markiert mit #). Wie schon beim vorherigen Gel in Abbildung 22 ist in den Spuren, deren Proben nicht reduziert wurden (- DTT), ein größerer Anteil der Proben nicht in das Trenngel hineingelaufen.

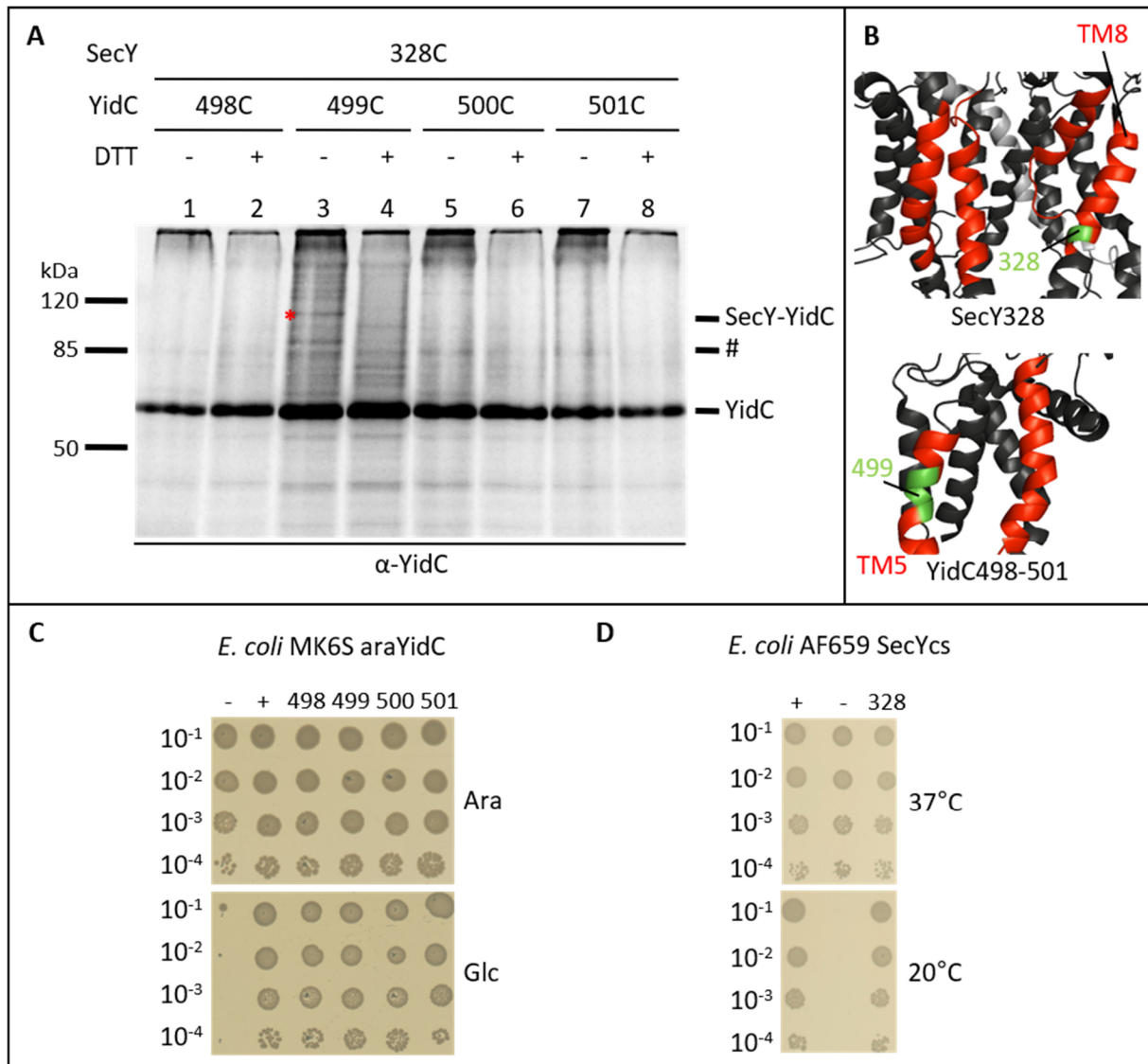


Abbildung 23: Die Transmembrandomäne 8 von SecY interagiert mit der YidC-Transmembrandomäne 5 *in vivo*. (A) Nach der Oxidation mit DTNB und einer Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen YidC zeigt Position 328 von SecY ein *Cross-Link*-Signal (*) in Kombination mit YidC499. (B) Die Kristallstrukturen zeigen einen Ausschnitt von SecY (oben, PDB 3J01, Frauenfeld *et al.*, 2011) bzw. YidC (unten, PDB 3WVF, Kumazaki *et al.*, 2014b). SecE ist hellgrau dargestellt. Rot eingefärbt sind die Transmembrandomänen 3 und 5 von YidC und das *lateral gate* von SecY, grün zeigt die untersuchten Positionen von SecY (328) bzw. YidC (498-501). (C und D) Die Funktionalität der SecY- und YidC-Mutanten wurde in Komplementationstests nachgewiesen. Sowohl die YidC-Cysteinmutanten 498C-501C (C) als auch die SecY-Cysteinmutante 328C (D) wachsen unter nicht permissiven Bedingungen (Glc/37°C) ebenso gut wie die Positiv-Kontrollen (+), wildtypisches YidC und SecY. Die Negativ-Kontrollen (-), leerer Vektor, wachsen nur auf den Kontrollplatten (Ara/37°C).

Um die Funktionalität der Cysteinmutanten zu zeigen, wurden ebenfalls wie in 3.1.2 Komplementationstests durchgeführt. Unter Depletionsbedingungen (Glc) wachsen alle *E. coli* MK6S-Zellen, die die YidC-Cysteinmutanten exprimieren, ebenso gut wie der Wildtyp (+). Die Negativ-Kontrolle (-), deren Plasmid kein Insert trägt, wächst nicht. Auf der Kontrollplatte (Ara)

ist in allen Fällen Wachstum zu beobachten (Abbildung 23C). Die SecY-Cysteinmutante wächst bei 20°C ebenso gut wie der SecY-Wildtyp. Die Negativ-Kontrolle ohne Insert (-) bildet dagegen keine Kolonien. Auf der Kontrollplatte (37°C) ist in allen Fällen Wachstum zu beobachten (Abbildung 23D). Die Funktionalität aller verwendeten SecY- und YidC-Cysteinmutanten ist damit gezeigt.

3.1.4 Die DTT-abhängige Bande ist ein *Cross-Link*-Produkt aus YidC und SecY

Durch die Depletion von endogenem YidC und die Detektion der DTT-abhängigen Banden in Abbildung 22 und Abbildung 23 durch eine Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen YidC ist gesichert, dass es sich bei dem detektierten *Cross-Link*-Produkt um die Plasmid-codierte YidC-Cysteinmutante handelt. Sichergestellt werden muss aber, dass der *Cross-Link* tatsächlich durch eine Interaktion mit SecY entstanden ist. Außerdem muss überprüft werden, ob das *Cross-Link*-Signal auf eine Interaktion mit der Position von SecY, an der die Mutante das Cystein trägt, zurückzuführen ist und nicht durch Interaktion mit den Cystein-Positionen des endogenen SecY (329 und 385) entstanden ist. Hierfür wurden Kontrollen durchgeführt.

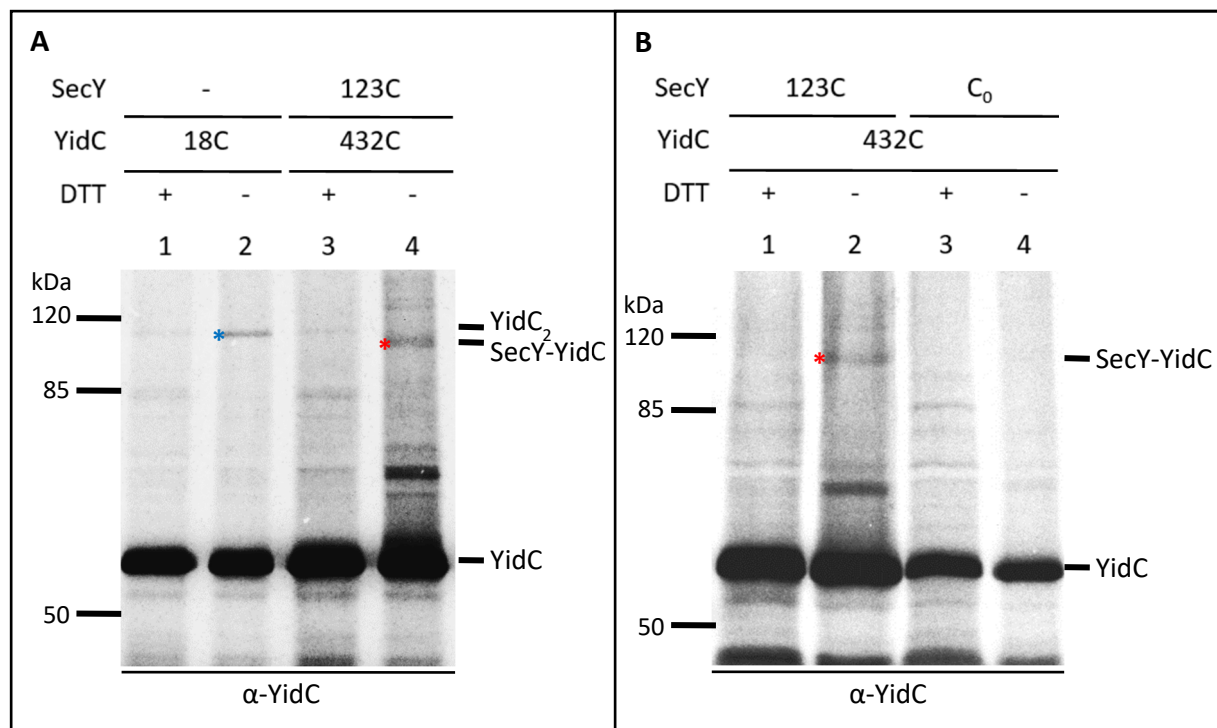


Abbildung 24: Kontrollen zur Bestätigung des SecY/YidC *Cross-Links*. (A) Um ein YidC-Dimer ausschließen zu können, wurde der DTNB-*Cross-Link* aus SecY und YidC mit einem DTNB-*Cross-Link* aus einer Dimer-bildenden YidC-Mutante in Abwesenheit von SecY verglichen. Das *Cross-Link*-Signal des YidC-Dimers (*) läuft im SDS-Gel oberhalb des SecY/YidC-Signals (*). (B) Die Cystein-freie SecY-Mutante C₀ zeigt im Vergleich zu SecY123 keinen *Cross-Link* (*) mit YidC432.

Um auszuschließen, dass es sich bei dem potenziellen SecY/YidC-Cross-Link-Produkt eigentlich um ein YidC-Dimer handelt, wurde durch Oxidation einer Dimer-bildenden YidC-Mutante (Cystein an Position 18) mit DTNB in Abwesenheit von SecY ein YidC-Dimer erzeugt. Im Vergleich zu der potenziellen Cross-Link-Bande, die sich aus SecY123 und YidC432 ergibt, zeigt sich, dass das YidC-Dimer (Spur 2) im SDS-Gel höher läuft als das SecY/YidC-Oxidationsprodukt (Spur 4). Ein YidC-Dimer kann somit ausgeschlossen werden (Abbildung 24A). Hier zeigt sich außerdem wieder deutlich die DTT-abhängige Bande zwischen 50 und 85 kDa (Spur 4). In Abwesenheit von SecY wird diese Bande nicht detektiert.

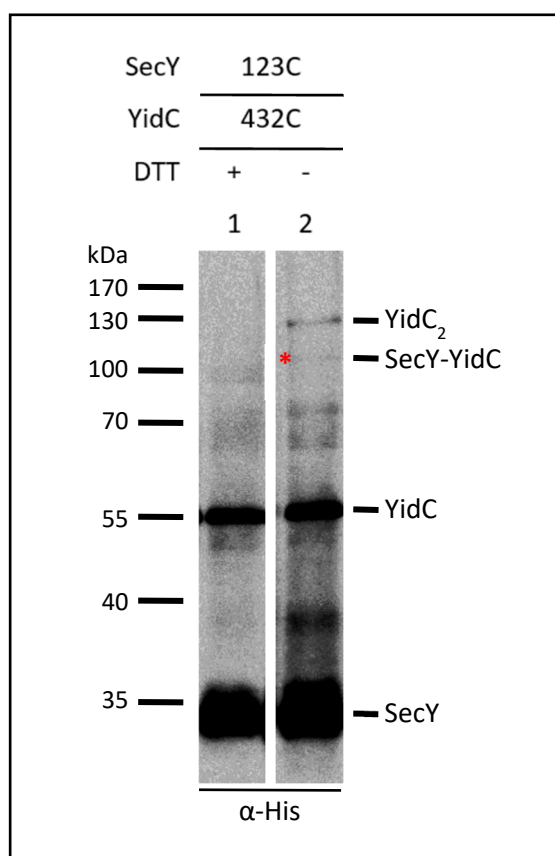


Abbildung 25: Cross-Link zwischen gereinigtem SecY und YidC in Proteoliposomen *in vitro*. Nach der Rekonstitution von SecY123 und YidC432 in Proteoliposomen und der Oxidation mit DTNB zeigt sich ebenfalls das SecY/YidC-Cross-Link-Signal (*).

Als Negativ-Kontrolle wurde die YidC-Mutante mit einem Cystein an Position 432 mit einer SecY-Mutante, die kein Cystein enthält, oxidiert (Abbildung 24B). Im Vergleich zu SecY123C (Spur 2) ist mit der Cystein-freien SecY-Variante (Spur 4) kein Cross-Link zu detektieren. Damit kann ausgeschlossen werden, dass das Cross-Link-Produkt aus einem anderen Protein als SecY mit YidC zustande kommt. Wäre der Cross-Link durch eine Interaktion mit einer der Cystein-Positionen des endogenen SecY entstanden, hätte auch in diesem Fall ein Cross-Link-Produkt detektiert werden müssen. Somit kann auch ein falsch positives Ergebnis durch die Anwesenheit von endogenem SecY ausgeschlossen werden.

Als weitere Kontrolle wurden SecY und YidC gereinigt und anschließend im Verhältnis 1:1 mit DOPC-Liposomen rekonstituiert (Verhältnis

Protein:Lipid \approx 1:2000). Die entstandenen Proteoliposomen wurden wie die Zellen in den *in vivo*-Experimenten oxidiert. Nach einer TCA-Fällung wurden die Proben in SDS-Probenpuffer mit bzw. ohne DTT aufgenommen, auf ein SDS-Gel aufgetragen und im Anschluss über

Western-Blotting mit einem anti-His-Antikörper detektiert. Auch in diesem Fall wird eine DTT-abhängige Bande, die dem SecY/YidC-Cross-Link zugeordnet werden kann, detektiert (Abbildung 25). Da nur die beiden gereinigten Proteine im Versuchsansatz anwesend waren, ist sichergestellt, dass es sich bei dem Cross-Link-Produkt um SecY und YidC, die an den Cystein-Positionen 123 bzw. 432 vernetzt sind, handelt. Das Signal des Cross-Links ist, vor allem im Vergleich mit den vorigen Versuchen, schwach. Möglicherweise ist der His-Tag des Cross-Link-Produkts für den anti-His-Antikörper in der Immundetektion des Western Blots nicht gut zugänglich. Bei den *in vivo* Versuchen wurde die Immunpräzipitation mit einem anti-YidC-Antikörper durchgeführt.

Das YidC-Dimer ist oberhalb des SecY/YidC-Cross-Links zu finden. *In vivo* bildete sich bei der Kombination SecY123C/YidC432C kein Dimer (Abbildung 24). Dieses hat sich nur bei dem *in vitro* Experiment gebildet. In Proteoliposomen, in denen nur SecY und YidC anwesend sind, hat YidC keine anderen Interaktionspartner mehr, wodurch schwache Interaktionen gestärkt werden.

3.2 SecY interagiert mit YidC *in vitro* mit einer hohen Affinität

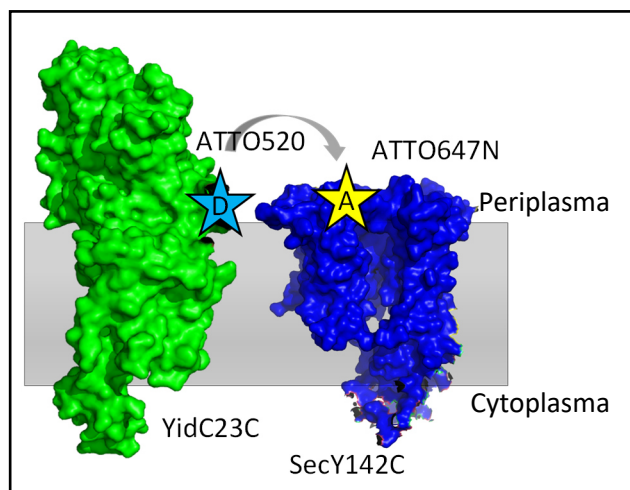


Abbildung 26: Die Membranproteine SecY142C und YidC23C sind auf der periplasmatischen Seite mit ATTO520 und ATTO647N markiert. Bei einer Interaktion der beiden Proteine wird der Abstand zwischen den Fluoreszenz-Farbstoffen klein genug, sodass es zu einem Energietransfer (FRET) kommt. (YidC: PDB 3WVF, Kumazaki *et al.*, 2014b; SecY: PDB 3J01, Frauenfeld *et al.*, 2011)

Erfolgreiche *Cross-Linking*-Experimente werden nur bei einer Überexpression von SecY und YidC erreicht (Petriman *et al.*, 2018). Mit dieser niedrigen SecYEG-YidC-Cross-Linking-Effizienz ist eine genaue Kartierung der Interaktionen *in vivo* schwierig. Aus diesem Grund wurden verschiedene *in vitro* FRET-Experimente (1.3.2) mit gereinigten Proteinen durchgeführt, die Interaktionen von SecY und YidC zeigen sollen. Für diese Fluoreszenz-Messungen mussten SecY und YidC nach der Reinigung spezifisch mit Fluoreszenz-Farbstoffen markiert

werden. Hierfür wurden Einzelcystein-Mutanten der Proteine und Maleimid-gekoppelte Farbstoffe verwendet. Diese Farbstoffe binden kovalent an die Thiol-Gruppe der Cysteinreste. So können Proteine spezifisch an einer bestimmten Position markiert werden. YidC wurde an Position 23 mit dem Donor-Farbstoff ATTO520 markiert, SecY an Position 142 mit dem Akzeptor-Farbstoff ATTO647N. Beide Proteine sind damit auf der periplasmatischen Seite markiert (Abbildung 26). Ein Energietransfer kann nur dann gemessen werden, wenn sich die beiden Farbstoffe in unmittelbarer Nähe zueinander befinden, also SecY und YidC interagieren, und damit der Abstand der an die Proteine gebundenen Farbstoffe klein genug ist (1.3.2).

3.2.1 Reinigung der Membranproteine SecYEG und YidC

Für die *in vitro* Experimente mussten sowohl die Translokase SecYEG als auch die Insertase YidC gereinigt werden (2.8).

Reinigung des Membranproteins SecYEG

Die Translokase SecYEG (SecY142C) wurde im *E. coli*-Stamm SF100 im 2 L-Maßstab von einem pTrc99a Vektor über zwei Stunden bei 37°C exprimiert. Nach der Membranpräparation wurde SecYEG mit 2 % DDM solubilisiert und über eine Nickel-Affinitätschromatographie (IMAC) mithilfe eines N-terminalen His-Tags am SecY isoliert. SecYEG wurde in 7 x 1 mL-Fractionen

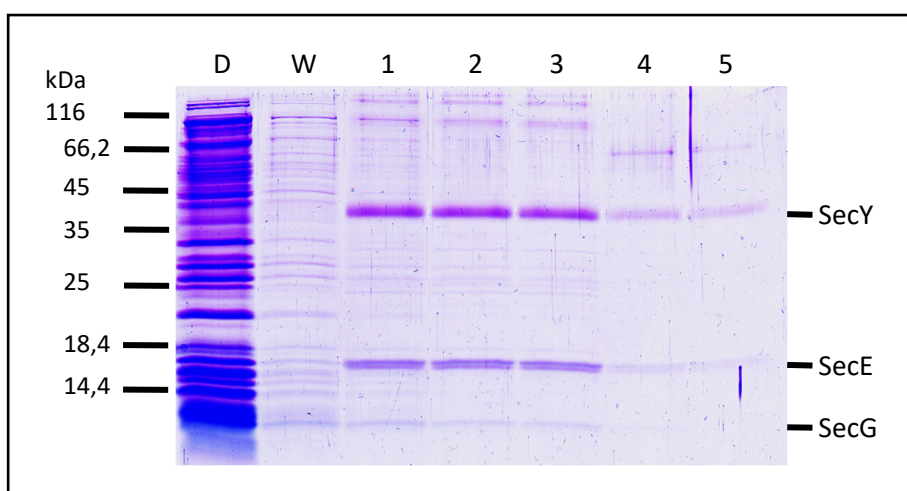


Abbildung 27: Reinigung der Translokase SecYEG (SecY142C). Nach der IMAC wurden Proben (20 µL) des Durchlaufs D, der Waschfraktion W und der Elutionsfraktionen 1-5 auf ein SDS-Gel (15 %) aufgetragen und mit Coomassie gefärbt. Durch die native Reinigung werden neben SecY auch SecE und SecG mitgereinigt.

eluiert. Von den Elutionsfraktionen sowie von Durchlauf und Waschfraktion wurden je 20 µL auf ein 15 %iges SDS-Gel aufgetragen und mit Coomassie gefärbt. Bei der nativen Reinigung werden neben SecY auch SecE und SecG mitgereinigt (Abbildung 27). SecYEG ist hauptsächlich in den ersten drei Elutionsfraktionen zu finden. Das Protein wurde nach dem Schockgefrieren bei -80°C gelagert und für spätere *in vitro* Analysen verwendet.

Zur Bestimmung der Konzentration (2.11) wurde an einem UV-Vis-Spektrometer die Absorption bei 280 nm gemessen. Für die Fraktionen 1-3 (Abbildung 27), die zuvor vereint und dialysiert wurden, um das Imidazol zu entfernen, wurde eine Konzentration von 6,35 µM berechnet ($\epsilon_{\text{SecY142C}}=44350 [1/(M \times \text{cm})]$).

Reinigung des Membranproteins YidC

Die Insertase YidC (23C) wurde in *E. coli* C43 im 2 L-Maßstab vom einem pMS Vektor (bzw. pGZ im Fall der YidC 5S-Mutante) über zwei Stunden bei 37°C exprimiert.

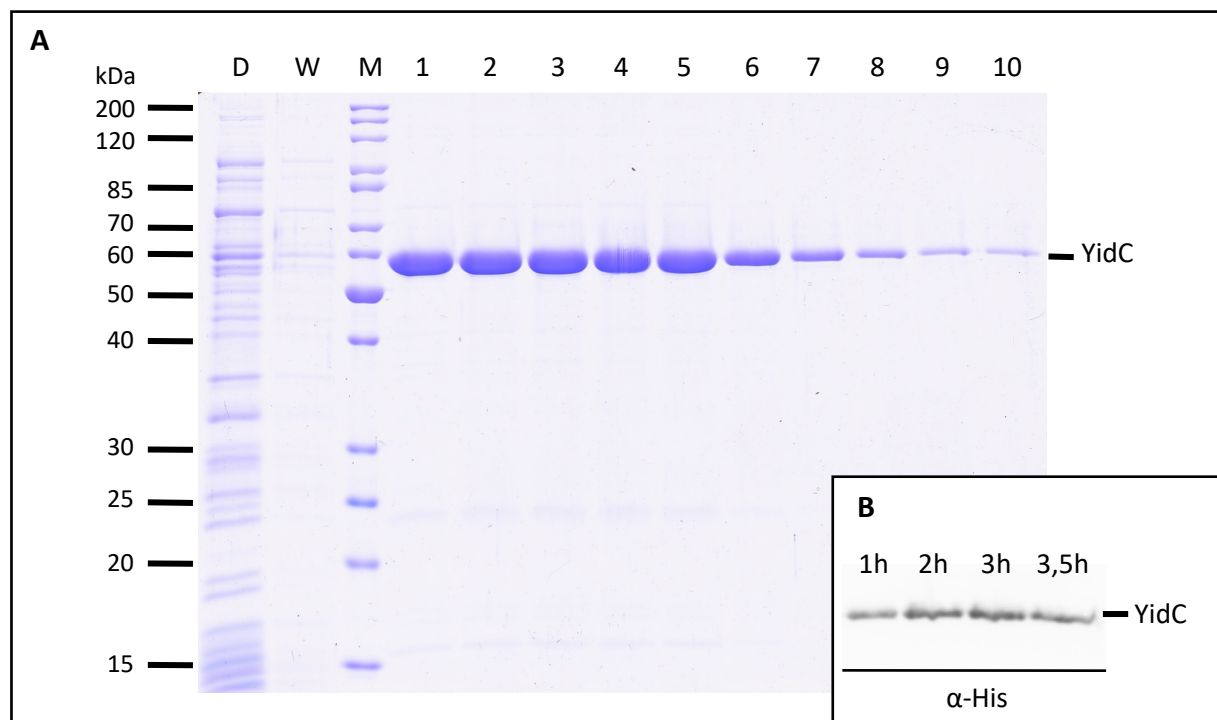


Abbildung 28: Expression und Reinigung der Insertase YidC (23C). (A) Nach der IMAC wurden Proben (20 µL) des Durchlaufs D, der Waschfraktion W und der Elutionsfraktionen 1-10 auf ein SDS-Gel (12 %) aufgetragen und mit Coomassie gefärbt. YidC ist mit abnehmender Konzentration in allen zehn Elutionsfraktionen zu finden. (B) YidC wurde für die Reinigung über zwei Stunden exprimiert, ein längerer Zeitraum führte im Expressionstest zu einer Abnahme der YidC-Ausbeute.

Ein längerer Expressionszeitraum führt zu einer sinkenden YidC-Ausbeute. Dies wurde in einem Expressionstest bestimmt (Abbildung 28B). Es wurden Proben zu unterschiedlichen

Zeitpunkten nach der Induktion gezogen und mit TCA gefällt. Nach der Normierung auf die jeweilige Optische Dichte wurden die Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen und YidC im Western Blot mittels einem anti-His-Antikörper detektiert.

Nach der Expression und der Membranpräparation wurde YidC mit 1 % DDM solubilisiert und ebenfalls über eine Ni-NTA-Säule mithilfe eines C-terminalen His-Tags isoliert. Eluiert wurde mit 10 mL (\cong 10 CV) in 1 mL-Fractionen. Von den Elutionsfraktionen sowie von Durchlauf und Waschfraktion wurden je 20 μ L auf ein 12 % SDS-Gel aufgetragen und mit Coomassie gefärbt. YidC ist mit abnehmender Konzentration in allen zehn Elutionsfraktionen zu finden (Abbildung 28A). Das Protein wurde nach dem Schockgefrieren bei -80°C gelagert und für spätere *in vitro* Analysen verwendet.

Über die Messung der Absorption bei 208 nm an einem UV-Vis-Spektrometer wurde die Konzentration bestimmt (2.11). Für die vereinten und dialysierten Fraktionen 1-3 (Abbildung 28) ergab sich eine Konzentration von 7,4 μ M ($\epsilon_{\text{YidC}23\text{C}}=90760 [1/(\text{M} \times \text{cm})]$).

Um die beste Lagertemperatur für gereinigtes YidC in Glycerin- und DDM-haltigem Puffer zu bestimmen, wurde eine YidC-Probe gedrittelt und bei 4°C, -20°C und -80°C gelagert. Nach zwei Wochen wurde überprüft, wieviel YidC bei welcher Temperatur ausgefallen ist. Nach Zentrifugation der Proben wurden 10 % der Überstände (um das Gel nicht zu überladen) und die gesamten Pellets (um sicherzugehen, dass genug Protein aufgetragen wird, um die

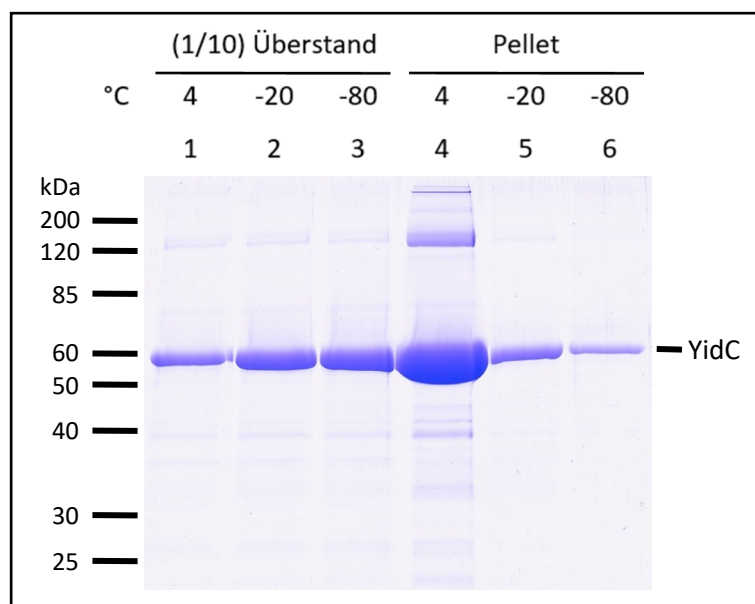


Abbildung 29: YidC ist bei -80°C am stabilsten. Bei einem Stabilitätstest über zwei Wochen zeigt sich, dass YidC bei -80°C stabiler ist als bei -20°C. Durch die Lagerung bei 4°C fällt am meisten Protein aus.

Überstände vergleichen zu können) der Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen, wobei das präzipitierte YidC in den Pellets zu finden ist. Da nur ein Zehntel der Überstände aufgetragen wurde, ist ein Vergleich nur zwischen den Pellets bzw. zwischen den Überständen sinnvoll. Eine Aussage, welcher Anteil pro Temperatur in Überstand bzw. Pellet zu finden ist, kann nicht getroffen

werden. Am stärksten fällt YidC bei einer Lagerung bei 4°C aus. Hier ist im Vergleich zu den anderen Temperaturen der größte Anteil im Pellet zu finden. Bei -80°C ist YidC am stabilsten, es fällt im Vergleich zu 4°C und -20°C am wenigsten Protein aus (Abbildung 29). Da aber auch hier wenig Protein ausfällt, wurden die Proben nach dem Auftauen immer zentrifugiert und mit dem Überstand weitergearbeitet.

3.2.2 Fluoreszenzfarbstoff-Markierung von SecYEG und YidC

Für die späteren FRET-Messungen mussten die gereinigten Proteine spezifisch mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden (2.9). Hierzu wurden Einzelcystein-Mutanten der Proteine und Maleimid-gekoppelte Farbstoffe verwendet. Diese Farbstoffe binden an die Thiol-Gruppe der Cysteinreste. So können Proteine spezifisch an einer bestimmten Position markiert werden. Es wurden die Farbstoffe ATTO520 und ATTO647N (ATTO-TEC) eingesetzt. Im Anschluss an die eigentliche Markierung mit 1,3-fachem molaren Überschuss an Farbstoff (2.9) musste der übrige nicht gebundene Farbstoff von den markierten Proteinen über eine Größenausschlusschromatografie (2.10) abgetrennt werden. Um die Abtrennung des freien Farbstoffs überprüfen zu können, wurden die Proben im Anschluss auf ein SDS-Gel (15 %) aufgetragen und die Fluoreszenz vor der Coomassie-Färbung im Fluoreszenz-Scanner detektiert. Damit der freie Farbstoff noch auf dem Gel zu sehen ist, wurde die Elektrophorese beendet, bevor die Lauffront des Probenpuffers das untere Ende des Gels erreicht hat. Da die Farbstoffe lichtempfindlich sind, mussten alle Schritte lichtgeschützt durchgeführt und die Proben lichtgeschützt gelagert werden.

Fluoreszenzfarbstoff-Markierung von YidC

Es wurden 1-2 Fraktionen (je 1 mL) aus einer YidC(23C)-Reinigung mit 1,3-fachem molaren Überschuss an ATTO520 versetzt und über Nacht bei 4°C markiert. Nach der Inkubation mit 10 mM DTT wurde die Probe über einen Konzentrator (Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter, 50K) auf 500 µL eingengt. Die Abtrennung des restlichen freien Farbstoffs von markiertem YidC erfolgte über eine Größenausschlusschromatografie (*size exclusion chromatography*, SEC) an einem ÄKTA-Proteinaufreinigungssystem.

Die SEC über eine Superdex 200 10/30-Säule mit einem Säulenvolumen von 24 mL erfolgte bei Raumtemperatur mit einer Flussrate von 0,5 mL/min im YidC-IMAC-Elutionspuffer ohne Imidazol (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 300 mM NaCl, 10 % Glycerin, 0,03 % DDM). Das Chromatogramm von YidC wurde bei einer UV-Absorption von 280 nm, das von ATTO520 bei 516 nm aufgezeichnet (Abbildung 30A). Es wurden Fraktionen von 0,5 mL gesammelt und Proben von je 20 µL/Fraktion der ersten beiden Chromatogramm-*Peaks* auf einem SDS-Gel über einen Fluoreszenz-Scanner (Typhoon TRIO+, Anregungslaser: Blue (488 nm), Emissionsfilter: 526 SOP Fluorescein Cy2 AlexaFluor488) und eine anschließende Coomassie-Färbung analysiert (Abbildung 30B). Die Fraktionen beider *Peaks* enthalten Farbstoff-markiertes YidC. Der erste *Peak*, der Fraktion 3-5 mit einem Elutionsvolumen zwischen 8 und 9,5 mL darstellt (Abbildung 30, blaues Kästchen), enthält vermutlich entweder oligomeres (z.B. dimeres YidC (Boy & Koch, 2009)) oder aggregiertes YidC, da große Moleküle schneller das Säulenmaterial durchwandern als kleine und dieser *Peak* kurz nach dem Totvolumen der Säule (~ 7 mL) eluiert wird. Die Fraktionen 10-15 des zweiten *Peaks* bei einem Elutionsvolumen zwischen 11,5 und 14,5 mL (Abbildung 30, rotes Kästchen) enthalten das monomere YidC. Die *Peaks* sind sauber voneinander getrennt. Alle analysierten Fraktionen zeigen eine einzige Farbstoff-markierte YidC-Bande im SDS-Gel und enthalten keinen freien Farbstoff mehr. In der Probe, die vor Beladen der Säule genommen wurde (Abbildung 30B, Spur L; FS=freier Farbstoff), ist der freie Farbstoff ganz unten im Gel gut zu erkennen. Der freie Farbstoff eluiert als kleines Molekül erst ganz am Ende des Säulenvolumens (~ 24 mL). Die Fraktionen 10-15 wurden bei -80°C lichtgeschützt gelagert und für spätere FRET-Experimente eingesetzt.

Zur Bestimmung der Konzentration und der *Labeling*-Effizienz (DOL, *degree of labeling*) wurde an einem UV-Vis-Spektrometer die Absorption bei 280 nm und 516 nm gemessen (2.11). Für die Fraktionen 11-14 (Abbildung 30), die zuvor vereint und dialysiert wurden, um das Glycerin für eine folgende Rekonstitution zu entfernen, wurde eine Konzentration von 0,3 µM und ein DOL von 38,5 % berechnet ($\epsilon_{\text{YidC23C}}=90760 [1/(M \times \text{cm})]$, ATTO520: $CF_{280}=0,18$, $\epsilon_{\text{max}}=110000 [1/(M \times \text{cm})]$).

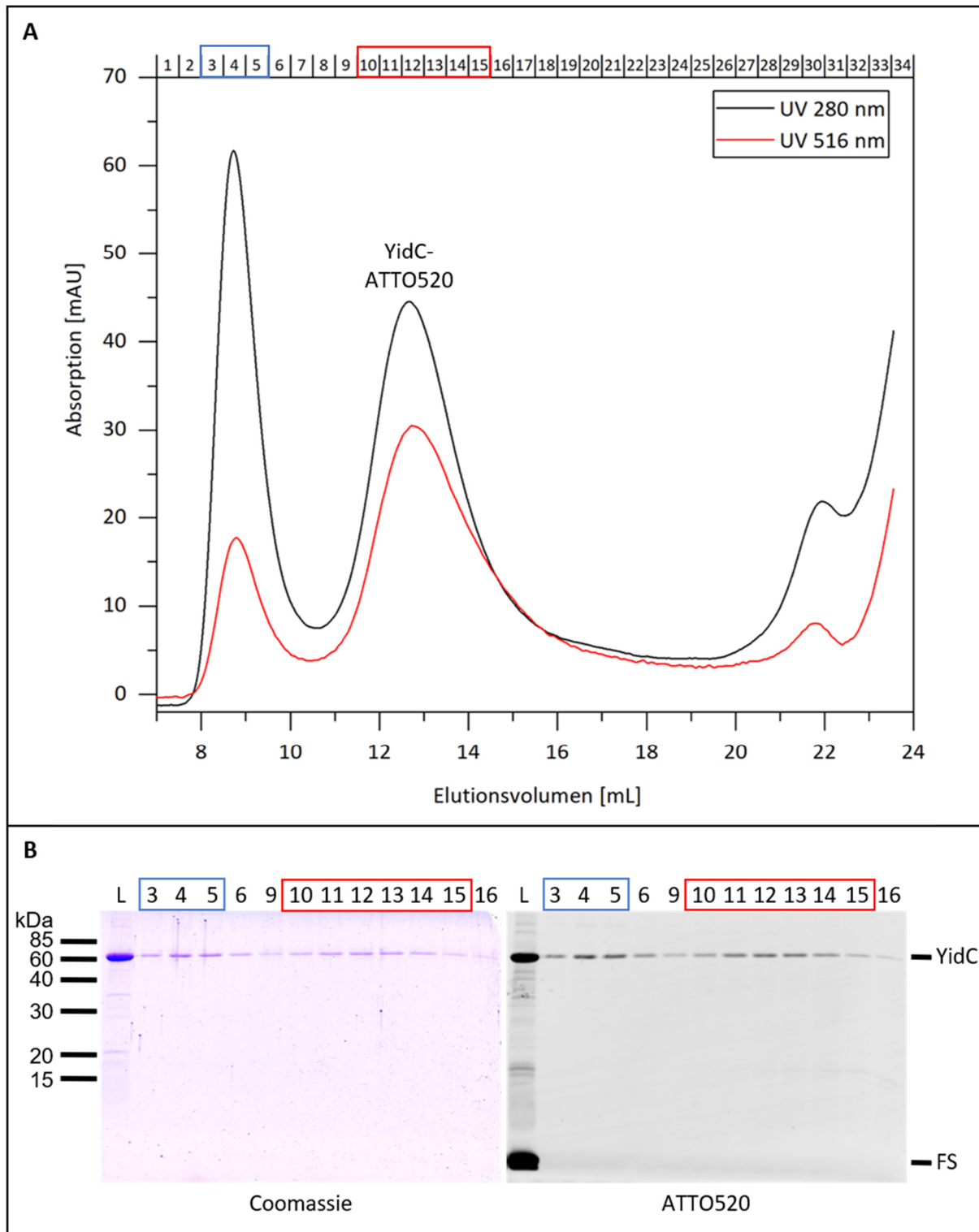


Abbildung 30: SEC-Elutionsprofil von ATTO520-markiertem YidC auf einer Superdex 200 10/30-Säule. (A) ATTO520-markiertes YidC wurde auf eine Superdex 200 10/30-Säule geladen, um markiertes YidC (zweiter *Peak* zwischen 11,5 und 14,5 mL) von freiem Farbstoff (eluiert gegen Ende des Säulenvolumens) und aggregiertem oder oligomerem YidC (erster *Peak* zwischen 8 und 9,5 mL) zu trennen (Flussrate: 0,5 mL/min). (B) Die Fraktionen der *Peaks* wurden auf einem SDS-Gel analysiert und YidC bzw. ATTO520 über einen Fluoreszenz-Scanner und anschließendes Färben mit Coomassie detektiert (Blaues Kästchen: Proben des ersten *Peaks*; rotes Kästchen: Proben des zweiten *Peaks*; L: *Load/Probe* vor Auftrennung; FS: freier Farbstoff). Es ist eine einzige Farbstoff-markierte YidC-Bande und kein freier Farbstoff zu finden.

Fluoreszenzfarbstoff-Markierung von SecYEG

Für die *Labeling*-Reaktion wurden 1-2 Fraktionen (je 1 mL) aus einer SecY(142C)-Reinigung mit 1,3-fachem molaren Überschuss an ATTO647N versetzt und über Nacht bei 4°C markiert. Nach der Inkubation mit 10 mM DTT wurde die Probe über einen Konzentrator (Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter, 50K) auf 500 µL eingengt und der restliche freie Farbstoff von markiertem SecY über eine Größenausschlusschromatographie an einem ÄKTA-Proteinaufreinigungssystem abgetrennt.

Die SecY-SEC über eine Superdex 200 10/30-Säule erfolgte bei Raumtemperatur mit einer Flussrate von 0,5 mL/min im SecY-IMAC-Elutionspuffer ohne Imidazol (20 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 10 % Glycerin, 0,03 % DDM). Das Chromatogramm von SecY wurde bei einer UV-Absorption von 280 nm, das von ATTO647N bei 644 nm aufgezeichnet (Abbildung 31A). Es wurden Fraktionen von 0,5 mL gesammelt und Proben von je 20 µL/Fraktion der ersten drei *Peaks* auf einem SDS-Gel über einen Fluoreszenz-Scanner (Typhoon TRIO+, Anregungslaser: Red (633 nm), Emissionsfilter: 670 BP 30 Cy5) und eine anschließende Coomassie-Färbung analysiert (Abbildung 31B). Der erste *Peak* bei ~ 8 mL (Abbildung 31, blaues Kästchen) und somit direkt im Anschluss an das Totvolumen (~ 7 mL) enthält kein SecY. Eventuell könnten sich Aggregate hinter diesem frühen *Peak* verbergen. Der *Peak*, der Fraktion 13-15 mit einem Elutionsvolumen zwischen 12 und 13,5 mL darstellt (Abbildung 31, rotes Kästchen), enthält Farbstoff-markiertes SecY. Es ist nur eine einzige SecY-Bande zu detektieren, freier Farbstoff ist nicht vorhanden. In der Probe, die vor Beladen der Säule genommen wurde, ist der freie Farbstoff ganz unten im Gel gut zu erkennen (Abbildung 31B, Spur L; FS=freier Farbstoff). Ab Fraktion 16 ist eine Abbau-Bande zwischen 25 und 35 kDa zu sehen, die auch im Elutionsprofil durch einen weiteren *Peak* bei ~ 14 mL, der nicht komplett vom vorigen *Peak* getrennt ist, dargestellt wird. In weiteren Farbstoff-Abtrennungen ist dieser zweite SecY-Peak oft nur als Schulter des ersten SecY-*Peaks* zu erkennen. Ab Fraktion 17 wurde außerdem freier Farbstoff mit eluiert (Abbildung 31, grünes Kästchen). Dies zeigt auch ein deutlicher Anstieg der Absorption bei 644 nm, die bis über das Ende des Säulenvolumens (~24 mL) hinaus nicht wieder komplett abfällt. In der Probe, die vor Beladen der Säule genommen wurde, ist der freie Farbstoff ganz unten im Gel ebenfalls gut zu erkennen (Abbildung 31, Spur L; FS=freier Farbstoff). Die Fraktionen 13-15 wurden bei -80°C lichtgeschützt gelagert und für spätere FRET-Experimente eingesetzt.

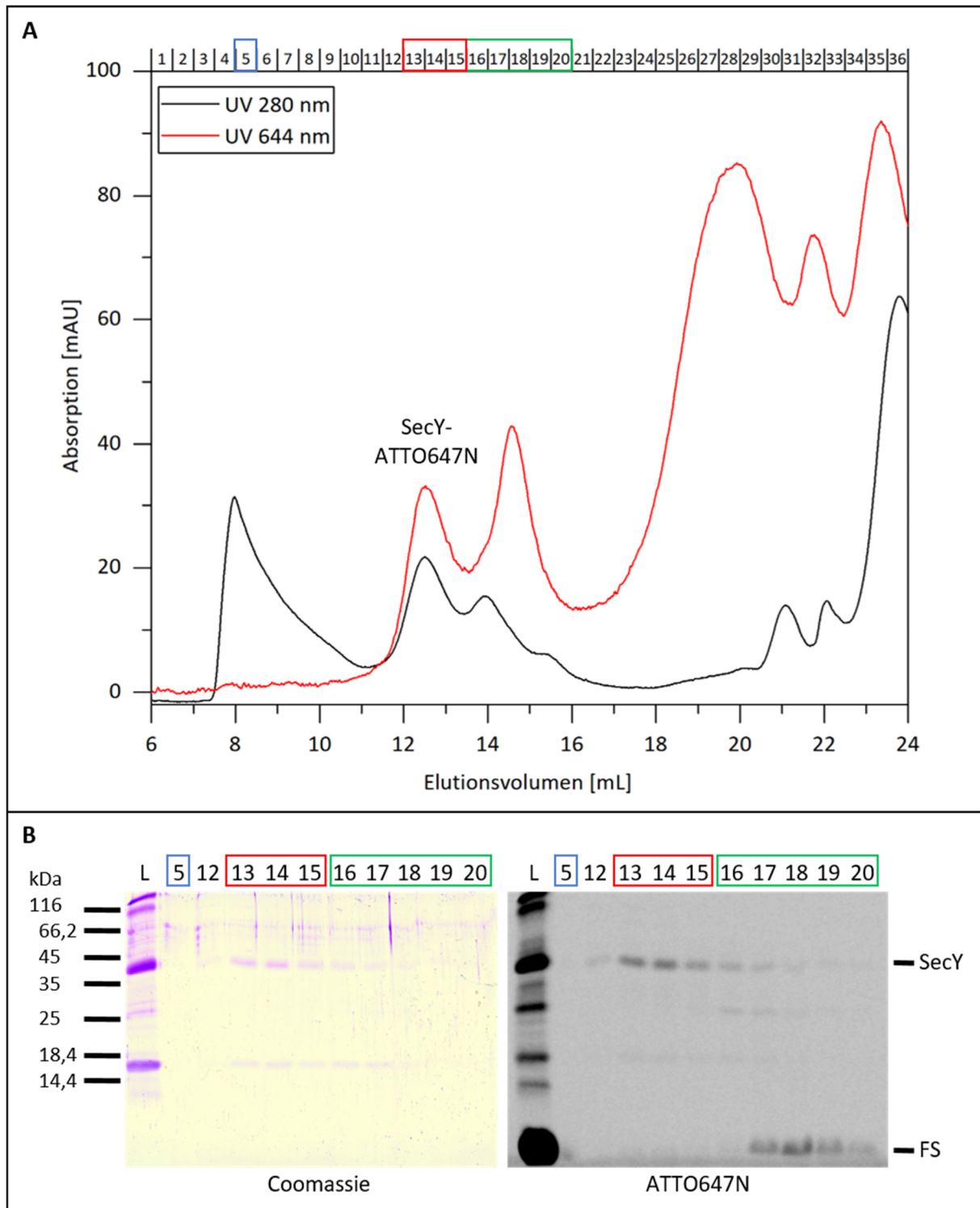


Abbildung 31: SEC-Elutionsprofil von ATTO647N-markiertem SecY auf einer Superdex 200 10/30-Säule. (A) ATTO647N-markiertes SecY wurde auf eine Superdex 200 10/30-Säule geladen, um markiertes SecY (zwischen 12 und 13,5 mL) von freiem Farbstoff (eluiert bei späterem Elutionsvolumen) zu trennen (Flussrate: 0,5 mL/min). (B) Die Fraktionen der *Peaks* wurden auf einem SDS-Gel (15 %) analysiert und SecY bzw. ATTO647N über einen Fluoreszenz-Scanner und anschließendes Färben mit Coomassie detektiert (Blaues Kästchen: Proben des ersten *Peaks*; rotes Kästchen: Proben des zweiten *Peaks*; grünes Kästchen: Proben des dritten *Peaks*; L: Load/Probe vor Auftrennung; FS: freier Farbstoff). In den Fraktionen 13-15 (rotes Kästchen) ist eine einzige Farbstoff-markierte SecY-Bande und kein freier Farbstoff zu finden.

Zur Bestimmung der Konzentration und der *Labeling*-Effizienz (DOL, *degree of labeling*) wurde an einem UV-Vis-Spektrometer die Absorption bei 280 nm und 644 nm gemessen (2.11). Für die Fraktionen 13-15, die zuvor vereint und dialysiert wurden, um das Glycerin für eine folgende Rekonstitution zu entfernen, wurde eine Konzentration von 0,72 μM und ein DOL von 20,8 % berechnet ($\epsilon_{\text{SecY142C}}=44350 [1/(\text{M} \times \text{cm})]$, ATTO647N: $\text{CF}_{280}=0,05$, $\epsilon_{\text{max}}=150000 [1/(\text{M} \times \text{cm})]$).

3.2.3 SecY und YidC interagieren in äquimolarem Verhältnis mit hoher Bindungsaffinität in Detergens

Zur Einschätzung der Bindungsaffinität der SecY/YidC-Interaktion in Detergens (DDM) wurde der K_d -Wert (Dissoziationskonstante) mithilfe von FRET-Experimenten bestimmt (2.15). Außerdem wurde die Stöchiometrie (n) berechnet. Hierzu wurde ATTO520-markiertes YidC als Donor vorgelegt (120 μL ; 0,85 μM ; DOL=18,2 %) und ATTO647N-markiertes SecY (1,32 μM ; DOL=24 %) als Akzeptor dazu titriert. Das Startverhältnis von SecY zu YidC lag bei 154 YidC-Molekülen pro SecY-Molekül. Es wurde titriert, bis 3,5 SecY-Moleküle auf ein YidC kamen. Für die FRET-Messungen wurde der Donor-Farbstoff ATTO520 mit einer Wellenlänge von 516 nm angeregt. Für jeden Titrationsschritt wurde das Spektrum der Fluoreszenz von 520-750 nm aufgenommen (Fluorolog®), um die maximale Donor-Fluoreszenz bei 538 nm und die maximale Akzeptor-Fluoreszenz bei 669 nm zu detektieren. Kommt es zur Interaktion, also zu FRET, sinkt die Donor-Fluoreszenz, die des Akzeptors steigt. Außerdem wurde analog dazu der Puffer, in dem Akzeptor SecY ATTO647N vorlag, zu YidC ATTO520 (Donor) titriert sowie der Akzeptor zu Donor-Puffer. Die Messwerte wurden damit wie in 2.15.2 beschrieben um den Verdünnungs- bzw. Konzentrationseffekt rechnerisch korrigiert und ausgewertet.

Nach dem Auftragen der Fluoreszenzmaxima des Akzeptor-Signals gegen die Konzentration des Akzeptors (Abbildung 32A) zeigt sich, dass mit steigender Akzeptor-Konzentration die Fluoreszenz ansteigt, es zu einer Sättigung und letztendlich wieder zu einer Abnahme des Signals kommt. Da die lineare und nichtlineare Kurvenanpassung nur für Sättigungskurven vorgesehen ist, wurde für die Auswertung nur der Bereich bis 0,55 μM (vor Signalabnahme) berücksichtigt. Aus den nach Lineweaver-Burk linearisierten Daten (Abbildung 32B) und der Regressionsgeraden ergibt sich folgende Funktionsgleichung:

$y = 7,891 \times 10^{-6} + 3,222 \times 10^{-7}x$. Der Korrelationskoeffizient (Pearson R) liegt bei 0,934. Es besteht also ein linearer Zusammenhang der Messpunkte. Das Bestimmtheitsmaß bzw. korrigierte R^2 beträgt 0,865. Auch damit zeigt sich, dass die Anpassung der Regressionsgeraden einen linearen Zusammenhang beschreibt. Für die Asymptote wurde ein Wert von 126722,8 CPS errechnet, die Dissoziationskonstante liegt bei $K_d = 40,8$ nM. Mit diesen Werten ergibt sich aus der nichtlinearen Regressionsanalyse (Abbildung 32A) der stöchiometrischen Faktors $n = 0,99888 \pm 0,01275$. Somit liegen SecY und YidC in einem stöchiometrischen Verhältnis von eins vor. Dieses Verhältnis ist bei einer Konzentration von SecY ATTO647N von $0,52 \mu\text{M}$ erreicht. In Abbildung 32A ist diese Konzentration rot (senkrecht) markiert. Es ist zu sehen, dass ab dieser Konzentration das Signal wieder zu sinken beginnt.

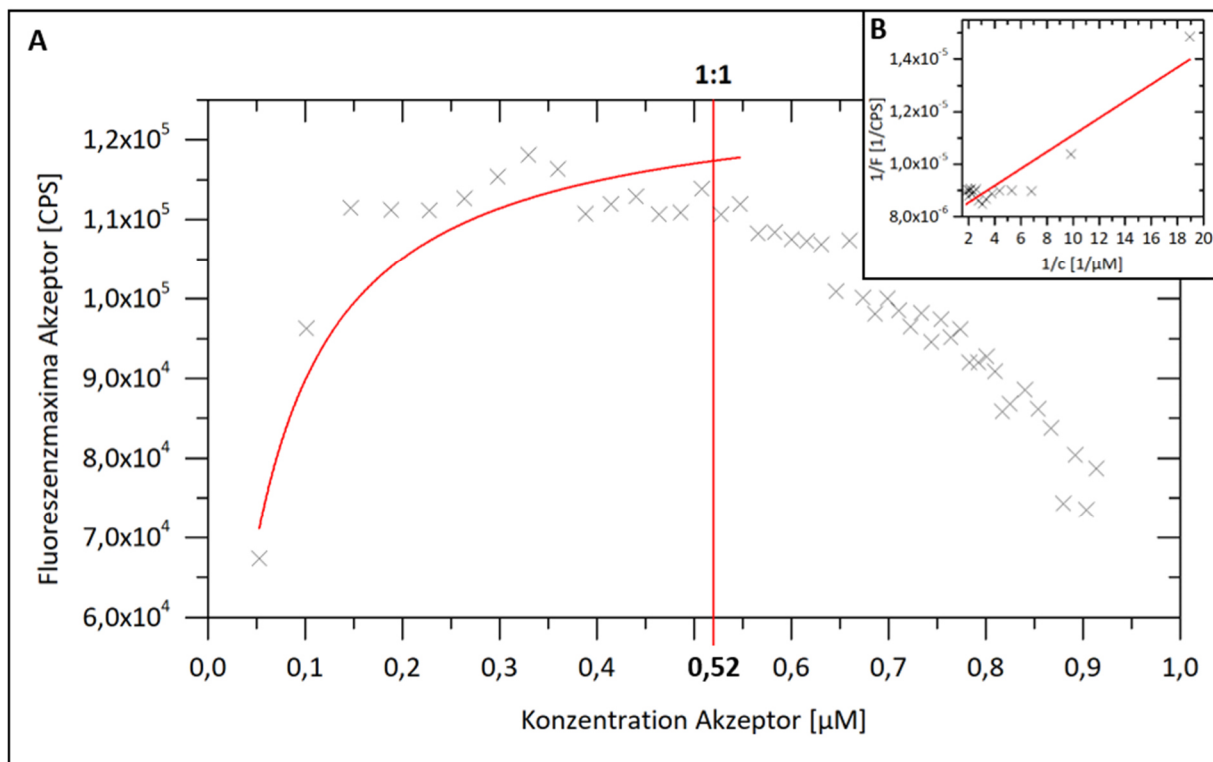


Abbildung 32: Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_d und des stöchiometrischen Faktors n in Detergens über das Fluoreszenzmaximum des Akzeptors (669 nm). (A) Die Fluoreszenzmaxima des Akzeptors wurden gegen die Konzentration des Akzeptors (SecY ATTO647N) aufgetragen. Die rote senkrechte Markierung bei einer Akzeptor-Konzentration von $0,52 \mu\text{M}$ zeigt die Konzentration an, bei der der Akzeptor und Donor, also SecY und YidC, in einem Verhältnis von 1:1 vorliegen. Die rote Kurve stellt die nichtlineare Anpassung dar. (B) Zur Berechnung der Dissoziationskonstanten K_d ($40,8$ nM) wurde eine Lineweaver-Burk Linearisierung der Daten im Bereich der Sättigungskurve (bis $0,55 \mu\text{M}$) durchgeführt und eine Regressionsgerade (rote Gerade) angepasst. Um den stöchiometrischen Faktor n ($0,99888$) zu ermitteln, wurde ein nichtlinearer Fit in diesem Bereich (A) durchgeführt.

Wie in 2.15.2 beschrieben, kann das Ergebnis durch das schwache Fluoreszieren des Donor-Farbstoffs am Fluoreszenzmaximum des Akzeptors (Abbildung 17A) verfälscht werden, je nachdem, welcher Anteil der Energie vom Donor auf den Akzeptor übertragen wird. Aus diesem Grund wurde eine Fehlerabschätzung durchgeführt und die beiden Extremfälle 'komplette Energieübertragung' (100 % FRET \cong der obigen Rechnung) und 'keine Energieübertragung' (0 % FRET) sowie der Fall, dass die Hälfte der Energie übertragen wird (50 % FRET) betrachtet. Die Werte der betrachteten Fälle sind in Tabelle 14 dargestellt. Durch die beiden betrachteten Extremfälle '0 % FRET' und '100 % FRET' ergibt sich für den K_d -Wert ein Bereich von 40,8 nM bis 150,0 nM. Das Eintreten beider Fälle ist unwahrscheinlich, da FRET auftritt (mehr als 0 %), aber nie die gesamte Energie übertragen wird (100 % wird nicht erreicht). Der tatsächliche K_d -Wert liegt also dazwischen. Für die Annahme, dass 50 % der Donor-Fluoreszenz durch FRET übertragen werden, ergibt sich ein K_d -Wert von 69,8 nM. Die Stöchiometrie wird von den unterschiedlichen Fällen kaum beeinflusst.

Tabelle 14: Dissoziationskonstante und stöchiometrischer Faktor der betrachteten Energieübertragungs-Fälle

	100 % FRET	50 % FRET	0 % FRET
K_d	40,8 nM	69,8 nM	150 nM
n	$0,99888 \pm 0,01275$	$0,995 \pm 0,0149$	$0,979 \pm 0,0217$

Durch den Energietransfer im Falle einer SecY/YidC-Interaktion wird nicht nur das Akzeptor-Signal erhöht. Es kommt außerdem zu einem Absinken des Donor-Signals. Im Folgenden wurde die Auswertung der Messung zusätzlich über das Fluoreszenzmaximum des Donors durchgeführt. Hierbei wurde überprüft, ob die Ergebnisse mit denen aus der Auswertung über das Akzeptor-Signal konsistent sind. Auch hier wurden wie oben beschrieben die Fluoreszenzmaxima des Donors gegen die Konzentration des Akzeptors aufgetragen. Auch hier kommt es zu einer Sättigung. Die Sättigung setzt etwa bei der Akzeptor-Konzentration ein, bei der ein stöchiometrisches Verhältnis von Akzeptor und Donor von 1 vorliegt. Da die Signale des Donors im Verlauf sinken, die Formel der nichtlinearen Regressionsanalyse aber für eine steigende Sättigungskurve vorgesehen ist, wurde der reziproke Wert der Fluoreszenz aufgetragen, um eine steigende Sättigungskurve für die Analyse zu erhalten (Abbildung 33A).

Entsprechend wurde für die Lineweaver-Burk Linearisierung die Fluoreszenz gegen die reziproke Akzeptor-Konzentration aufgetragen (Abbildung 33B). Aus der den linearisierten Daten ergibt sich eine Regressionsgerade mit der Gleichung: $y = 6,554 \times 10^6 + 132150,72 X$ (Korrelationskoeffizient: 0,963; korrigiertes R^2 : 0,926). Die daraus berechnete Asymptote liegt bei $1,5258 \times 10^{-7}$, der K_d -Wert beträgt 20,2 nM. Aus diesen Werten ergibt sich in der nichtlinearen Regressionsanalyse (Abbildung 33A) der stöchiometrische Faktor $n = 1,00024 \pm 0,0013$ (korrigiertes R^2 : 0,915).

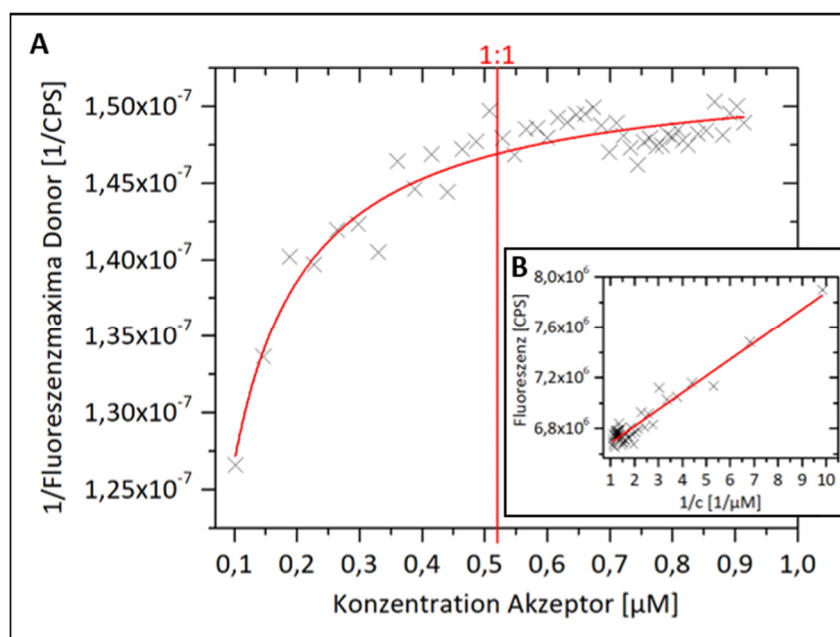


Abbildung 33: Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_d und des stöchiometrischen Faktors n in Detergens über das Fluoreszenzmaximum des Donors (538 nm). (A) Die Fluoreszenzmaxima des Donors wurden gegen die Konzentration des Akzeptors (SecY ATTO647N) aufgetragen. Die senkrechte rote Markierung bei einer Akzeptor-Konzentration von 0,52 μM zeigt die Konzentration an, bei der Akzeptor und Donor in einem Verhältnis von 1:1 vorliegen. Die rote Kurve stellt die nichtlineare Anpassung dar. (B) Zur Berechnung der Dissoziationskonstanten K_d (20,2 nM) wurde eine Lineweaver-Burk Linearisierung der Daten durchgeführt und eine Regressionsgerade (rote Gerade) angepasst. Um den stöchiometrischen Faktor n (1,00024) zu ermitteln, wurde ein nichtlinearer Fit (A) durchgeführt.

Die rote Kurve stellt die nichtlineare Anpassung dar. (B) Zur Berechnung der Dissoziationskonstanten K_d (20,2 nM) wurde eine Lineweaver-Burk Linearisierung der Daten durchgeführt und eine Regressionsgerade (rote Gerade) angepasst. Um den stöchiometrischen Faktor n (1,00024) zu ermitteln, wurde ein nichtlinearer Fit (A) durchgeführt.

Werden die Werte der Dissoziationskonstanten aus den beiden Auswertungen verglichen, zeigt sich, dass sie konsistent sind. Beide liegen im nanomolaren Bereich. Ebenso ergibt sich in beiden Fällen ein stöchiometrisches Verhältnis von 1. Das ist in Abbildung 34 zusammengefasst: Hier sind die Fluoreszenzmaxima von Akzeptor (normiert: höchster Wert = 1) und Donor (normiert: kleinster Wert = -1) gemeinsam in einem Graphen gegen die Akzeptor-Konzentration aufgetragen. Die Konzentration, bei der ein äquimolares Verhältnis von SecY und YidC besteht, ist mit einer roten Linie gekennzeichnet. Wie oben beschrieben nimmt ab dieser Konzentration das Akzeptor-Signal wieder ab, beim Donor-Signal kommt es zu einer Sättigung.

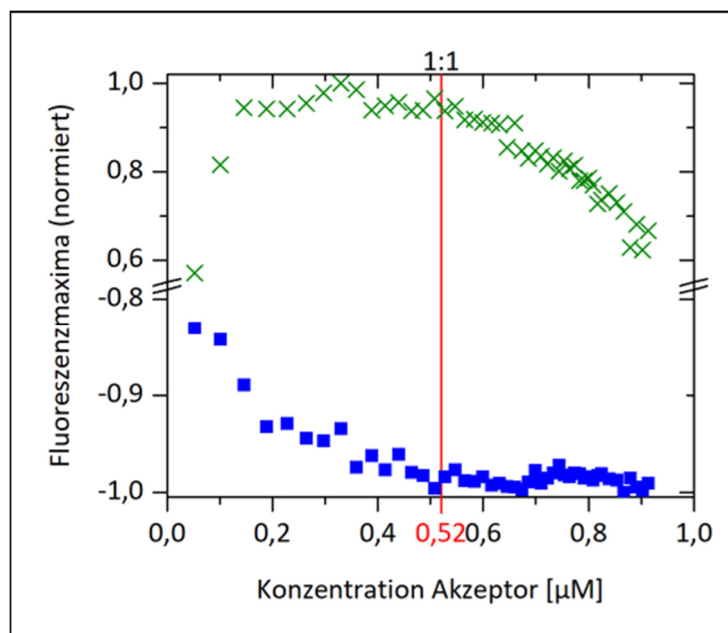


Abbildung 34: Die Zunahme der Fluoreszenz des Akzeptors (X) korreliert mit der Abnahme der Fluoreszenz des Donors (■). Die Fluoreszenzmaxima des Akzeptors wurden so normiert, dass der höchste Wert eins beträgt. Durch die Normierung der Fluoreszenzmaxima des Donors beträgt hier der kleinste Wert -1. Die rote Linie markiert das äquimolare Verhältnis von SecY und YidC.

Der Versuch wurde mit neu gereinigten Proteinen unabhängig wiederholt. Die Konzentrationen und *Labeling*-Effizienzen waren vergleichbar. Auch diese zweite Messung ergab einen K_d -Wert im nanomolaren Bereich und einen stöchiometrischen Faktor von eins (Tabelle 15).

Um zu überprüfen, ob der K_d -Wert abhängig von der Proteinkonzentration ist, wurde der Versuch außerdem mit einer geringeren Konzentration wiederholt. Der Titrationsablauf, Volumina und die Verhältnisse von SecY und YidC zueinander wurden wie oben beibehalten, die vorgelegte Donor-Konzentration wurde halbiert, ebenso die Konzentration des Akzeptors. Die Werte wurden wie oben beschrieben ausgewertet. Nach dem Auftragen der Akzeptor-Maxima gegen die Akzeptor-Konzentration zeigt sich auch hier, dass mit steigender Akzeptor-Konzentration die Fluoreszenz ansteigt, es zu einer Sättigung und letztendlich wieder zu einer Abnahme des Signals kommt (Grafiken nicht dargestellt). Aus der Lineweaver-Burk Linearisierung der Akzeptor-Maxima ergibt sich eine Dissoziationskonstante von $K_d = 28,35 \text{ nM}$ ($y = 7,430 \times 10^{-5} + 2,107 \times 10^{-6} X$; Asymptote: 13458,93 CPS; Korrelationskoeffizient: 0,95; korrigiertes R^2 : 0,90). Über die nichtlineare Anpassung ergibt sich ein stöchiometrischer Faktor von $n = 1,00953 \pm 0,01488$ (korrigiertes R^2 : 0,811). Die Werte sind vergleichbar mit denen aus den Messungen mit doppelter Konzentration (Tabelle 15). Die Bindung und damit der K_d -Wert sind also nicht abhängig von der Konzentration.

Die Daten aus allen drei Messungen sind in Tabelle 15 zusammengefasst, außerdem wurden der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet. Damit ergibt sich in Detergens eine hohe Bindungsaffinität mit der Dissoziationskonstanten von $K_d = 27,06 \pm 10,07$ nM und ein äquimolares Verhältnis von SecY und YidC mit einem stöchiometrischen Faktor von $n = 1,00363 \pm 0,00450$.

Tabelle 15: Überblick der bestimmten K_d -Werte und stöchiometrischen Faktoren aus den verschiedenen Messungen in Detergens.

Messung	Auswertung	K_d [nM]	n
1	Akzeptor-Maxima	40,8	0,99888
1	Donor-Maxima	20,2	1,00186
2	Akzeptor-Maxima	18,9	1,00423
3 (halbe Konzentration)	Akzeptor-Maxima	28,35	1,00953
	Mittelwert	27,06	1,00363
	Standardabweichung	10,07	0,00450

3.2.4 Rekonstitution der Membranproteine SecYEG und YidC

Translokasen und Insertasen brauchen, um ihre Funktion ausführen zu können, membranumschlossene Kompartimente. Darum wurden sie für spätere FRET-Messungen nach der Reinigung mit Liposomen rekonstituiert. So können sie unter definierten Bedingungen *in vitro* in Proteoliposomen untersucht werden. Für die Fluoreszenzmessungen wurden DOPC-Liposomen verwendet, da diese bei den Messungen wenig Hintergrund zeigen.

Liposomen bestehen aus einer Doppelschicht an Phospholipiden und schließen eine wässrige Phase ein. Damit dienen sie als Modell für Biomembranen. Sie können einschichtig (unilamellar) sein, also wie die innere *E. coli*-Membran eine Lipiddoppelschicht besitzen, oder aus mehreren Lipiddoppelschichten bestehen (multilamellar). Multilamellare Liposomen entstehen spontan beim Kontakt der Lipide mit einer wässrigen Lösung (Olson *et al.*, 1979).

Um unilamellare Liposomen zu erhalten, werden multilamellare Liposomen durch einen Extruder gepresst (Avanti Polar Lipids, 2019; Rehm & Letzel, 2010; Szoka *et al.*, 1980). Werden zuvor Membranproteine zugegeben, entstehen dabei Proteoliposomen (2.13). Die Membranproteine SecY beziehungsweise YidC wurden vor der Extrusion mit DOPC-Liposomen im molaren Verhältnis von 1:1000 (Protein:Lipid) gemischt. Außerdem wird durch die Extrusion die Größenverteilung der Liposomen reproduzierbar (Avanti Polar Lipids, 2019; Rehm & Letzel, 2010; Szoka *et al.*, 1980). Dies zeigt sich bei der Messung der Partikelgröße (2.14) über die dynamische Lichtstreuung (Tabelle 16).

Bei der Rekonstitution und den weiteren Versuchen mit den Proteoliposomen sollte oberhalb der Phasenübergangstemperatur T_c gearbeitet werden. Unterhalb dieser Temperatur werden die Liposomen als 'fest' betrachtet. Die Phospholipide befinden sich in einem geordneten Zustand, die Kohlenwasserstoffketten sind eng gepackt. Oberhalb der T_c wird der Zustand als eher 'fluid' angesehen. Die Kohlenwasserstoffketten sind zufällig orientiert und ungeordnet (Avanti Polar Lipids, 2019; Rehm & Letzel, 2010; Szoka *et al.*, 1980). Für die Extrusion von SecY und YidC mit DOPC-Liposomen wurde die Apparatur daher zuvor auf 37°C erwärmt.

Nach der Extrusion wurde das Detergens, das im Protein-Puffer vorhanden war, mithilfe von Bio-Beads entfernt, um die Proteoliposomen zu stabilisieren. Durch Zentrifugation wurden die Proteoliposomen geerntet. Um die Liposomen pelletieren zu können, ist es wichtig, dass vor der Extrusion das Glycerin im Protein-Puffer durch Dialyse entfernt wurde. Im Überstand verbleiben die nicht rekonstituierten Proteine. Die Proteoliposomen wurden pelletiert und im gewünschten Puffer ohne Detergens oder Glycerin aufgenommen.

Zur Kontrolle der Rekonstitution wurden die Proteoliposomen nach den FRET-Messungen ebenso wie die Überstände mit TCA gefällt und auf SDS-Gele, die im Anschluss mit Coomassie gefärbt wurden, aufgetragen. Die Membranproteine SecY und YidC wurden fast vollständig in die DOPC-Liposomen eingebaut (Abbildung 35). Außerdem funktioniert die Rekonstitution wie ein zusätzlicher Reinigungsschritt. Verunreinigungen, die bei der Protein-Reinigung zuvor nicht entfernt werden konnten, finden sich in den Proteoliposomen nicht wieder.

Die Proteoliposomen haben eine durchschnittliche Größe (Durchmesser) von 160,6 ($\pm 28,2$) nm. Berechnet wurde der Wert aus Messungen von fünf unabhängig voneinander hergestellten Proteoliposomen-Suspensionen (Tabelle 16). Die Polydispersität als Maß für die Einheitlichkeit der Partikelgröße liegt zwischen 24,4 und 40 %.

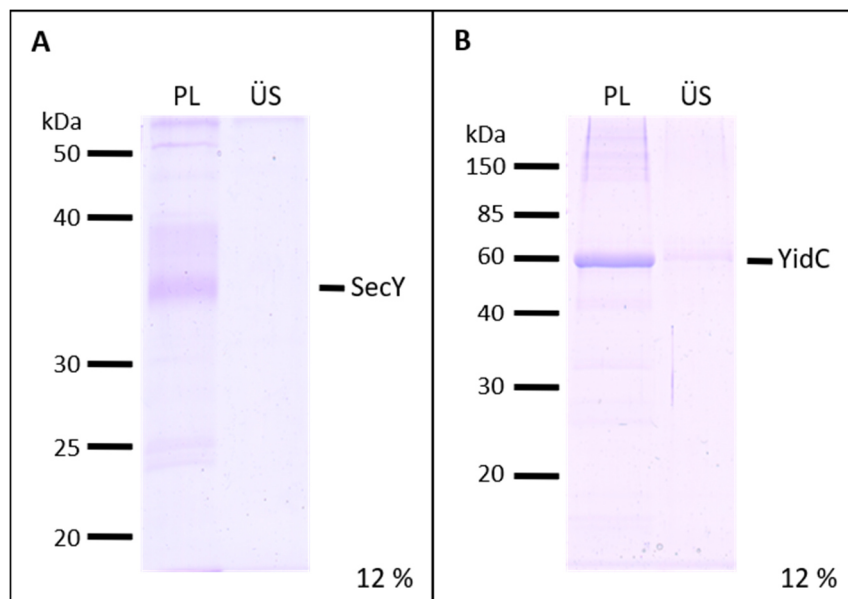


Abbildung 35: Rekonstitution der Membranproteine mit DOPC-Liposomen. Nach der Extrusion der Membranproteine mit multilamellaren DOPC-Liposomen wurde das Detergens über eine Bio-Bead-Adsorption entfernt und die Proteoliposomen (PL) geerntet. Bei der Zentrifugation wurden die Proteoliposomen pelletiert, die nicht aufgenommenen Proteine bleiben im Überstand (ÜS) zurück. Die resuspendierten Proteoliposomen und die Überstände wurden mit TCA gefällt, auf SDS-Gele aufgetragen und mit Coomassie gefärbt. Die Membranproteine SecY (A) und YidC (B) werden fast vollständig in DOPC-Liposomen eingebaut.

Tabelle 16: DLS-Messdaten der Proteoliposomen

Messung	Durchschnittlicher Durchmesser [nm]	Polydispersität [%]
1	184,34	24,37
2	190,77	27,07
3	164,40	40,03
4	135,79	33,77
5	127,75	29,87
Mittelwert	160,61	31,02
Standardabweichung	28,21	6,12

3.2.5 Bestimmung der Affinität und der Stöchiometrie der SecY/YidC-Interaktion in DOPC-Proteoliposomen

Da SecY und YidC als Membranproteine natürlicherweise nicht löslich sind, wurde die Bestimmung der Dissoziationskonstanten und des stöchiometrischen Faktors nicht nur in Detergens durchgeführt. Auch rekonstituiert mit DOPC-Proteoliposomen wurden diese Werte bestimmt. Zwar setzen sich die Phospholipide der *E. coli* Membran eigentlich aus Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerol (PG) und Cardiolipin (CL) zusammen (Raetz & Dowhan, 1990), trotzdem wurden hier für die Rekonstitution DOPC-Lipide verwendet. DOPC ist deutlich reiner erhältlich und ergibt somit weniger Hintergrund bei den Fluoreszenzmessungen als PE und PG. Es wurden verschiedene Verhältnisse von Fluoreszenzfarbstoff-markiertem SecY (Akzeptor, DOL 24,7 %) und YidC (Donor, DOL 30,7 %) rekonstituiert, mit Donor: Akzeptor = 0:1 bis 20:1. Bei der Rekonstitution wurde das unterschiedliche Volumen des Donors durch Puffer ausgeglichen. Ein Protein:Lipid-Verhältnis von etwa 1:1000 ist bei der Probe mit dem Verhältnis SecY:YidC = 1:1 gegeben. Angeregt wurde mit 516 nm, das Spektrum von 520 bis 750 nm wurde für jedes Protein-Verhältnis aufgenommen.

Bei der Bestimmung der Parameter in Detergens wurde titriert, was eine Volumenänderung zur Folge hatte. Hier wurden SecY und YidC für jede einzelne Probe bereits bei der Rekonstitution zu Proteoliposomen im gewünschten Verhältnis gemischt und die Proteoliposomen nach der Ernte alle im gleichen Volumen aufgenommen. Jede Messung wurde somit im gleichen Volumen durchgeführt. Es kommt also zu keinem Konzentrations- oder Verdünnungseffekt durch Volumenänderung, eine Puffermessung wurde nicht durchgeführt. Eine rechnerische Korrektur des Akzeptor-Signals ist damit nicht nötig. Da jede Probe eine unterschiedliche Menge an Donor enthält, kann die Auswertung ausschließlich über das Akzeptor-Signal und nicht über das Donor-Signal erfolgen.

Zur Auswertung wurden die Fluoreszenz-Maxima des Akzeptors gegen die Donor-Konzentration aufgetragen, die Asymptote (9395,14 CPS) und die Dissoziationskonstante über die Regressionsgerade ($y = 1,064 \times 10^{-4} + 1,059 \times 10^{-4}X$, Korrelationskoeffizient: 0,927, korrigiertes R^2 : 0,841) der nach Lineweaver-Burk linearisierten Daten (Abbildung 36B) und die Stöchiometrie über die nichtlineare Anpassung (Abbildung 36A, korrigiertes R^2 : 0,947)

bestimmt. Der stöchiometrische Faktor liegt wie schon bei den Messungen in Detergens bei $n = 1,0537 \pm 0,03928$. Die Dissoziationskonstante dagegen liegt mit $K_d = 994,5$ nM um etwa das 30-fache über dem Wert, der in Detergens bestimmt wurde. Die Bindungsaffinität von SecY und YidC ist nach diesem Wert in den Proteoliposomen also geringer als in Detergens.

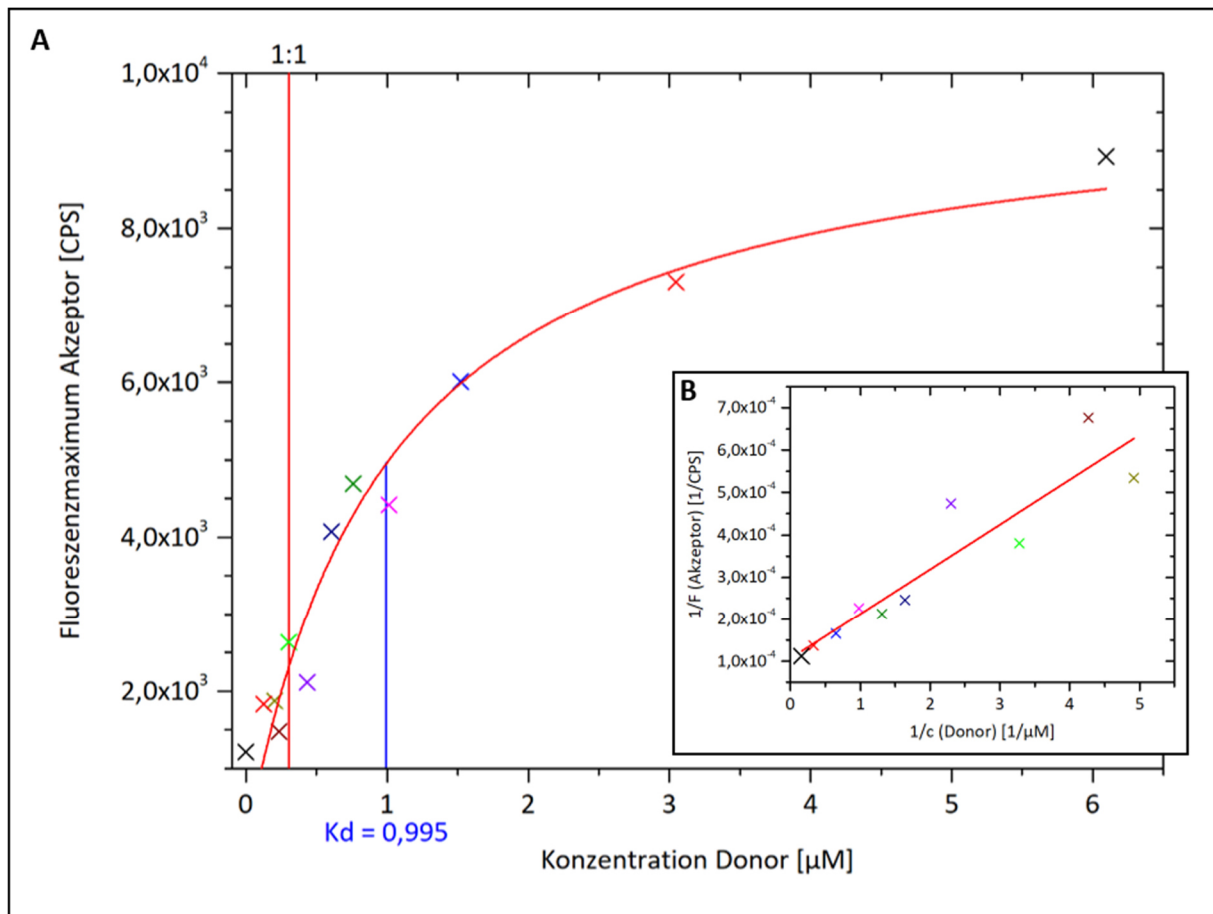


Abbildung 36: Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_d und des stöchiometrischen Faktors n in DOPC-Proteoliposomen über das Fluoreszenzmaximum des Akzeptors (669 nm). (A) Die Fluoreszenzmaxima des Akzeptors (SecY ATTO647N) wurden gegen die Konzentration des Donors (YidC ATTO520) aufgetragen. Die rote Markierung bei einer Donor-Konzentration von $0,31 \mu\text{M}$ zeigt die Konzentration an, bei der Akzeptor und Donor, also SecY und YidC, in einem Verhältnis von 1:1 vorliegen. Die rote Kurve stellt die nichtlineare Anpassung dar. Zur Berechnung der Dissoziationskonstanten K_d ($994,5$ nM, blau markiert in A) wurde eine Lineweaver-Burk Linearisierung (B) der Daten durchgeführt und eine Regressionsgerade (rote Gerade) angepasst. Um den stöchiometrischen Faktor n ($1,0537$) zu ermitteln, wurde ein nichtlinearer Fit (A) durchgeführt.

3.2.6 SecY und YidC interagieren lateral in Proteoliposomen

Da in den vorangegangenen Versuchen eine Stöchiometrie von eins bestimmt wurde, wurden für die folgenden Versuche SecY ATTO647N und YidC ATTO520 in äquimolaren Mengen (jeweils 0,1 nmol) mit DOPC-Liposomen rekonstituiert. Das molare Protein zu Lipid-Verhältnis lag bei ca. 1:1000. Außerdem wurden die beiden Proteine jeweils einzeln in den gleichen Mengen rekonstituiert. Das fehlende Volumen des jeweils anderen Proteins wurde bei der Rekonstitution durch Puffer ersetzt. Die Proben wurden bei 516 nm angeregt und das Spektrum von 520-750 nm gemessen.

Um eine laterale Interaktion von SecY und YidC zu bestätigen, wurde die Fluoreszenz in Proteoliposomen, in denen SecY und YidC co-rekonstituiert vorlagen, mit einem Mix an Proteoliposomen, in denen SecY und YidC jeweils einzeln rekonstituiert wurden, verglichen. Gemessen wurden YidC ATTO520-Proteoliposomen, SecY ATTO647N-Proteoliposomen und YidC ATTO520/SecY ATTO647N-Proteoliposomen. Die Spektren der Messungen der Einzel-Protein-Liposomen wurden addiert. Das daraus resultierende Additions-Spektrum entspricht dem Spektrum, das bei der Messung von co-rekonstituiertem SecY und YidC entstehen würde, ohne dass die beiden Proteine miteinander interagieren, also kein FRET auftritt. Für die Auswertung wurde das YidC/SecY-Spektrum mit dem addierten Spektrum verglichen. Die Fluoreszenzmaxima des Donors wurden dafür auf das Fluoreszenzmaximum des Donors des Additions-Spektrums (=1) normiert. Die Akzeptor-Maxima wurden entsprechend auf das Akzeptor-Maximum der addierten Einzelmessungen normiert. Im Anschluss wurden Donor und Akzeptor des addierten Spektrums auf null gesetzt, also von allen Werten eins subtrahiert. Damit ergibt sich die Zu- oder Abnahme der Fluoreszenz, die durch den Energietransfer, also FRET, in den SecY/YidC-Proteoliposomen im Vergleich zu der addierten Messung, in der ein Energietransfer ausgeschlossen ist, entsteht. In Abbildung 37A (links: SecY/YidC) ist zu sehen, dass die Donor-Fluoreszenz (dunkelgrau) um 38 % abnimmt, also auf 62 % abfällt, die Akzeptor-Fluoreszenz (hellgrau) um 145 % zunimmt, sich also mehr als verdoppelt. Dies zeigt eine Interaktion von YidC mit SecY an, wenn die Proteine gemeinsam in Proteoliposomen rekonstituiert wurden.

Um zu überprüfen, ob die Interaktion tatsächlich nur stattfindet, wenn SecY und YidC gemeinsam in Proteoliposomen rekonstituiert wurden oder ob FRET auch dann stattfindet,

wenn SecY- und YidC-Proteoliposomen nebeneinander vorhanden sind, ist folgende Kontrolle durchgeführt worden: Es wurden SecY ATTO647N-Proteoliposomen mit YidC ATTO520-Proteoliposomen 1:1 gemischt und anschließend gemessen. Als Vergleich wurden die beiden Protein-Proteoliposomen wie oben einzeln gemessen. In diesem Fall wurden die Einzel-Proteoliposomen 1:1 mit Puffer verdünnt, um das gleiche Volumen wie bei der gemischten Probe zu erhalten. In allen drei Messungen (SecY, YidC und SecY+YidC) war damit die Proteinkonzentration gleich. Auch hier wurden die Spektren der Einzelmessungen als Nullwert addiert und die Werte wie oben beschrieben normiert. In diesem Fall nimmt die Donor-Fluoreszenz nicht ab, die Akzeptor-Fluoreszenz nimmt nicht zu (Abbildung 37A, rechts: SecY+YidC). Es kommt also zu keinem Energietransfer. FRET kann also nur dann gemessen werden, wenn YidC ATTO520 und SecY ATTO647N co-rekonstituiert werden. Werden YidC ATTO520-Proteoliposomen mit SecY ATTO647N-Proteoliposomen gemischt, wird kein FRET beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass die beiden Proteine nur lateral miteinander interagieren.

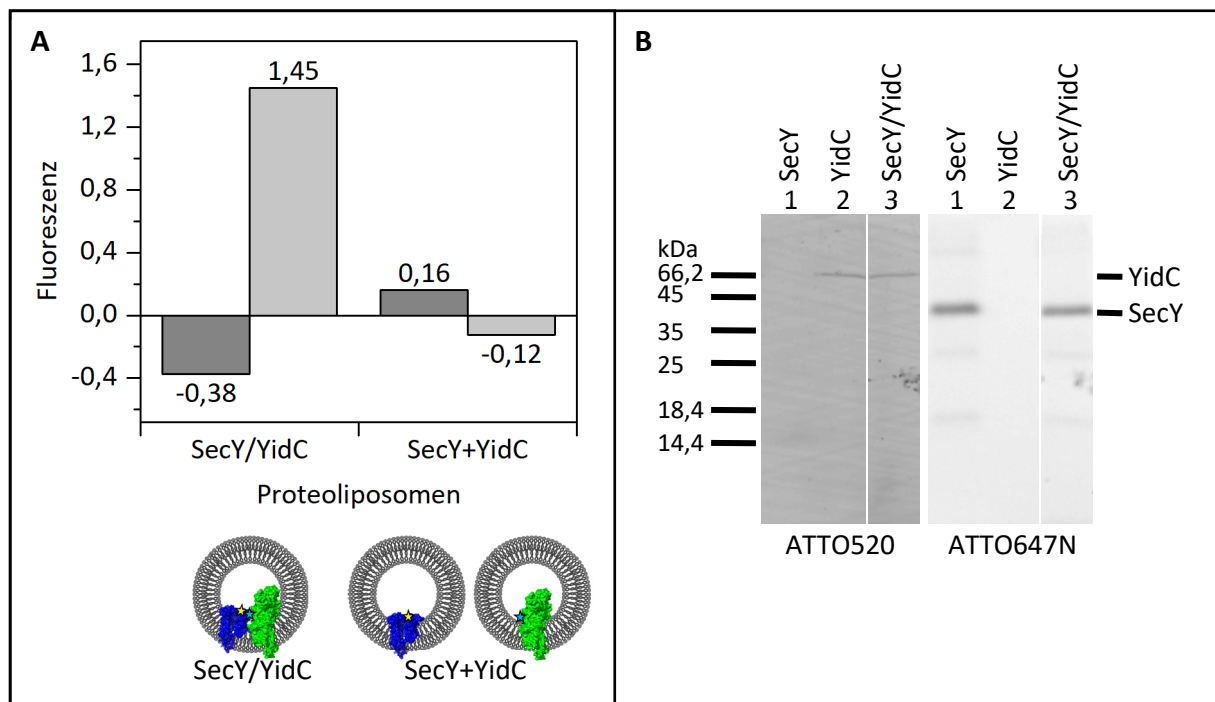


Abbildung 37: SecY und YidC interagieren lateral, wenn sie in Proteoliposomen co-rekonstituiert werden. (A) SecY und YidC wurden 1:1 co-rekonstituiert (SecY/YidC) oder einzeln rekonstituierte Proteoliposomen 1:1 gemischt (SecY+YidC). Gemessen wurden außerdem die einzeln rekonstituierten Proteine, die als Nullwert addiert wurden. Normiert wurden die Maxima von Donor (dunkelgrau) bzw. Akzeptor (hellgrau) auf die jeweilige Additionsmessung. Die Additionsmessung wurde anschließend auf null gesetzt. Damit ergibt sich eine Abnahme der Donor-Fluoreszenz um 38 % und eine Zunahme der Akzeptor-Fluoreszenz um 145 % bei den co-rekonstituierten Proteinen. Befinden sich SecY und YidC nicht in denselben Proteoliposomen, kommt es zu keinem Energietransfer. (B) In den verglichenen Proteoliposomen sind gleiche Mengen an SecY ATTO647N bzw. YidC ATTO520 vorhanden.

Im Anschluss an die Messungen wurden die Proben mit TCA gefällt, auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Fluoreszenz detektiert (Typhoon TRIO+, Anregungslaser: Blue (488 nm), Emissionsfilter: 526 SOP Fluorescein Cy2 AlexaFluor488 bzw. Anregungslaser: Red (633 nm), Emissionsfilter: 670 BP 30 Cy). Es ist in allen Proben die gleiche Menge SecY ATTO647N bzw. YidC ATTO520 vorhanden (Abbildung 37B).

Zu den co-rekonstituierten SecY/YidC-Proteoliposomen wurden außerdem verschiedene Detergenzien dazu gegeben, um die Stabilität der Interaktion zu testen. Dazu wurden vier Ansätze der Proteoliposomen gemessen: Es wurde 1 % SDS (\cong 5xCMC), 1 % DDM (\cong 100xCMC) bzw. 1 % DM (\cong 10xCMC) (Sigma-Aldrich) oder als Kontrolle das entsprechende Volumen Wasser zu den Proteoliposomen gegeben. Um sicherzustellen, dass in allen vier Ansätzen die gleiche Menge Protein enthalten ist, wurden alle Ansätze gemeinsam rekonstituiert und erst vor der Detergens-Zugabe geviertelt. Die Fluoreszenz wurde wie oben beschrieben gemessen und die Größe der Proteoliposomen über die Dynamische Lichtstreuung (2.14) gemessen.

Die Fluoreszenzmaxima des Donors bzw. Akzeptors wurden auf das Donor- bzw. Akzeptor-Maximum der Kontrollmessung mit Wasser normiert (=1). Anschließend wurde die Kontrollmessung als Nullwert von allen anderen Werten abgezogen, also von allen Werten eins subtrahiert. So ergibt sich die Zu- oder Abnahme der Fluoreszenz nach Zugabe von Detergens im Vergleich zu Wasser als Kontrolle.

Durch die Zugabe von SDS als stark denaturierendes Detergens werden die Proteoliposomen aufgelöst und die Proteine denaturiert. Dadurch wird die Interaktion gelöst und es kann kein Energietransfer mehr stattfinden, wodurch das Donor-Signal um 113 % ansteigt, also mehr als verdoppelt wird, und das Akzeptor-Signal um 68 % abfällt (Abbildung 38A, Donor dunkelgrau, Akzeptor hellgrau).

Durch die Zugabe von DDM und DM als nicht denaturierende Detergenzien werden zwar die Proteoliposomen solubilisiert, so wie auch die Membranen bei der Protein-Reinigung solubilisiert werden, die Proteine bleiben aber nativ. Dadurch bleiben auch die Interaktionen im Vergleich zu SDS deutlich stärker erhalten. Die Donor-Fluoreszenz steigt nur um 52 % bzw. 59 %, das Akzeptor-Signal sinkt nur um 7 % bzw. 13 % (Abbildung 38A). Dies zeigt, dass die Interaktion auch nach der Solubilisierung der Proteoliposomen teilweise stabil bleibt.

Die DLS-Messung (Tabelle 17) zeigt, dass durch Zugabe von SDS die Proteoliposomen kleiner werden, durch Zugabe von DM und DDM steigt die Partikelgröße. In allen Fällen steigt die Polydispersität an. Dies zeigt, dass die Detergenzien einen Effekt auf die Proteoliposomen haben.

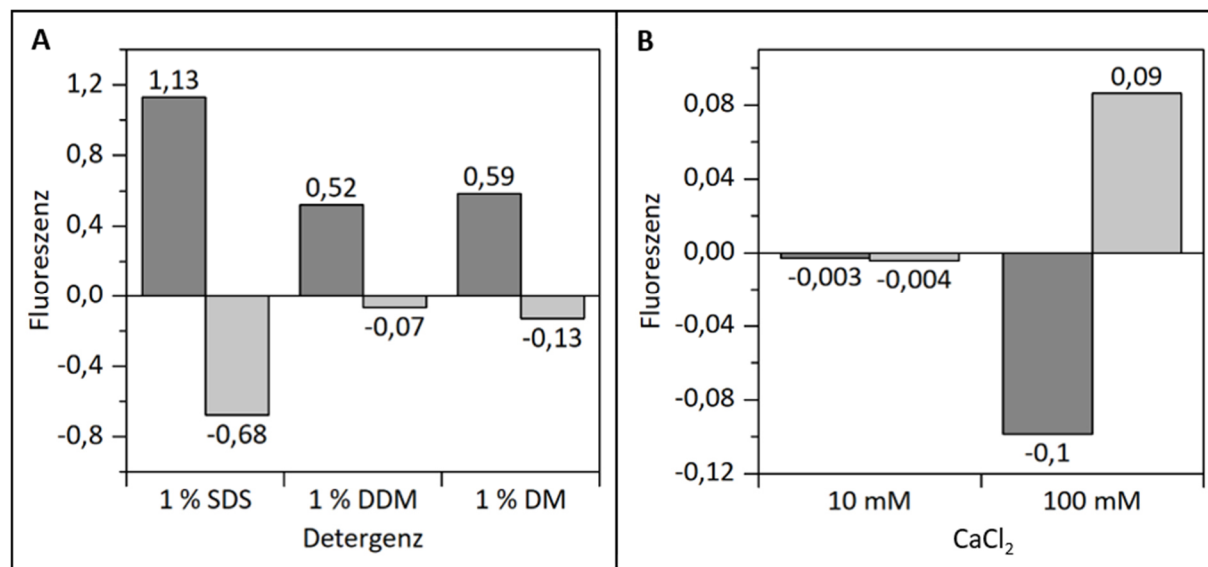


Abbildung 38: Detergens-Solubilisierung und Calcium-Fusion der Proteoliposomen nehmen Einfluss auf die Interaktion von SecY und YidC. (A) Zur Untersuchung der Auswirkung von Detergenzien auf den FRET-Effekt wurden 1 % SDS, 1 % DDM oder 1 % DM zu SecY/YidC-Proteoliposomen zugegeben. Normiert (=1) und genullt wurde auf die Fluoreszenzmaxima der Kontrollmessung (Wasser statt Detergens), um die Zunahme der Donor-Fluoreszenz (dunkelgrau) bzw. die Abnahme der Akzeptor-Fluoreszenz (hellgrau) durch den Einsatz der Detergenzien im Vergleich zu Wasser zu erhalten. Nach Auflösen der Proteoliposomen und Denaturierung der Proteine mit SDS geht die Interaktion von SecY und YidC verloren. Durch die Solubilisierung mit DDM und DM ist der Effekt deutlich schwächer. (B) SecY-Proteoliposomen wurden 1:1 mit YidC-Proteoliposomen gemischt und die Auswirkung von 10 mM und 100 mM CaCl₂ untersucht. Normiert und genullt wurde wie in (A) beschrieben. Nach der Zugabe von 100 mM CaCl₂ kommt es zur Fusion der Proteoliposomen, wodurch auch SecY/YidC-Proteoliposomen entstehen, und damit zu einer Abnahme der Donor-Fluoreszenz (dunkelgrau) sowie einer Zunahme der Akzeptor-Fluoreszenz (hellgrau).

Zu den einzeln rekonstituierten Proteoliposomen, die 1:1 gemischt wurden, wurde Calcium zugegeben, um die Proteoliposomen zu fusionieren. Es wurden 10 mM bzw. 100 mM Calciumchlorid (CaCl₂) oder das gleiche Volumen Wasser als Kontrolle zu den Ansätzen hinzugefügt. Um sicherzugehen, dass in beiden Ansätzen die gleichen Mengen an Protein enthalten sind, wurden die Ansätze erst nach dem Mischen der einzelnen Proteoliposomen aufgeteilt. Die Fluoreszenz wurde wie oben beschrieben gemessen und die Größe der Proteoliposomen über die Dynamische Lichtstreuung (2.14) gemessen.

Die Werte wurden wie bei der Messung mit Detergens normiert und ausgewertet. So ergibt sich auch in diesem Fall die Zu- oder Abnahme der Fluoreszenz nach der CaCl₂-Zugabe. In Abbildung 38B ist zu sehen, dass durch Zugabe von 10 mM CaCl₂ keine signifikante Änderung der Fluoreszenz messbar ist (0,3 % bzw. 0,4 %). Nach Zugabe von 100 mM CaCl₂ sinkt das Donor-Signal (dunkelgrau) um 10 %, die Akzeptor-Fluoreszenz (hellgrau) erhöht sich um 9 %. Der Durchmesser der Proteoliposomen steigt laut der DLS-Messung (Tabelle 17) um 10 % an. Dies zeigt, dass die Proteoliposomen teilweise fusioniert sind. Nach der Fusion kommt es zur Interaktion von SecY und YidC, die jetzt in denselben Proteoliposomen gemeinsam vorliegen, und es kann ein Energietransfer stattfinden, was den Anstieg des Akzeptor-Signals und die Abnahme des Donor-Signals erklärt. Dies zeigt, dass die in den SecY/YidC-Proteoliposomen gemessene Interaktion nicht nur auf eine Interaktion vor der Rekonstitution zurückzuführen ist oder durch die Rekonstitution erzwungen wurde, sondern in den Proteoliposomen stattfindet.

Tabelle 17: Auswirkungen der Detergens- bzw. Calcium-Zugabe auf die Proteoliposomengröße.

DLS-Messdaten		Durchmesser [nm]	Polydispersität [%]
Detergens	H ₂ O	539,24	38,88
	SDS	422,84	48,02
	DDM	1558,02	79,55
	DM	1403,27	50,70
CaCl ₂	H ₂ O	926,40	94,86
	CaCl ₂	1018,47	95,02

3.3 Die Mutante YidC 5S: Gestörte Interaktion zu SecY

Es wurde eine YidC 5S Mutante, die fünf Serin-Substitutionen in den Substrat-Kontaktstellen (Klenner & Kuhn, 2012) der Transmembrandomänen 3-5 (TM3: M430S, A435S; TM4: P468S; TM5: F505S, F509S; Abbildung 39) aufweist, bezüglich ihrer Fähigkeit zur Komplementation, Insertion und Interaktion mit SecY untersucht.

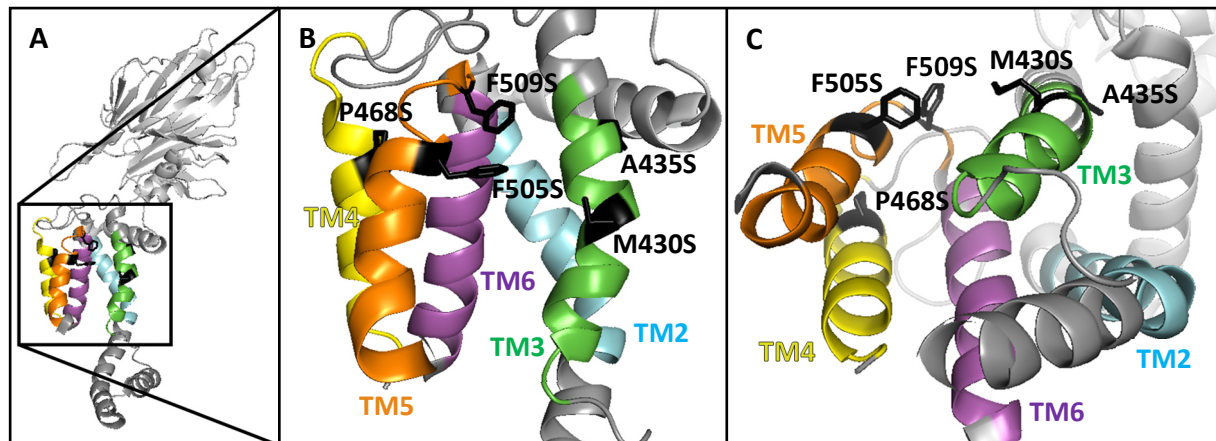


Abbildung 39: Die YidC 5S Mutante hat fünf Serin-Substitutionen in den Transmembrandomänen 3-5. (A) Dargestellt ist die *E. coli* YidC-Struktur (PDB 3WVF, Kumazaki *et al.*, 2014b) ohne die Transmembrandomäne 1. Die Transmembrandomänen 2-6 sind bunt angefärbt, der peri- und cytoplasmatische Bereich ist grau dargestellt. (B) Vergrößerung des transmembranen Bereichs der YidC-Struktur. Blau: TM2. Grün: TM3. Gelb: TM4. Orange: TM5. Violett: TM6. Die Positionen der Serin-Substitutionen sind schwarz dargestellt. (C) Cytosolische Ansicht auf die YidC-Struktur. Die peri- und cytoplasmatischen Bereiche sind teilweise ausgeblendet.

3.3.1 YidC 5S Mutante komplementiert die YidC-Funktion nicht, inseriert aber ein SecY-unabhängiges Substrat

Die YidC 5S Mutante wurde auf Komplementation der YidC-Funktion *in vivo* (2.6.1) untersucht, wenn das endogene YidC depletiert wird. Hierfür wurde der Stamm *E. coli* MK6S (2.2.6) verwendet, in dem der *yidC* Promotor gegen den *araC-araBAD* Promoter ausgetauscht worden war. Chromosomal codiertes YidC wird in Anwesenheit von Arabinose exprimiert und unter Glukose-Bedingungen depletiert. Unter repressiven Bedingungen (+ Glc) können die Zellen nur durch die Expression eines funktionellen Plasmid-codierten YidC wieder wachsen. Die *E. coli* MK6S-Zellen wurden mit Vektoren, die den YidC WT als Positiv-Kontrolle (pYidC) oder die YidC 5S Mutante (pYidC23C/5S) tragen, oder mit einem Plasmid ohne Insert als Negativ-Kontrolle (leer) transformiert und der Komplementationstest durchgeführt. Das

Ergebnis zeigt, dass in Anwesenheit von 0,2 % Arabinose (Abbildung 40A) alle Proben Kolonien bilden. Auf den Platten, die keine Arabinose, dafür aber 0,2 % Glukose enthalten, ist nur in Anwesenheit des Plasmids, das für den YidC WT codiert, die Bildung von Kolonien zu beobachten (Abbildung 40B). Die Zellen, die das Plasmid tragen, das für die YidC 5S Mutante codiert, wachsen unter Depletionsbedingungen nicht. Somit komplementiert die YidC 5S Mutante die YidC-Funktion nicht.

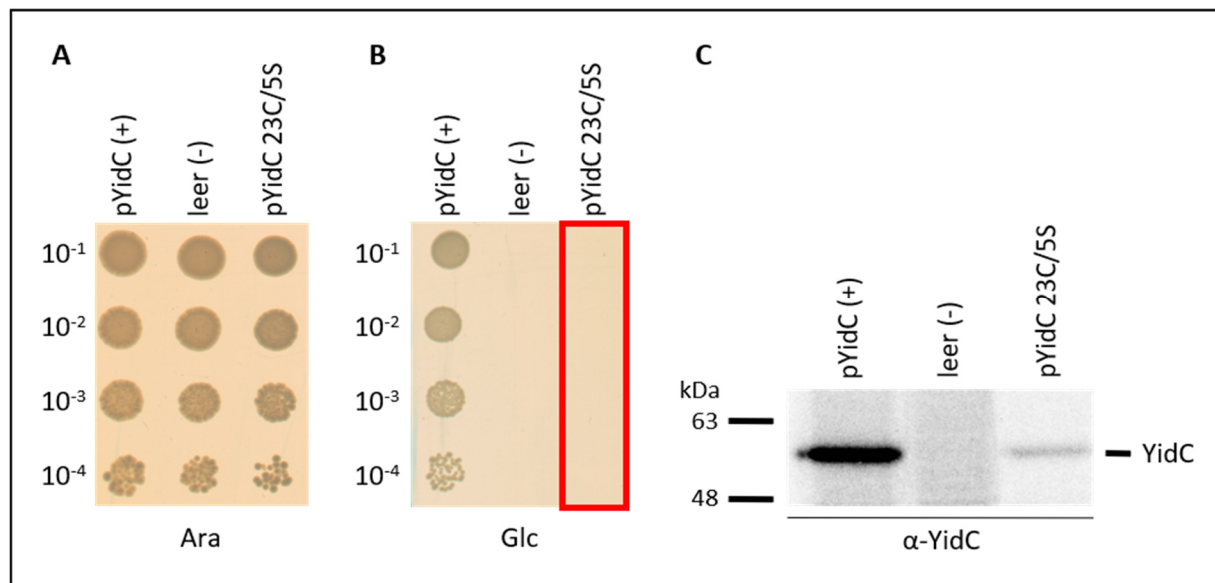


Abbildung 40: Die YidC 5S Mutante komplementiert nicht *in vivo*. Der *E. coli* MK6S Stamm mit chromosomalem YidC unter Kontrolle des *araBAD* Promotors wurde mit Plasmiden, die den YidC-Wildtyp (Positiv-Kontrolle), die YidC 5S Mutante oder kein Insert als Negativ-Kontrolle tragen, transformiert. (A, B) Nach Erreichen einer OD₆₀₀ = 1,0 wurde eine Verdünnungsreihe angelegt, diese auf Agar-Platten aufgetragen und die Bakterien über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. Auf LB-Agar-Platten mit 200 µg/mL Ampicillin, 0,01 mM IPTG und (A) 0,2 % Arabinose oder (B) 0,2 % Glukose wachsen unter Depletionsbedingungen (B) nur die Bakterien, die mit dem Plasmid, das für den YidC Wildtyp codiert, transformiert wurden. Die YidC 5S Mutante wächst unter repressiven Bedingungen (B) nicht und ist somit nicht funktionell. (C) In Anwesenheit von Glukose wurden die Zellen mit 1 mM IPTG induziert, radioaktiv markiert (³⁵S-Met) und in einer Immunpräzipitation mithilfe eines YidC-Antikörpers nachgewiesen. Das wildtypische YidC und die YidC 5S Mutante werden exprimiert. In der Kontrolle ohne Insert ist YidC vollständig depletiert.

Zum Nachweis der Expression der YidC 5S Mutante wurden die Zellen in Flüssigminimalmedium mit IPTG induziert, radioaktiv markiert (³⁵S-Met) und mithilfe eines YidC-Antikörpers, der an die C-terminale Domäne von YidC bindet, immunpräzipitiert. In der Kontrolle ohne Insert ist YidC vollständig depletiert. Das wildtypische YidC wird stärker exprimiert als die 5S Mutante (Abbildung 40C).

Interessant sind die Ergebnisse der Translokationsassays im Zusammenhang mit der YidC 5S Mutante in der Dissertation von Dirk Spann (Spann, 2017). Hier wurde die Mutante auf die Fähigkeit zur Substratinsertion mit dem Phagenprotein M13 *procoat* getestet. Nur wenn M13

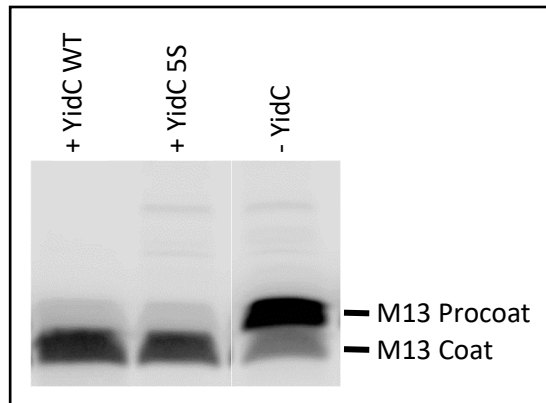


Abbildung 41: Die YidC 5S Mutante inhibiert die Substratinsertion von M13 *procoat* nicht (Spann, 2017). Das M13 *procoat*-Protein wird nur dann von der Leader-Peptidase prozessiert, wenn es von YidC korrekt in die Membran eingebaut wird. Dies kann durch das reduzierte Molekulargewicht des Proteins auf einem SDS-Gel visualisiert werden. Wird es nicht eingebaut, schneidet die Leader-Peptidase nicht, was in Abwesenheit von YidC (Spur 3) der Fall ist. In Anwesenheit des wildtypischen YidC (Spur 1) und der YidC 5S Mutante (Spur 2) wird das M13 *procoat*-Protein von der Leader-Peptidase prozessiert, also von YidC inseriert. Der Insertionsversuch wurde von Dirk Spann durchgeführt.

procoat korrekt von YidC in die Membran inseriert wird, prozessiert die Leader-Peptidase das *procoat*-Protein zum murenen Hüll-Protein (*coat*). Dies kann durch das reduzierte Molekulargewicht des Proteins auf einem SDS-Gel sichtbar gemacht werden. Dirk Spann konnte zeigen, dass die Insertion von M13 *procoat* durch die YidC 5S Mutante nicht inhibiert wird (Abbildung 41).

Die YidC 5S Mutante kann das Substrat M13 *procoat* in die Membran ebenso gut inserieren wie der Wildtyp, komplementiert die YidC-Funktion aber nicht soweit, dass die Zellen unter Depletionsbedingungen wachsen können. Da die Insertion des M13 *procoat*-Proteins nur YidC-, nicht aber SecY-abhängig ist ('*YidC-only*-Insertionspfad' (Samuelson *et al.*, 2001; Wolfe

et al., 1985)), weist dies darauf hin, dass die fünf Serin-Substitutionen die Insertion von zumindest einigen Substraten, die über den '*YidC-only*-Insertionspfad' eingebaut werden, weiter zulassen. Eventuell beeinträchtigen die Substitutionen die gemeinsame Insertion von Membranproteinen mit SecY. Die Unfähigkeit der YidC 5S Mutante, die YidC-Funktion zu komplementieren, könnte mit einer gestörten essentiellen Interaktion der Mutante mit anderen Teilen des Insertionsapparats zusammenhängen. In den folgenden Versuchen wurde die Interaktion der YidC 5S Mutante mit SecY im Vergleich zum YidC WT über FRET-Messungen untersucht.

3.3.2 Die Mutante YidC 5S zeigt eine geringere Affinität zu SecY als der YidC WT

Die Mutante YidC23C 5S wurde wie auch schon die wildtypische Variante¹ gereinigt und mit ATTO520 für die Fluoreszenz-Messungen in Detergens und Proteoliposomen markiert.

Der FRET-Effekt in äquimolaren SecY/YidC Proteoliposomen: YidC 5S vs. YidC WT

Um zu testen, ob die Mutante YidC 5S in ihrer Interaktion mit SecY gestört ist, wurden FRET-Messungen in DOPC-Proteoliposomen mit der Mutante im Vergleich zum Wildtyp durchgeführt. Wie in 3.2.6 wurden YidC und SecY in äquimolarem Verhältnis (jeweils 0,1 nmol) mit DOPC-Liposomen rekonstituiert (Protein zu Lipid-Verhältnis ca. 1:1000). Außerdem wurden die beiden Proteine jeweils einzeln in den gleichen Mengen rekonstituiert. Das fehlende Volumen des jeweils anderen Proteins wurde bei der Rekonstitution durch Puffer ersetzt. Die Proben wurden bei 516 nm angeregt und das Spektrum von 520-750 nm gemessen (Fluorolog®). Die Normierung und Auswertung wurden wie in 3.2.6 beschrieben durchgeführt. Damit ergibt sich auch hier die Zu- oder Abnahme der Fluoreszenz, die durch den Energietransfer, also FRET, in den SecY/YidC-Proteoliposomen im Vergleich zu der addierten Messung, in der ein Energietransfer ausgeschlossen ist, entsteht.

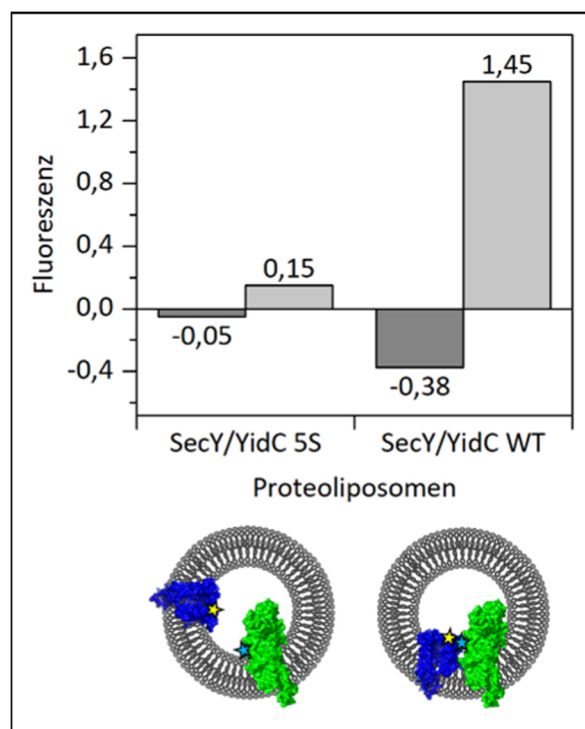


Abbildung 42: Die Mutante YidC 5S zeigt in Proteoliposomen mit äquimolarem Protein-Verhältnis eine deutlich geringere Affinität zu SecY als der YidC WT. SecY und YidC wurden 1:1 co-rekonstituiert (SecY/YidC). Gemessen wurden außerdem die einzeln rekonstituierten Proteine, die als Nullwert addiert wurden. Normiert wurden die Maxima von Donor (dunkelgrau) bzw. Akzeptor (hellgrau) auf die jeweilige Additionsmessung. Die Additionsmessung wurde anschließend auf null gesetzt. Damit ergibt sich für die Mutante YidC 5S eine Abnahme der Donor-Fluoreszenz um nur 5 % und eine Zunahme der Akzeptor-Fluoreszenz um nur 15 %. Im Vergleich zum YidC WT ist damit ein deutlich geringerer FRET-Effekt messbar.

¹ Wird im Folgenden von YidC Wildtyp gesprochen, ist die Einzylcystein-Mutante 23C zur Fluoreszenzmarkierung von YidC gemeint. Die Bezeichnung soll hier die Unterscheidung zur Mutante YidC 5S verdeutlichen.

Es ergibt sich für die YidC 5S Mutante eine Abnahme der Donor-Fluoreszenz um nur 5 % und eine Zunahme der Akzeptor-Fluoreszenz um nur 15 % (Abbildung 42). Im Vergleich zum YidC WT (-38 % bzw. +145 %) ist damit ein deutlich geringerer FRET-Effekt messbar. Dies deutet auf eine schwächere Affinität zwischen SecY und der Mutante YidC 5S im Vergleich zum Wildtyp hin.

Außerdem zeigt dies als Negativ-Kontrolle, dass ohne eine Interaktion der Proteine keine Energie transferiert wird und im Umkehrschluss ein gemessener FRET-Effekt tatsächlich auf eine Interaktion zurückzuführen ist.

Titration in Detergens und Proteoliposomen: YidC 5S interagiert schwächer mit SecY als der Wildtyp

Wie schon mit dem wildtypischen YidC wurde auch mit YidC 5S eine Titration zur Einschätzung der Bindungsaffinität der SecY/YidC-Interaktion in Detergens (DDM) durchgeführt. Als Donor wurde ATTO520-markiertes YidC 5S vorgelegt. ATTO647N-markiertes SecY wurde als Akzeptor dazu titriert. Gestartet wurde die Titration mit einem Überschuss an YidC (YidC:SecY = 15,8:1). Es wurde titriert, bis doppelt so viel SecY wie YidC im Probenvolumen anwesend war (YidC:SecY = 1:1,9). Der Donor-Farbstoff wurde mit einer Wellenlänge von 516 nm angeregt. Für jeden Titrationsschritt wurde das Spektrum der Fluoreszenz von 520-750 nm aufgenommen (Fluorolog®), um die maximale Donor-Fluoreszenz bei 538 nm und die maximale Akzeptor-Fluoreszenz bei 669 nm zu detektieren. Wie schon zuvor beim Wildtyp wurden auch hier die entsprechenden Puffer-Kontrollen mitgeführt und damit die Messwerte wie in 2.15.2 beschrieben um den Verdünnungs- bzw. Konzentrationseffekt rechnerisch korrigiert. Die Akzeptor-Maxima wurden auf den Startwert normiert und gegen das Akzeptor-zu-Donor-Verhältnis aufgetragen. Ebenso wurden die Akzeptor-Maxima aus der Messung mit dem YidC WT (3.2.3) zum Vergleich normiert und aufgetragen (Abbildung 43A).

Während es beim Signal des YidC Wildtyps (Abbildung 43A, grüne Kreuze) schon früh zu einer Sättigung kommt, ergibt sich bei der Mutante (blaue Kästchen) keine hyperbolische Kurve im gemessenen Bereich. Das Akzeptor-Signal erhöht sich zwar mit steigender Akzeptor-Konzentration, es kommt aber zu keiner Sättigung. Dies deutet auf eine unspezifische Bindung hin. Diese unspezifische Bindung würde es dann zusätzlich zur spezifischen Bindung auch beim Wildtyp geben. Da der YidC WT mit SecY aber mit so starker Affinität interagiert, spielt die

schwächere unspezifische Bindung dort vermutlich keine Rolle. Oder aber eine Sättigung wird bei der Mutante erst viel später als beim Wildtyp außerhalb des Messbereichs erreicht. Daraus würde sich ein höherer K_d -Wert im Vergleich zum Wildtypen und damit eine viel schwächere spezifische Bindung zwischen SecY und der Mutante ergeben.

Das Signal bei der Mutante steigt insgesamt höher als beim Wildtyp. Dies kann auf unterschiedliche *Labeling*-Effizienzen in den beiden Versuchen zurückgeführt werden. Die absolute Höhe des Signals ist damit nicht aussagekräftig und zwischen verschiedenen Versuchen nicht direkt vergleichbar, der Verlauf, der für die oben getroffene Aussage wichtig ist, dagegen schon.

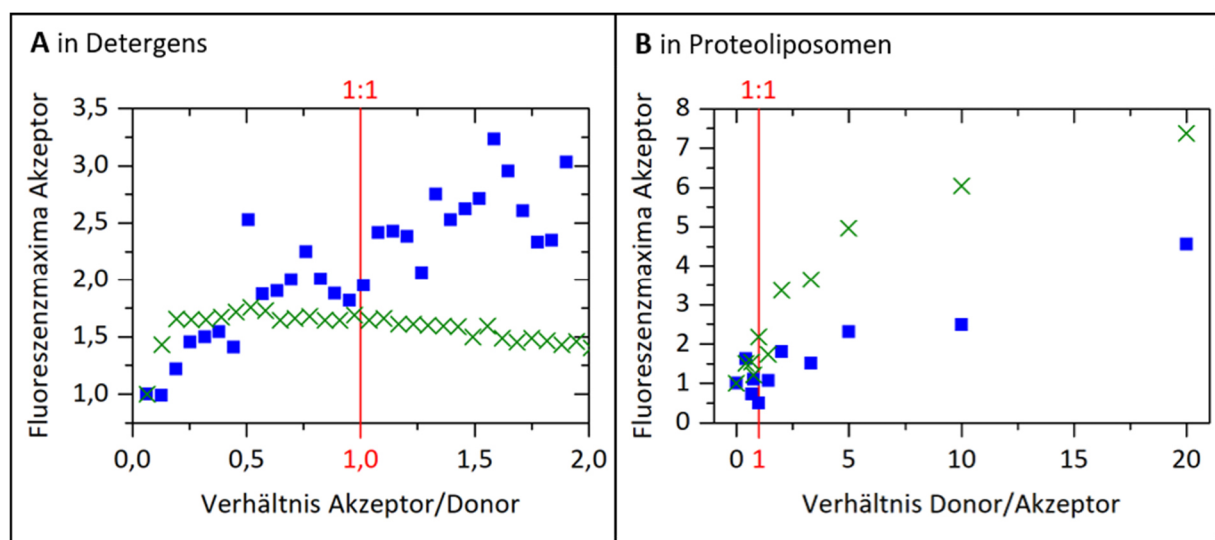


Abbildung 43: Die Mutante YidC 5S (■) zeigt eine geringere Affinität zu SecY als der YidC WT (x). (A) Die Mutante YidC 5S wurde mit SecY titriert. Die Fluoreszenzmaxima des Akzeptors wurden auf den Startwert normiert und gegen das Akzeptor-zu-Donor-Verhältnis aufgetragen. Die rote Markierung zeigt das äquimolare Verhältnis von SecY und YidC an. Zum Vergleich wurde die Titrationskurve des YidC Wildtyps ebenfalls aufgetragen. Im Gegensatz zur frühen Sättigung und damit hohen Affinität zu SecY, die sich beim Wildtyp ergibt, kommt es bei der Mutante im gemessenen Bereich zu keiner Sättigung. Es kann auf eine deutlich schwächere Bindungsaffinität zwischen der Mutante und SecY geschlossen werden. (B) Die Fluoreszenzmessungen in DOPC-Proteoliposomen mit verschiedenen SecY/YidC-Verhältnissen bestätigen das Ergebnis der Titration.

Neben der Titration in DDM wurden auch mit der Mutante YidC 5S Messungen in DOPC-Proteoliposomen mit verschiedenen SecY/YidC-Verhältnissen durchgeführt. Die eingesetzten Mengen und Verhältnisse sowie der Versuchsablauf entsprechen genau dem Versuch mit dem wildtypischen YidC (3.2.5). Die Akzeptor-Maxima wurden auf den Startwert normiert und gegen das Donor-zu-Akzeptor-Verhältnis aufgetragen. Ebenso wurden die Akzeptor-Maxima

aus der Messung mit dem YidC WT (3.2.5) zum Vergleich normiert und aufgetragen (Abbildung 43B).

Wie auch schon bei der Titration ergibt sich bei der Mutante (Abbildung 43B, blaue Kästchen) im Gegensatz zum Wildtyp (grüne Kreuze) keine hyperbolische Kurve im gemessenen Bereich. Falls es bei höheren Konzentrationen noch zu einer Sättigung kommen sollte, wäre der K_d -Wert deutlich höher und damit die Affinität schwächer als beim Wildtyp.

Die Ergebnisse decken sich mit den Messungen in DOPC-Proteoliposomen oben, die ebenfalls eine deutlich abgeschwächte Affinität der Interaktion von SecY mit YidC 5S im Vergleich zum Wildtyp zeigen (Abbildung 42).

Die Mutante YidC 5S kompetiert schwächer um die Bindung an SecY als der YidC WT

Für einen weiteren Vergleich zwischen YidC 5S und dem Wildtypen bezüglich der Affinität wurde ein Konkurrenzexperiment durchgeführt. Hierfür wurden YidC (WT) ATTO520 und SecY ATTO647N in äquimolarem Verhältnis gemischt (je 0,042 nmol). Zu den markierten

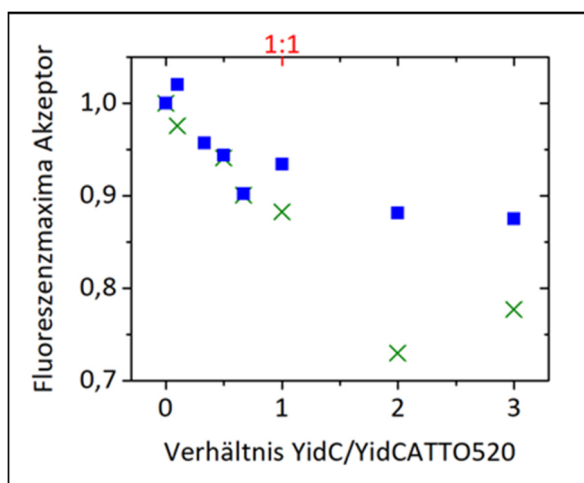


Abbildung 44: Der YidC WT (X) verdrängt YidCATTO520 stärker als YidC 5S (■). In einem Konkurrenztest wurden SecYATTO647N und YidC (WT) ATTO520 vorgelegt und nicht markiertes YidC dazu titriert, um die Verdrängung von YidC ATTO520 durch den YidC WT und YidC 5S zu vergleichen. Die gemessenen Werte wurden um den Verdünnungseffekt korrigiert und auf den Startwert normiert. Im dargestellten Bereich bis zu einem 3-fachen Überschuss an nicht markiertem YidC wird YidC ATTO520 vom Wildtypen stärker verdrängt als von der Mutante YidC 5S.

Proteinen in Detergens wurde dann nicht markiertes YidC, entweder der Wildtyp oder die Mutante 5S, dazu titriert und die Fluoreszenz-Spektren aufgenommen (Fluorolog®, Anregungswellenlänge: 516 nm, Spektrum: 520-750 nm). Das Verhältnis von nicht markiertem zu markiertem YidC stieg dabei von null bis zu einem 20-fachen Überschuss. Verdrängt nicht markiertes YidC das markierte, wird der FRET-Effekt kleiner, das Akzeptor-Signal sinkt. Da sich durch die Titration das Volumen erhöht und damit die Konzentration der markierten Proteine sinkt, sinkt das Akzeptor-Signal aber auch durch den Verdünnungseffekt. Darum wurde eine Pufferkontrolle mitgeführt, also Puffer anstatt von nicht markiertem YidC in den

gleichen Volumenschritten dazu titriert. Die Ergebnisse wurden wie in 2.15.2 beschrieben um den Verdünnungseffekt rechnerisch korrigiert. Die korrigierten Fluoreszenzmaxima des Akzeptors wurden auf den Startwert normiert (=1) und gegen das Verhältnis von nicht markiertem zu markiertem YidC aufgetragen (Abbildung 44).

Erst ab einem Verhältnis von 1, also bei äquimolaren Mengen von markiertem und nicht markiertem YidC, ist ein signifikanter Unterschied im Absinken des Akzeptor-Signals zwischen dem YidC WT und der Mutante zu sehen. Bei der Titration mit YidC WT fällt das Signal bei diesem Verhältnis auf 88,2 %, bei der Mutante nur auf 93,4 %. Im Verlauf der Titration sinkt das Akzeptor-Signal weiter ab. Der nicht markierte Wildtyp verdrängt markiertes YidC WT stärker als YidC 5S.

Auch dieses Ergebnis zeigt wie die vorherigen, dass die YidC-Mutante mit den fünf Serin-Substitutionen schwächer an SecY bindet als der YidC Wildtyp.

Die deutlich schwächere Bindungsaffinität der YidC 5S Mutante im Vergleich zum YidC WT lässt darauf schließen, dass die Positionen 430 und 435 in der Transmembrandomänen 3 sowie die Position 468 in der Transmembrandomäne 4 und Position 505 und 509 in der Transmembrandomäne 5 wichtig für die Interaktion mit SecY und damit für die Insertion von SecY- und YidC-abhängigen Substraten sind.

3.4 Das Fusionsprotein SecY-YidC

Für einige der Experimente wurden gereinigtes SecY und YidC mit Liposomen rekonstituiert. Dabei ist die Stöchiometrie sowie die Lage von SecY und YidC zueinander wichtig. Um sicherzugehen, dass SecY und YidC in der gleichen Stöchiometrie, der richtigen Orientierung zur Membranoberfläche und in unmittelbarer Nähe zueinander vorliegen, wurde ein Fusionsprotein der beiden Membranproteine konstruiert.

3.4.1 Klonierung des SecY-YidC-Fusionsproteins

Bei der Klonierung des Fusionsproteins wurden die Gensequenzen *secY* und *yidC* über die Sequenz eines Linkers verbunden. Das Stop-Codon von *secY* sowie das Start-Codon von *yidC* wurden entfernt. Die Gensequenzen *secE* und *secG* liegen ebenfalls auf dem Plasmid

(Abbildung 45A). Es entsteht ein Fusionsprotein, in dem der N-Terminus von YidC über einen Linker mit dem C-Terminus von SecY verbunden ist. Der Linker enthält die Proteinerkennungssequenz der Precision Protease. N- und C-terminal besitzt das Fusionsprotein einen His₁₀-Tag (Abbildung 45B).

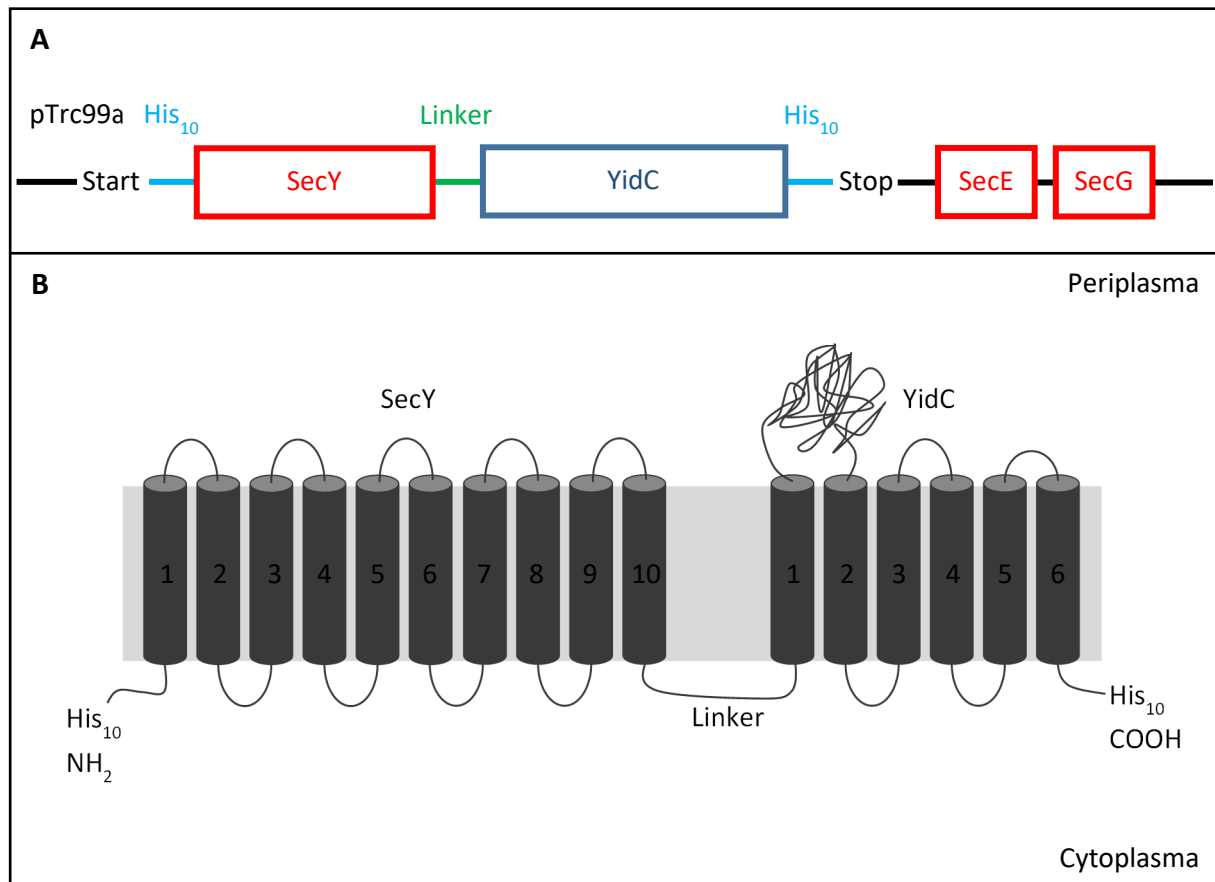


Abbildung 45: Schematische Darstellung des SecY-YidC-Fusionsproteins. (A) Die Gensequenzen *secY* und *yidC* wurden über die Sequenz eines *Linkers* fusioniert. Die Sequenzen *secE* und *secG* liegen ebenfalls auf dem Plasmid. (B) So entsteht ein Fusionsprotein, in dem der N-Terminus von YidC über einen *Linker* mit dem C-Terminus von SecY verbunden ist. Das Fusionsprotein besitzt N- und C-terminalen einen His₁₀-Tag.

3.4.2 Das Fusionsprotein komplementiert die SecY- und YidC-Funktion

Um die Funktionalität des Fusionsproteins zu überprüfen, wurden *in vivo* Komplementationstests durchgeführt (2.6).

Die YidC-Funktion wurde mithilfe des *E. coli* Depletionsstamms MK6S (2.2.6) getestet (Abbildung 46A). Das chromosomale *yidC*-Gen steht in diesem Stamm unter Kontrolle des *araBAD*-Promotors (Klenner *et al.*, 2008), womit dieser nur in Anwesenheit von Arabinose

wachsen kann. Unter Depletionsbedingungen, in Abwesenheit von Arabinose und Anwesenheit von Glukose, kann der Stamm nur wachsen, wenn ein Plasmid-codiertes funktionales YidC exprimiert wird. Als Positiv-Kontrolle wurde der Stamm mit einem Plasmid, welches das *yidC*-Wildtyp-Gen exprimiert, transformiert. Für die Negativ-Kontrolle wurde ein Plasmid ohne Insert sowie ein Plasmid mit den *secYEG*-Genen verwendet. Es wurden Verdünnungsreihen von Kulturen des Depletionsstamms, der die aufgeführten Plasmide trägt, angelegt. Die Zellen wurden auf Agarplatten mit 0,2 % Arabinose zur Expression von chromosomalen YidC beziehungsweise auf Agarplatten mit 0,4 % Glukose zur Repression des chromosomalen YidC aufgetragen (Abbildung 46).

Auf der Kontrollplatte mit 0,2 % Arabinose (Abbildung 46A, Ara) bilden sich durch die Expression des chromosomalen YidC sowohl bei der Positiv- als auch den Negativ-Kontrollen Kolonien. Ebenso wachsen die Zellen, die mit dem Fusionsprotein-Plasmid transformiert wurden. Unter Depletionsbedingungen (Abbildung 46A, Glc) wachsen die Negativ-Kontrollen (ohne Insert und pSecYEG) aufgrund des Ausbleibens einer YidC-Expression nicht. Das endogene YidC ist somit vollständig depletiert. Die Positiv-Kontrolle (pYidC) bildet Kolonien, da das Plasmid-codierte wildtypische YidC funktional ist. Die Zellen, die das Fusionsprotein SecY-YidC exprimieren (pSecYEG-YidC), wachsen ebenfalls. Dies zeigt, dass das YidC im Fusionsprotein die Funktion von YidC übernehmen kann. Das etwas schwächere Wachstum der Zellen mit dem Fusionsprotein im Vergleich zu denen mit dem wildtypischen YidC zeigt, dass das YidC des Fusionsproteins zwar grundsätzlich funktional ist, aber die Funktion weniger gut übernimmt als das einzeln exprimierte YidC.

Um die SecY-Funktionalität des Fusionsproteins zu testen, wurde der Temperatur-sensitive *E. coli* Stamm AF659 (2.2.7) eingesetzt, der durch eine Mutation im chromosomalen *secY*-Gen nur bei 37°C, nicht aber bei 20°C wächst (Baba *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 2005). Die Zellen wachsen bei nicht-permissiven Temperaturen erst wieder, wenn ein Plasmid-codiertes funktionales SecY exprimiert wird. Als Positiv-Kontrolle wurde der Stamm mit einem Plasmid, welches die *secYEG*-Wildtyp-Gene exprimiert, transformiert. Für die Negativ-Kontrolle wurde ein Plasmid ohne Insert sowie ein Plasmid mit dem *yidC*-Gen verwendet. Es wurden Verdünnungsreihen von Kulturen des Temperatur-sensitiven Stamms, der die aufgeführten Plasmide trägt, angelegt. Die Zellen wurden auf Agarplatten aufgetragen und bei 37°C zur Kontrolle beziehungsweise bei 20°C inkubiert.

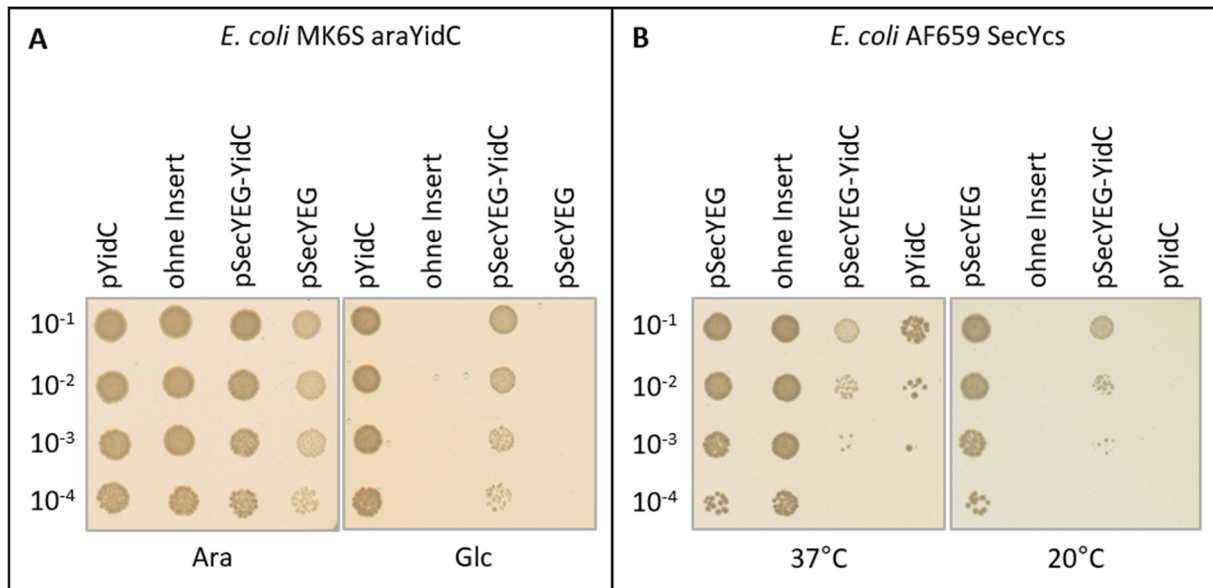


Abbildung 46: Das Fusionsprotein SecY-YidC komplementiert die SecY- und YidC-Funktion. (A) Der Depletionsstamm *E. coli* MK6S, bei dem das chromosomale *yidC*-Gen unter Kontrolle des *araBAD*-Promotors steht, wurde verwendet, um das Fusionskonstrukt auf seine YidC-Komplementation zu untersuchen. Es wurden Verdünnungsreihen von Kulturen des Depletionsstamms angelegt, der mit einem Plasmid transformiert wurde, das das wildtypische *yidC*-Gen, die *secYEG*-Gene, das Fusionskonstrukt oder kein Insert trägt. Die Zellen wurden auf Agarplatten mit 0,2 % Arabinose bzw. 0,4 % Glukose aufgetragen. Unter Depletionsbedingungen (Glc) wachsen nur die *E. coli* MK6S-Zellen, die wildtypisches YidC exprimieren (pYidC), sowie diejenigen, die das Fusionsprotein exprimieren (pSecYEG-YidC). Die Negativ-Kontrollen (ohne Insert und pSecYEG) zeigen kein Wachstum. (B) Der Stamm *E. coli* AF659, der eine kälte-sensitive Mutation im chromosomalen *secY*-Gen trägt, wurde verwendet, um das Fusionskonstrukt auf seine SecY-Komplementation zu testen. Es wurden Verdünnungsreihen von Kulturen des Temperatur-sensitiven Stamms angelegt, der mit einem Plasmid transformiert wurde, welches die *secYEG*-Gene, das wildtypische *yidC*-Gen, das Fusionskonstrukt oder kein Insert trägt. Die Zellen wurden auf Agarplatten aufgetragen und bei 37°C bzw. 20°C inkubiert. Bei 20°C wachsen die Negativ-Kontrollen (ohne Insert und pYidC) nicht. Nur die *E. coli* AF659-Zellen, die ein Plasmid mit wildtypischem *secYEG* oder dem Fusionskonstrukt tragen, bilden Kolonien.

Auf der Kontrollplatte, die bei 37°C inkubiert wurde (Abbildung 46B, 37°C), wachsen sowohl die Positiv- als auch die Negativ-Kontrollen, da das mutierte endogene SecY bei 37°C funktional ist. Auch die Zellen, die mit dem Fusionsprotein-Plasmid transformiert wurden, bilden Kolonien. Auf der Platte, die bei 20°C inkubiert wurde (Abbildung 46B, 20°C), wachsen die Negativ-Kontrollen (ohne Insert und pYidC) nicht, da kein Plasmid mit funktionalem SecY vorhanden ist, das die Funktion des mutierten endogenen SecY, komplementieren könnte. Durch die Expression des Plasmid-codierten funktionalen SecYEG wächst die Positiv-Kontrolle (pSecYEG) auch bei 20°C. Ebenso ist eine Koloniebildung der Zellen, die das Fusionsprotein SecY-YidC (pSecYEG-YidC) exprimieren, zu beobachten. Dies zeigt, dass auch das SecY des Fusionsproteins *in vivo* funktional ist. Auch in diesem Fall übernimmt das Fusionsprotein zwar

die Funktion von SecY, die Zellen wachsen aber sowohl bei 20°C als auch bei 37°C schlechter als die Zellen mit dem einzeln exprimierten SecY.

3.4.3 Expression und Reinigung des SecY-YidC-Fusionsproteins

Bevor das SecY-YidC-Fusionsprotein gereinigt werden konnte (2.8.3), musste ein Stamm gefunden werden, der das Protein in ausreichenden Mengen exprimiert. In den Expressionstests (50 mL-Maßstab) wurden Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Induktion (induziert nach Erreichen einer Optischen Dichte von ~ 0,5) gezogen und mit TCA

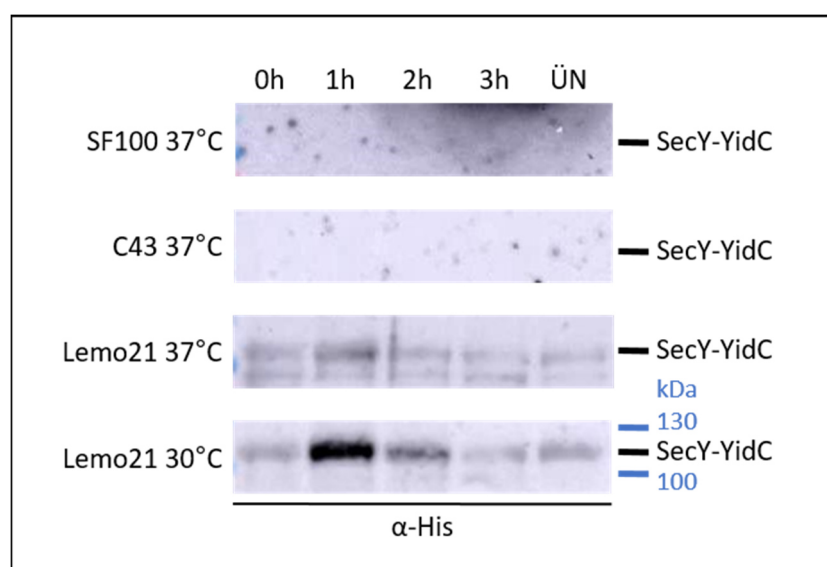


Abbildung 47: Der *E. coli* Stamm Lemo21 exprimiert das SecY-YidC-Fusionsprotein. Die *E. coli* Stämme wurden im 50 mL-Maßstab bis zu einer OD von ~ 0,5 angezogen und mit 0,5 mM IPTG induziert. Die auf die OD normierten Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und über Western-Blotting mit einem anti-His-Antikörper analysiert. Die *E. coli* Stämme SF100 und C43 exprimieren das Fusionsprotein nicht. Bei 37°C wird das Fusionsprotein von *E. coli* Lemo21 exprimiert, es ist aber eine Abbaubande zu finden. Durch Absenken der Expressionstemperatur vor der Induktion auf 30°C kann die Abbaubande vermieden werden.

gefällt. Nach der Normierung auf die jeweilige Optische Dichte wurden die Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen und das Fusionsprotein im Western Blot mittels eines anti-His-Antikörpers detektiert.

Die beiden *E. coli* Stämme SF100 und C43, in denen SecY bzw. YidC einzeln für die Reinigung exprimiert werden, exprimieren das Fusionsprotein nicht (Abbildung 47, Zeile 1 und 2). Deshalb wurde das

BL21-Derivat Lemo21(DE3) getestet. In diesem Fall wird das Fusionsprotein bei 37°C zwar exprimiert, es ist aber eine Abbaubande knapp unterhalb des Fusionsproteins zu sehen (Abbildung 47, Zeile 3). Aus diesem Grund wird die Expression bei 30°C durchgeführt, wodurch der Abbau vermieden werden kann. Die stärkste Expression zeigte sich nach einer Stunde, bei längeren Induktionszeiten nahm die Proteinkonzentration deutlich ab (Abbildung 47, Zeile 4). Das Fusionsprotein läuft im SDS-Gel (12 %) auf einer Höhe von etwa 110 kDa.

Das SecY-YidC-Fusionsprotein wurde nach der Expression und Membranpräparation mit 1,5 % DDM solubilisiert und über zwei aufeinander folgende IMACs isoliert. Da nach der ersten IMAC noch sehr viele Proteinverunreinigungen zu sehen sind (Abbildung 48A), wurden die Elutionsfraktionen vereint und nach Entfernen des Imidazols durch Dialyse erneut auf eine Ni-NTA-Säule geladen. Das Protein wurde in 7 x 1 mL-Fractionen eluiert. Von den Elutionsfraktionen sowie von Durchlauf und Waschfraktion wurden je 20 µL auf ein 12 %iges SDS-Gel aufgetragen und mit Coomassie gefärbt. Nach der zweiten IMAC sind neben dem Fusionsprotein nur noch zwei weitere Banden zu finden (Abbildung 48B). Wegen der geringen Ausbeute an Protein wurde auf eine anschließende Gelfiltration verzichtet, da dabei ein weiterer Verlust des Fusionsproteins zu erwarten wäre. Bei der späteren Rekonstitution mit Liposomen wurden diese Verunreinigungen aber nicht mit in die Proteoliposomen aufgenommen (Abbildung 50). Das Fusionsprotein wird hauptsächlich in den ersten 3-4 Fraktionen eluiert, nach dem Schockgefrieren bei -80°C gelagert und für spätere *in vitro* Analysen verwendet.

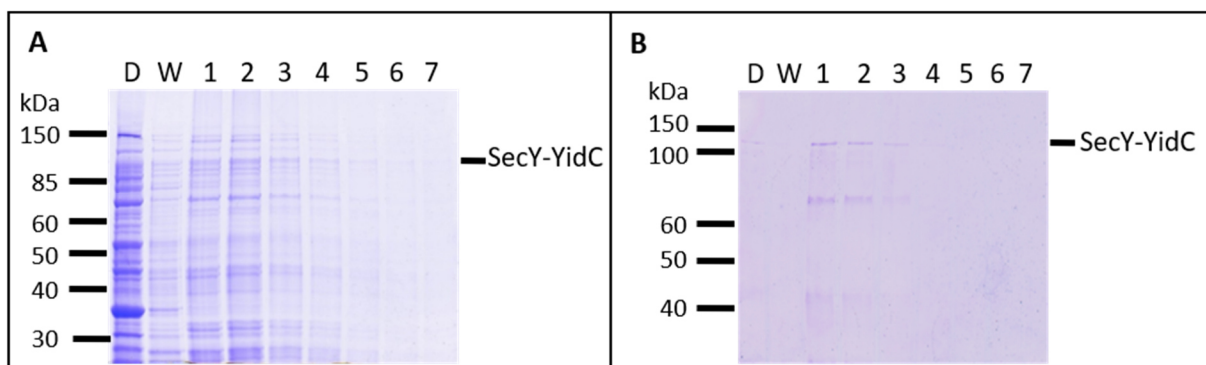


Abbildung 48: Reinigung des Fusionsproteins SecY-YidC. (A) Nach einer ersten IMAC wurden Proben (20 µL) des Durchlaufs D, der Waschfraktion W und der Elutionen 1-7 auf ein SDS-Gel geladen und mit Coomassie gefärbt. Es sind neben dem Fusionsprotein noch viele Proteinverunreinigungen in den Elutionsfraktionen zu finden. Die Fraktionen wurden vereint und auf eine zweite Ni-NTA-Säule geladen. (B) Nach der zweiten IMAC der vereinten Elutionen aus IMAC 1 sind nur noch zwei Banden neben dem Fusionsprotein zu sehen.

Um zu zeigen, dass es sich bei dem gereinigten Protein tatsächlich um das Fusionsprotein handelt und dass SecE und SecG wie bei der SecY-Reinigung mit exprimiert und co-gereinigt werden, wurden Proben auf ein SDS-Gel geladen und mittels Western Blot die Proteine detektiert. Neben dem gereinigten Fusionsprotein wurden gereinigtes SecY und YidC aufgetragen. Das Fusionsprotein kann über einen anti-His-Antikörper sowie Antikörper gegen SecY und YidC detektiert werden (Abbildung 49A, Spur 3, 5 und 7). Mit Antikörpern gegen SecE

und SecG kann gezeigt werden, dass die beiden Sec-Proteine sowohl bei der SecY- als auch bei der Fusionsprotein-Reinigung co-gereinigt werden.

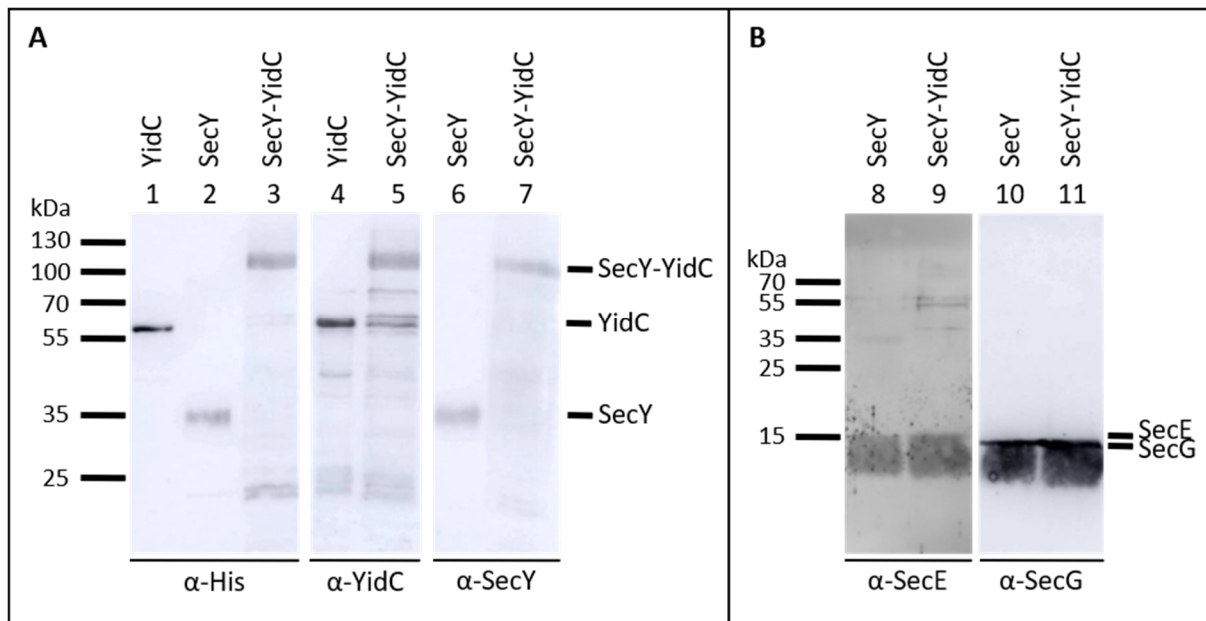


Abbildung 49: Bei der Reinigung des SecY-YidC-Fusionsproteins werden SecE und SecG co-gereinigt. Gereinigtes YidC, SecY sowie SecY-YidC wurden auf einem SDS-Gel via Western-Blotting mit verschiedenen Antikörpern analysiert. (A) Das gereinigte Fusionsprotein kann sowohl über einen anti-His-Antikörper als auch über Antikörper gegen SecY und YidC detektiert werden. (B) Durch die native Reinigung werden neben dem Fusionsprotein bzw. SecY auch SecE und SecG mitgereinigt.

3.4.4 Rekonstitution des SecY-YidC-Fusionsproteins

Wie auch schon SecYEG und YidC einzeln, wurde das SecY-YidC-Fusionsprotein mit DOPC-Liposomen rekonstituiert, um seine Funktion als Membrantranslokase bzw. -insertase zu testen.

Zur Kontrolle der Rekonstitution wurden auch hier die Proteoliposomen nach den FRET-Messungen ebenso wie der Überstand mit TCA gefällt und auf ein SDS-Gel, das im Anschluss mit Coomassie gefärbt wurde, aufgetragen. Das Fusionsprotein SecY-YidC wurde fast vollständig in die DOPC-Liposomen eingebaut (Abbildung 50). Außerdem funktioniert die Rekonstitution wie ein zusätzlicher Reinigungsschritt. Verunreinigungen, die bei der Protein-Reinigung zuvor nicht entfernt werden konnten, finden sich in den Proteoliposomen nicht wieder.

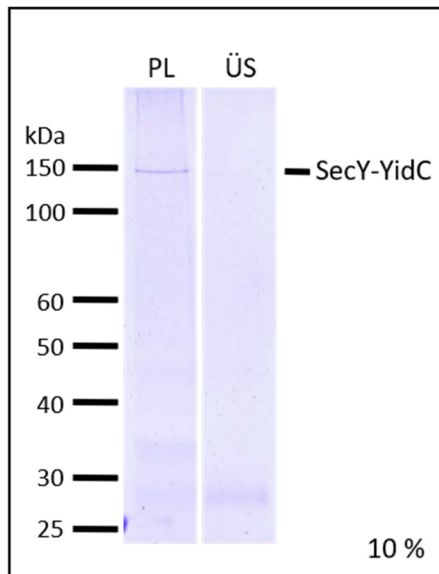


Abbildung 50: Rekonstitution des SecY-YidC-Fusionsproteins mit DOPC-Liposomen. Nach der Extrusion des Fusionsproteins mit multilamellaren DOPC-Liposomen wurde das Detergens über eine Bio-Bead-Adsorption entfernt und die Proteoliposomen geerntet. Bei der Zentrifugation werden die Proteoliposomen pelletiert, die nicht aufgenommenen Proteine bleiben im Überstand zurück. Die resuspendierten Proteoliposomen und der Überstand wurden mit TCA gefällt, auf ein SDS-Gel aufgetragen und mit Coomassie gefärbt. Das Fusionsprotein wird fast vollständig in DOPC-Liposomen eingebaut.

3.4.5 Das Fusionsprotein SecY-YidC inseriert und transloziert Substratproteine

Das Fusionsprotein SecY-YidC wurde in einer Translokations-Studie mit proPhoA und dem Pf3 *coat* Protein eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Kapitel 3.5.4 dargestellt.

Neben den Translokations-Studien wurde das Fusionsprotein außerdem in Einzelmolekül-Kraftspektroskopie-Experimenten an der ETH Zürich in Basel eingesetzt. Dabei wurden die Insertion und die Faltung des Präproteins der Lactose-Permease (LacY) durch SecY, YidC und das Fusionsprotein untersucht. In den Ergebnissen spiegelt sich ebenfalls wider, dass das Fusionsprotein funktional ist und das Substrat korrekt inseriert wird (Serdiuk *et al.*, 2019).

3.5 Translokation und Insertion von Substratproteinen durch SecYEG und YidC

Die Aufgabe von SecYEG und YidC ist die Insertion von Membranproteinen bzw. Translokation von sekretorischen Proteinen in bzw. über die innere Membran von *E. coli*. Im Folgenden soll die Insertion des Hüllproteins des Bakteriophagen Pf3, Pf3 *coat*, als YidC-abhängiges Beispiel (Chen *et al.*, 2002a; Ernst *et al.*, 2011; Kuhn *et al.*, 2017a; Rohrer & Kuhn, 1990; Serek *et al.*, 2004) und die Translokation des Präproteins der Alkalischen Phosphatase, proPhoA, als ein Sec-abhängiges Beispiel (Chatzi *et al.*, 2017; Gouridis *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013) untersucht werden.

Für die späteren Fluoreszenzmessungen unter Verwendung eines Quenchers war es wichtig, dass sich der Fluoreszenz-Farbstoff nach erfolgreicher Insertion im Inneren der Proteoliposomen befindet. Da das Innere der Liposomen dem Periplasma der Bakterienzelle entspricht, wurde Pf3 *coat* an Position 16, also auf der periplasmatischen Seite (N-terminus), mit ATTO520 markiert (Abbildung 51B). Wird Pf3 *coat* in die Liposomen inseriert, befindet sich der N-Terminus in den Liposomen und der Fluoreszenzfarbstoff ist geschützt (Ernst *et al.*, 2011; Kuhn *et al.*, 2017b). Das gereinigte und markierte Protein wurde von Max Haase zur Verfügung gestellt.

Da im Versuchsaufbau kein SecA anwesend war, wurde eine verkürzte Variante von proPhoA (proPhoA 1-221) verwendet, die nicht mehr SecA-abhängig ist (unveröffentlichte Daten von Isabel Ernst, Arbeitsgruppe A. Kuhn, Universität Hohenheim; Gouridis *et al.*, 2010). Markiert wurde proPhoA an Position 222, also im Anschluss an die verkürzte Sequenz (Abbildung 51A2).

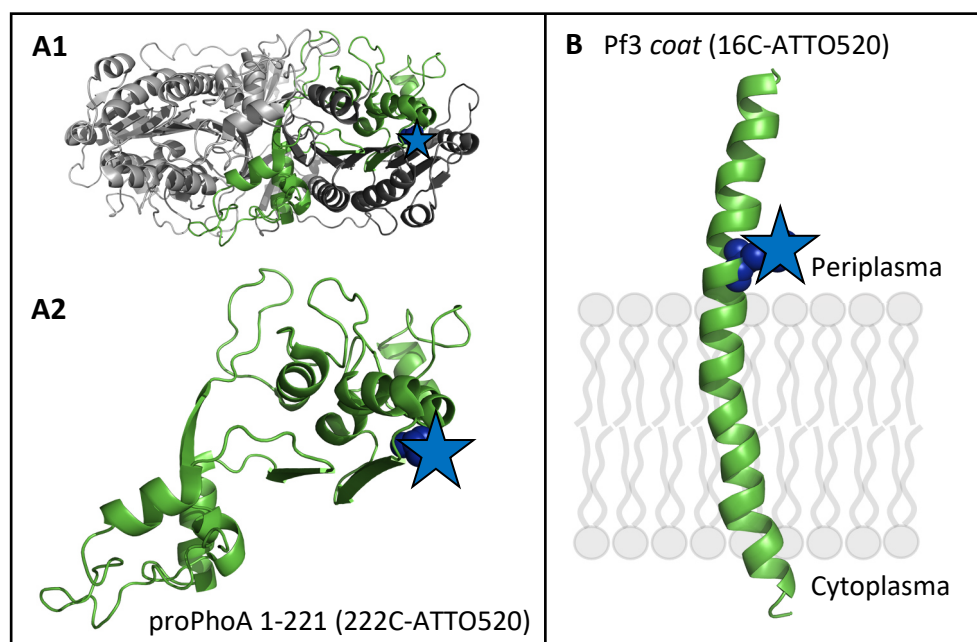


Abbildung 51: Die Substrate proPhoA und Pf3 *coat* wurden mit dem Fluoreszenz-Farbstoff ATTO520 markiert. ProPhoA (Struktur: PDB 1aja, Dealwis *et al.*, 1995) ist ein periplasmatisches Enzym, das ein Dimer aus zwei identischen Untereinheiten bildet (A1). Eine Untereinheit ist in hellgrau dargestellt, die zweite in dunkelgrau. Da mit einer verkürzten Variante von proPhoA (1-221) gearbeitet wurde, ist dieser N-terminale Teil der zweiten Untereinheit grün eingefärbt (A1) und vergrößert dargestellt (A2). Der blaue Stern symbolisiert die Fluoreszenzmarkierung mit ATTO520 an Position 222. (B) Das Hüllprotein des Phagen Pf3, Pf3 *coat* (Struktur: PDB 1ifp, Welsh *et al.*, 1998), besitzt eine Transmembrandomäne. Es wurde an Position 16 (blauer Stern) mit ATTO520 an seiner periplasmatischen Domäne markiert (Uniprot P03623: Periplasma: 1-18; TM: 19-39; Cytoplasma: 40-44).

3.5.1 Reinigung des Substrats proPhoA

Für die späteren *in vitro* Interaktionsstudien wurde das Substrat proPhoA (1-221) in *E. coli* BL21.19 (DE3) im 4 L-Maßstab vom einem pET22b Vektor exprimiert. Da proPhoA als Präprotein mit seiner Signalsequenz erhalten werden soll, wurde die Kultivierungstemperatur nach Erreichen einer Optischen Dichte von 0,8 von 30°C auf 42°C erhöht und anschließend für zwei Stunden exprimiert. BL21.19 trägt im chromosomalen *secA*-Gen eine *Amber*-Mutation an Position 13, die bei 42°C zu einem verkürzten nicht-funktionalen SecA führt. (Gouridis *et al.*, 2010). Durch die Expression von proPhoA bei 42°C wird dieses durch das Ausschalten von SecA nicht transloziert und prozessiert, sondern bleibt als Präprotein erhalten. Um sicherzugehen, dass die Temperaturabhängigkeit besteht, wurden die BL21.19-Zellen auf Agarplatten ausgestrichen und bei 30°C und 42°C inkubiert. Wachstum konnte nur bei 30°C, nicht aber bei 42°C festgestellt werden.

Nach Zentrifugation des Zelllysats findet sich proPhoA als *inclusion bodies* im Pellet wieder. Im Anschluss an die Solubilisierung mit Urea wurde proPhoA über eine IMAC isoliert. Nach zwei Waschschrritten wurde mit 50 mL (\cong 10 CV) eluiert. Das eluierte Protein wurde als eine einzige Elutionsfraktion gesammelt, da proPhoA bei zu hohen Konzentrationen ausfällt. Um die Reinigung zu überprüfen, wurden 10 μ L aller Fraktionen nach einer TCA-Fällung auf ein SDS-Gel aufgetragen und mit Coomassie gefärbt. Die verkürzte proPhoA-Variante läuft auf einer

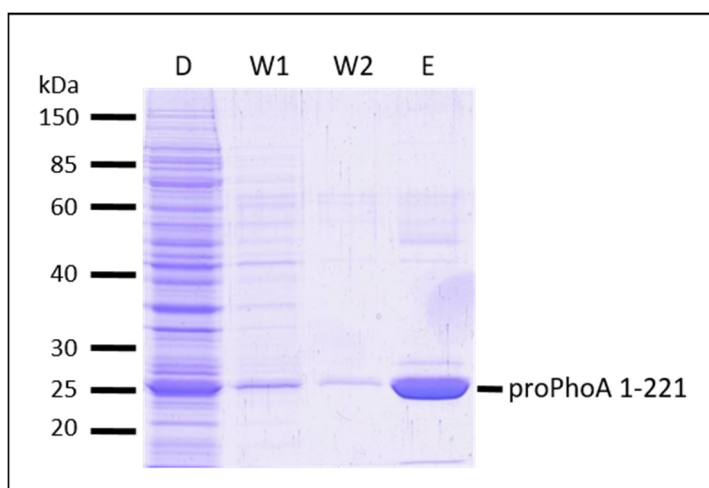


Abbildung 52: Reinigung des verkürzten Substrats proPhoA. Nach der IMAC wurden Proben (10 μ L) des Durchlaufs D, der Waschfraktionen W1 und W2 und der Elutionsfraktion E auf ein SDS-Gel (12 %) aufgetragen und mit Coomassie gefärbt. Die proPhoA Variante 1-221 hat ein Molekulargewicht von 24 kDa.

Höhe von 24 kDa (Abbildung 52). Das Protein kann bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert werden. Zum Entfernen von Imidazol und Urea, zum Austauschen von NaCl gegen KCl und zum Ändern der Glycerin- und EDTA-Konzentration wurde in mehreren Schritten dialysiert. Nach der Entfernung von Urea ist proPhoA bei Proteinkonzentrationen zwischen 30 μ M und 3 mM

nur unter 12°C löslich und wird daher bei 4°C gelagert (Gouridis *et al.*, 2010).

Nach Messung der Absorption bei 280 nm an einem UV-Vis-Spektrometer wurde mit dem Parameter $\epsilon_{\text{proPhoA1-221}}=14440$ [1/(M x cm)] eine Protein-Konzentration der dialysierten Elutionsfraktion von 31,37 μM berechnet (2.11).

3.5.2 Fluoreszenzfarbstoff-Markierung des Substrats proPhoA

Für die Fluoreszenz-Messungen mit Substraten muss proPhoA, wie auch schon SecY und YidC (3.2.2), mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert werden (2.9).

Um proPhoA (1-221) mit ATTO520 zu markieren, wurden zu 18,8 nmol Protein (600 μL dialysiertes proPhoA) der 1,3-fache molare Überschuss an Farbstoff gegeben und über Nacht bei 4°C markiert. Nach der Inkubation mit 10 mM DTT wurde die Probe auf eine Superdex 200 10/30-Säule geladen und der restliche freie Farbstoff vom markierten proPhoA mithilfe eines ÄKTA-Proteinaufreinigungssystems abgetrennt. Eluiert wurde bei Raumtemperatur mit einem Tris/KCl-Puffer (50 mM Tris/HCl pH8,0, 50 mM KCl, 10 % Glycerin) mit einer Flussrate von 0,5 mL/min. Das Elutionsprofil von proPhoA wurde bei einer UV-Absorption von 280 nm, das Profil von ATTO520 bei 516 nm aufgezeichnet (Abbildung 53A). Es wurden Fraktionen von 0,5 mL gesammelt und Proben von je 20 μL /Fraktion der ersten drei *Peaks* auf einem SDS-Gel über einen Fluoreszenz-Scanner (Typhoon TRIO+, Blue (488 nm), Emissionsfilter: ATTO520, 526 SOP Fluorescein Cy2 AlexaFluor488) und eine anschließende Coomassie-Färbung analysiert (Abbildung 53B). Alle drei analysierten *Peaks* enthalten proPhoA. Der erste *Peak* bei $\sim 11,5$ mL (Abbildung 53, blaues Kästchen, Fraktion 10) enthält wenig proPhoA. Möglicherweise handelt es sich um Aggregate oder Oligomere (PhoA bildet Dimere (Rothman & Byrne, 1963; Torriani, 1968)). Der *Peak*, der Fraktion 15-18 mit einem Elutionsvolumen zwischen 14 und 16 mL darstellt (Abbildung 53, rotes Kästchen), enthält den Großteil an Farbstoff-markiertem proPhoA. Es ist nur eine einzige proPhoA-Bande zu detektieren, freier Farbstoff ist nicht vorhanden. In der Probe, die vor Beladen der Säule genommen wurde (Abbildung 53B, Spur L, FS=freier Farbstoff), ist der freie Farbstoff ganz unten im Gel gut zu erkennen. Ab Fraktion 19 ist im Gel eine weitere Bande auf Höhe von ~ 15 kDa zu sehen, die auch im Elutionsprofil durch einen weiteren *Peak* bei $\sim 16,5$ -17,5 mL (Abbildung 53A, grünes Kästchen), der nicht komplett vom vorigen *Peak* getrennt ist, dargestellt wird.

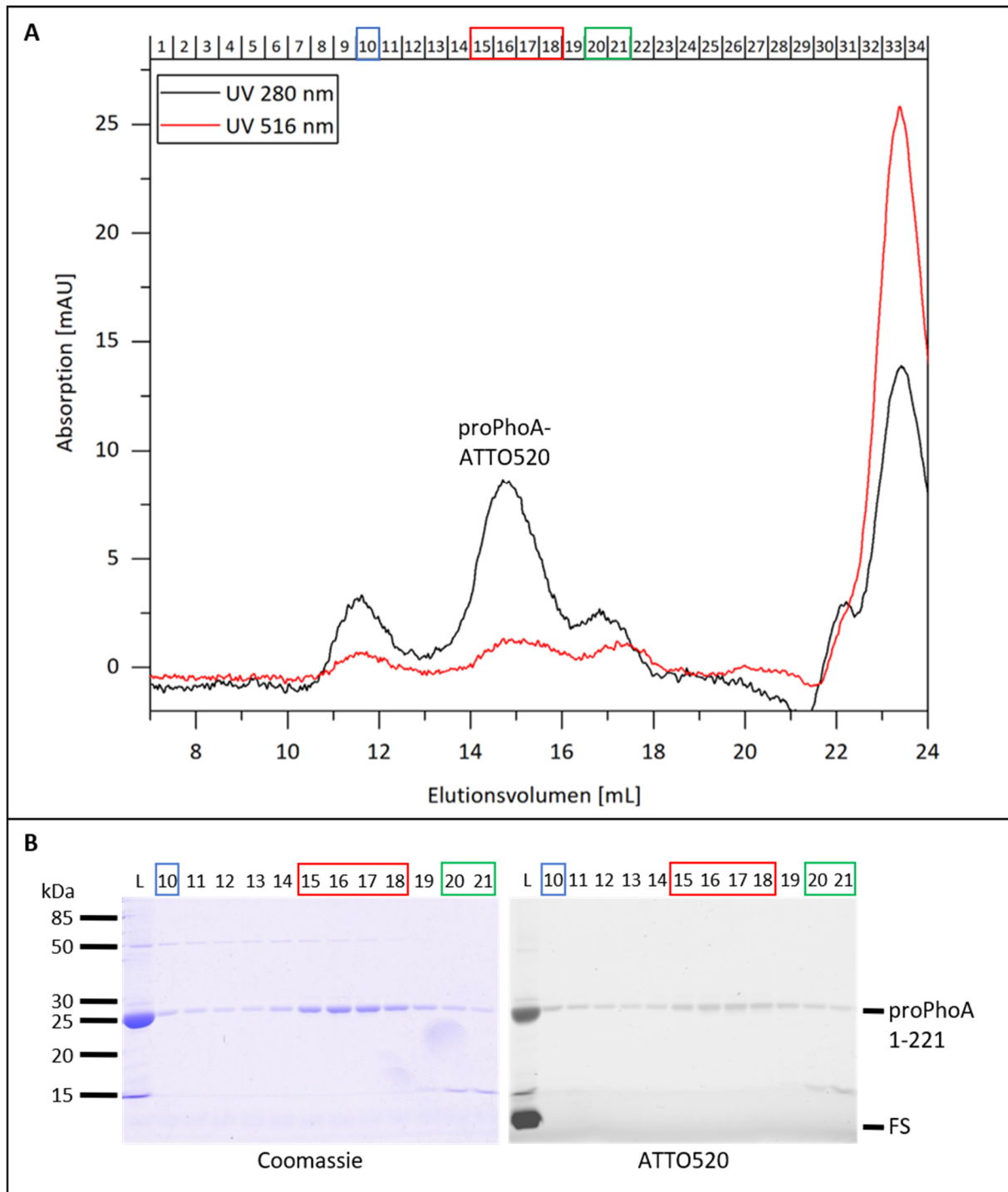


Abbildung 53: SEC-Elutionsprofil von ATTO520-markiertem proPhoA (1-221) auf einer Superdex 200 10/30-Säule. (A) ATTO520-markiertes proPhoA (1-221) wurde auf eine Superdex 200 10/30-Säule geladen, um markiertes proPhoA (Fraktion 15-18) von freiem Farbstoff (eluiert bei höherem Volumen) zu trennen (Flussrate: 0,5 mL/min). (B) Die Fraktionen der Peaks wurden auf einem SDS-Gel (15 %) analysiert und proPhoA bzw. ATTO520 über einen Fluoreszenz-Scanner und anschließendes Färben mit Coomassie detektiert (Blaues Kästchen: Proben des ersten Peaks; rotes Kästchen: Proben des zweiten Peaks; grünes Kästchen: Proben des dritten Peaks; L: Load/Probe vor Auftrennung; FS: freier Farbstoff). In den Fraktionen 15-18 (rotes Kästchen) ist eine einzige Farbstoff-markierte proPhoA-Bande und kein freier Farbstoff zu finden.

Die Fraktionen 15-18 wurden bei 4°C lichtgeschützt gelagert und für FRET-Experimente eingesetzt. Zur Bestimmung der Konzentration und der *Labeling*-Effizienz (DOL, *degree of labeling*) wurde an einem UV-Vis-Spektrometer die Absorption bei 280 nm und 520 nm gemessen (2.11). Für die Fraktionen 16 und 17, die zuvor vereint wurden, wurde eine Konzentration von 1,76 μM und ein DOL von 3,3 % berechnet ($\epsilon_{\text{proPhoA1-221}}=14440 [1/(\text{M} \times \text{cm})]$, ATTO520: $\text{CF}_{280}=0,18$, $\epsilon_{\text{max}}=110000 [1/(\text{M} \times \text{cm})]$).

3.5.3 Quenching der Fluoreszenz mit Kaliumiodid

Der Topologie von YidC und SecY nach, die der in der inneren Bakterienmembran entspricht, muss die periplasmatische Domäne von YidC und SecY in das Lumen der Proteoliposomen zeigen, um die Substrate aus der Lösung in die Liposomen zu inserieren bzw. zu translozieren. So könnte SecY bzw. YidC auf ihrer periplasmatischen Seite mit dem einen, das Substrat mit dem anderen Fluoreszenz-Farbstoff des FRET-Paares (ATTO520, ATTO647N) markiert werden und die erfolgreiche Insertion oder Translokation über FRET gemessen werden. In einem Quenching-Versuch mit YidC ATTO520-Proteoliposomen zeigt sich aber, dass YidC bei der Rekonstitution mit DOPC-Liposomen nicht komplett nach dieser Topologie eingebaut wird. Es wurden 0,1 nmol YidC mit DOPC-Liposomen (Protein:Lipid = 1:1000) rekonstituiert und 500 mM Kaliumiodid (KI) bzw. das gleiche Volumen an Puffer dazugegeben und das Spektrum von 520-590 nm (Anregungswellenlänge: 516 nm) gemessen (Fluorolog®). Das Ergebnis wurde auf das Fluoreszenzmaximum des Farbstoffs (538 nm) normiert und die Puffermessung als Hintergrund abgezogen (-1). So ergibt sich eine Abnahme der Fluoreszenz von 54 % durch das Quenching mit KI (Abbildung 54B). Wäre YidC komplett mit der periplasmatischen Domäne nach innen in die Liposomen eingebaut, wäre der Farbstoff geschützt gewesen und nicht gelöscht worden. Kuhn *et al.* (2017b) zeigte in vorigen Versuchen bereits ebenfalls, dass ein Teil der YidC-Moleküle mit der periplasmatischen Seite nach außen zeigen kann. Da aus diesem Grund der ATTO-Farbstoff dieses YidC-Anteils nach außen zeigt, kann die Insertion nicht durch FRET wie oben beschrieben gemessen werden. Ein Anlagern des Substrats an die Liposomen könnte schon zu einem Energietransfer und damit falsch positiven Ergebnissen führen. Deshalb wurde nur das Substrat markiert und die Insertion oder Translokation über Quenching mit KI untersucht.

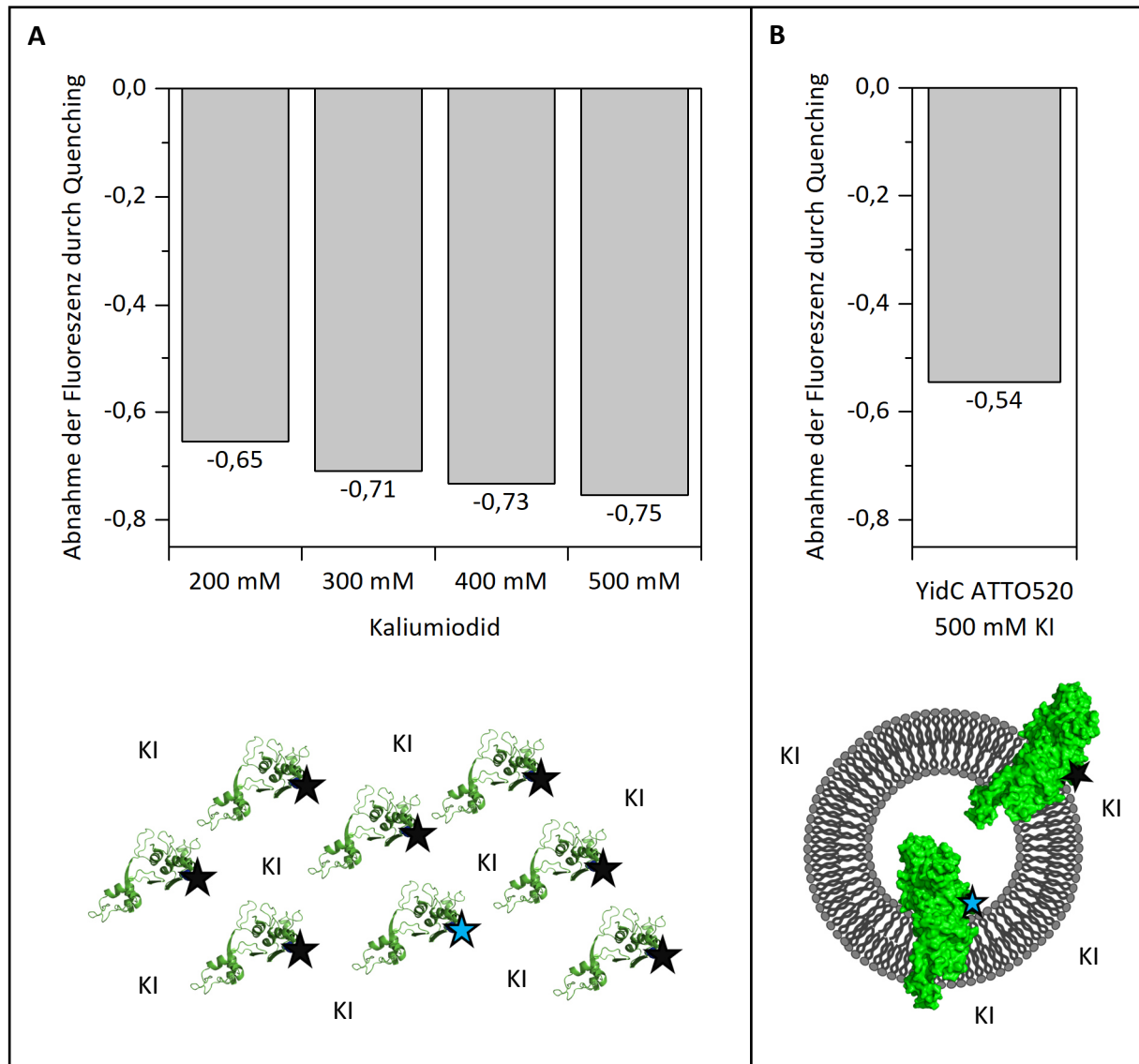


Abbildung 54: Quenching der Fluoreszenz mit Kaliumiodid. (A) ProPhoA ATTO520 (grüne Struktur mit Sternen) wurde mit verschiedenen Konzentrationen KI versetzt und die Fluoreszenz gemessen. Normiert und genullt wurde auf die jeweilige Puffermessung ohne KI. Die größte Fluoreszenz-Abnahme von 75 % wird durch 500 mM KI erreicht. (B) YidC ATTO520-DOPC-Proteoliposomen wurden mit 500 mM KI bzw. Puffer versetzt und die Fluoreszenz gemessen. Normiert und genullt wurde auf die Puffermessung. Die Abnahme der Fluoreszenz um 54 % zeigt, dass ein Teil des Farbstoffs nicht vor KI geschützt ist und somit nicht das komplette YidC mit der periplasmatischen Domäne nach innen in die Liposomen eingebaut wurde.

Um ein möglichst effizientes Quenching zu Erreichen wurden KI-Konzentrationen von 200-500 nM getestet. Hierfür wurden 0,1 nmol proPhoA ATTO520 in dem Volumen, in dem später die Translokationsexperimente durchgeführt wurden (120 µL), mit verschiedenen KI-Konzentrationen versetzt und das Spektrum gemessen (520-600 nm; Anregungswellenlänge: 516 nm; Fluorolog®). Ebenso wurden Puffermessungen (gleiche Volumina wie KI) mitgeführt. Normiert wurde wie oben auf die Fluoreszenzmaxima der Puffermessungen und diese dann

von den KI-Messwerten abgezogen. Damit ergibt sich die größte Fluoreszenz-Abnahme von 75 % bei einer Konzentration von 500 mM KI (Abbildung 54A), die in den folgenden Translokations-Experimenten eingesetzt wurde.

3.5.4 Translokation und Insertion von Sec- und YidC-abhängigen Substraten

Die Translokation eines Sec-abhängigen Substrats wurde mit proPhoA (1-221; 222C-ATTO520), die Insertion eines YidC-abhängigen mit Pf3 *coat* (16C-ATTO520) untersucht. Es wurden Proteoliposomen verwendet, die entweder SecYEG, YidC WT, YidC 5S, SecYEG zusammen mit den beiden YidC-Varianten oder das Fusionsprotein SecY-YidC enthielten. Dafür wurden jeweils 0,1 nmol Translokase 1:1000 mit DOPC-Liposomen gemischt und durch Extrusion und das Behandeln mit BioBeads (2.13) unilamellare Proteoliposomen hergestellt. Für die Hintergrund-Messung wurden außerdem leere unilamellare Liposomen vorbereitet. Die (Proteo-)Liposomen wurden in 100 μ L Translokationspuffer (50 mM Tris-Acetat pH8, 50 mM Kalium-Acetat pH8, 5 mM Magnesium-Acetat pH8) aufgenommen und 0,2 mM Substrat (proPhoA ATTO520 oder Pf3 *coat* ATTO520) dazu gegeben. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C wurde der nicht geschützte Fluoreszenz-Farbstoff mit 500 mM Kaliumiodid gequencht und die Fluoreszenz gemessen (520-600 nm, Anregungswellenlänge: 516 nm, Fluorolog®). Die Fluoreszenz am Maximum des ATTO520-Farbstoffs (538 nm) aller Messungen wurde auf die der leeren Liposomen normiert. Da wie in Abbildung 54A gezeigt nie die gesamte Fluoreszenz des für KI noch zugänglichen Farbstoffs gelöscht wird, wurde als Hintergrund der erhaltene Wert (1) der leeren Liposomen von den anderen Messungen abgezogen (leere Liposomen = 0). Wurde Fluoreszenz-markiertes Substrat in die Liposomen aufgenommen, ist der Fluoreszenzfarbstoff im Inneren der Liposomen vor dem Quenching durch KI geschützt, da Pf3 *coat* an seiner periplasmatischen Domäne markiert und proPhoA als periplasmatisches Protein komplett transloziert wurde. So ergibt sich ein positiver Wert für die Translokation oder Insertion der Substrate im Vergleich zu den leeren Liposomen (=null), in die kein Substrat aufgenommen wurde (Abbildung 55). Der Versuch wurde mehrfach unabhängig durchgeführt und ergab immer wieder ein ähnliches Ergebnis.

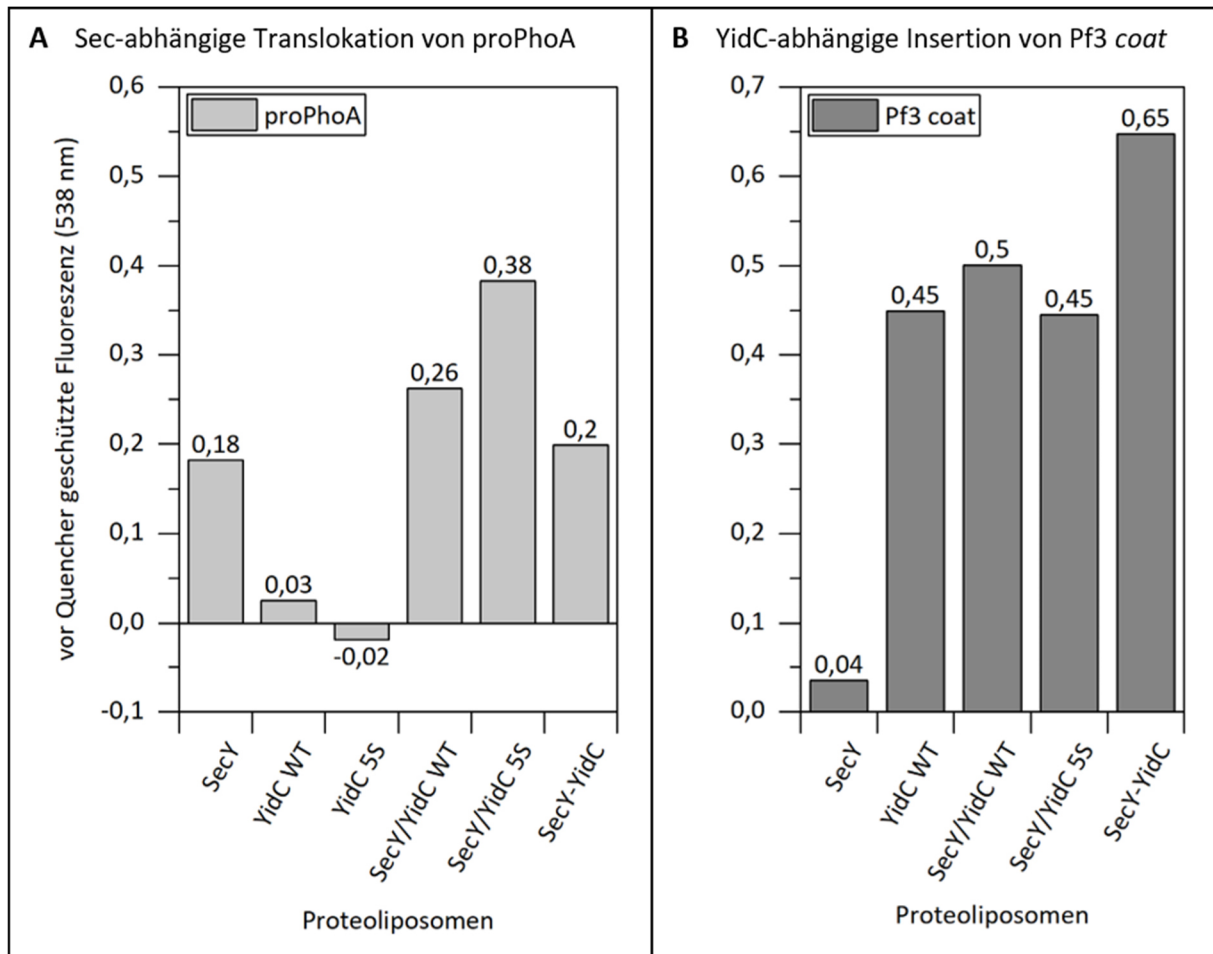


Abbildung 55: Sec-abhängige Translokation von proPhoA (A) und YidC-abhängige Insertion von Pf3 coat (B). Verschiedene Proteoliposomen und leere Liposomen als Vergleich wurden mit den Substraten proPhoA-222C-ATTO520 (A) und Pf3 coat-16C-ATTO520 (B) inkubiert. Der Fluoreszenz-Farbstoff des aufgenommenen Substrats ist im Inneren der Liposomen vor dem Quencher KI geschützt. Die Fluoreszenz zeigt als positiven Wert die Translokation oder Insertion der Substrate an, nachdem die Werte auf die Messung der leeren Liposomen normiert und genullt wurden. ProPhoA wird in alle Liposomen transloziert, die SecYEG enthalten. Pf3 coat kann dagegen in alle YidC-Liposomen inseriert werden.

ProPhoA wird von Proteoliposomen, die SecYEG allein oder in Kombination mit YidC oder das SecY-YidC-Fusionsprotein enthalten, transloziert (Abbildung 55A). Durch YidC allein kommt es bei proPhoA als Sec-abhängiges Substrat (Chatzi *et al.*, 2017; Gouridis *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013) nicht zu einer Translokation. Die fünf Serin-Mutationen (YidC 5S) haben keinen Einfluss auf die Translokation, da proPhoA YidC-unabhängig ist. Das SecY des Fusionsproteins kann das proPhoA-Substrat ebenso gut translozieren wie das einzelne SecY.

Dagegen kann SecYEG allein das Pf3 coat Protein nicht in die Membran einbauen, da die Insertion YidC-abhängig, aber Sec-unabhängig ist (Chen *et al.*, 2002a; S. Ernst *et al.*, 2011; Kuhn *et al.*, 2017a; Rohrer & Kuhn, 1990; Serek *et al.*, 2004). In die Membran inseriert wird Pf3 coat

aber in allen Liposomen, die YidC enthalten (Abbildung 55B). Auch die YidC-Mutante mit den fünf Serin-Substitutionen (YidC 5S) kann das Substrat ebenso gut inserieren wie der Wildtyp. Dies bestätigt das Ergebnis in der Dissertation von Dirk Spann, der schon zeigte, dass die Mutante YidC 5S die Insertion des YidC-abhängigen und Sec-unabhängigen Proteins M13 *procoat* (Samuelson *et al.*, 2001; Wolfe *et al.*, 1985) nicht inhibiert (Spann, 2017). Auch hier kann das YidC des Fusionsproteins das Substrat in die Membran inserieren, wodurch die Funktionalität des Fusionsproteins erneut bestätigt wird.

4 DISKUSSION

4 DISKUSSION

Etwa 30 Prozent der im bakteriellen Cytoplasma synthetisierten Proteine erfüllen ihre Funktion als Membranproteine. Die Aufgaben sind vielfältig und oft essentiell für die Lebensfähigkeit der Zellen. Unter den Membranproteinen finden sich Kanäle und Transporter, um andere Proteine in oder über die Membran zu translozieren bzw. zu inserieren, Nährstoffe aufzunehmen, Toxine zu exportieren oder Ionen, Protonen oder Elektronen zu transportieren. Andere Membranproteine besitzen eine Enzymaktivität oder sind als Rezeptoren an der Signaltransduktion beteiligt (Campbell & Reece, 2003a). Die Insertion von Membranproteinen in die Cytoplasmamembran ist für die Zelle also ein essentieller Prozess, der in Gram-negativen Bakterien hauptsächlich über die Sec-Translokase und die YidC-Insertase erfolgt (Koch *et al.*, 1999; Steinberg *et al.*, 2018; Valent *et al.*, 1998; Welte *et al.*, 2012). Die beiden Systeme, die in allen drei Reichen des Lebens konserviert sind, können unabhängig voneinander (Chen *et al.*, 2002b; Koch & Müller, 2000; Samuelson *et al.*, 2000) oder in Kooperation miteinander (Petriman *et al.*, 2018; Sachelaru *et al.*, 2017; Samuelson *et al.*, 2000; Scotti *et al.*, 2000) arbeiten. Wie diese kooperative Insertion funktioniert ist noch nicht im Detail bekannt. Es wird aber vermutet, dass das *lateral gate* von SecY mit den YidC-Transmembrandomänen, die eine hydrophobe Rutsche für Substratproteine darstellen, in Kontakt steht (Botte *et al.*, 2016). Die Interaktion zwischen SecY und YidC ist Thema dieser Arbeit.

Für die SecY/YidC-Interaktion wurde über FRET-Messungen eine hohe Bindungsaffinität und die Stöchiometrie in Detergens und in DOPC-Proteoliposomen bestimmt. Um Interaktionen zwischen SecY und YidC genauer zu kartieren, wurden *in vivo* Disulfid-Cross-Linking Experimente durchgeführt. Es wurden Kontakte zwischen dem SecY *lateral gate* und der hydrophoben Rutsche von YidC gefunden. Außerdem wurden weitere YidC-Positionen in den TM der hydrophoben Rutsche mithilfe einer YidC-Mutante mit fünf Serin-Substitutionen untersucht. Die YidC 5S-Mutante komplementiert die YidC Funktion in einem Depletionsstamm nicht, kann aber die Sec-unabhängigen Substrate M13 *procoat* und Pf3 *coat* in die Membran inserieren. Über FRET-Experimente konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen der 5S Mutante und SecY gestört ist und die betroffenen Positionen vermutlich wichtig für den intermolekularen Kontakt sind. Aus den Ergebnissen der Cross-

Linking- und der FRET-Experimente konnte ein mögliches Kontaktmodell erstellt werden. Mit den Beispiel-Substraten proPhoA und Pf3 *coat* wurden *in vitro* die Insertion und Translokation in unterschiedliche SecY- und YidC-Proteoliposomen gezeigt. Zudem wurde ein Fusionsprotein aus SecY und YidC zur Sicherstellung der richtigen Stöchiometrie, Orientierung und unmittelbaren Nähe der beiden Proteine kloniert und von einer Arbeitsgruppe der ETH Zürich erfolgreich in Einzelmolekül-Kraftspektroskopie-Experimenten zur Verfolgung der Insertion und Faltung von LacY eingesetzt. Zusammenfassend trägt diese Arbeit zu einem besseren Verständnis der kooperativen Membraninsertion durch SecY und YidC bei.

4.1 SecY und YidC interagieren *in vitro* mit hoher Affinität

Für die Sec/YidC-abhängige Membraninsertion ist eine Interaktion zwischen der Sec-Translokase und der Insertase YidC erforderlich. Schon früh wurde vermutet, dass das Sec-Translokon und YidC bei der Insertion von Membranproteinen kooperieren. Einen ersten Hinweis auf eine SecY/YidC-Interaktion lieferte die Co-Reinigung von SecY mit YidC (Scotti *et al.*, 2000). Kurze Zeit später wurden *Cross-Links* zwischen dem Substrat FtsQ mit SecY und YidC (Urbanus *et al.*, 2001) und zwischen dem Substrat MtlA mit YidC und SecE (Beck *et al.*, 2001) gezeigt. Zudem wurde für einige weitere Membranproteine wie die Untereinheit a der F₁F₀ ATP Synthase (Kol *et al.*, 2009; Yi *et al.*, 2003), CyoA (van Bloois *et al.*, 2006), die Laktose-Permease LacY (Nagamori *et al.*, 2004), MalF (Wagner *et al.*, 2008a) und TatC (Zhu *et al.*, 2012) eine SecY/YidC-Abhängigkeit festgestellt. In späteren Studien wurden einige Kontakte zwischen SecY und YidC bereits nachgewiesen (Petriman *et al.*, 2018; Sachelaru *et al.*, 2013 und 2017). Der Mechanismus hinter der SecY/YidC-abhängigen Membraninsertion ist aber noch nicht geklärt. Um die SecY/YidC-Interaktion genauer zu analysieren, wurde über FRET-Messungen die Bindungsaffinität zwischen den beiden Interaktionspartnern sowie die Stöchiometrie in Detergens und in Proteoliposomen bestimmt. Da eine Energieübertragung von einem Fluoreszenzfarbstoff auf den anderen abhängig vom Abstand der Farbstoffe ist, eignet sich FRET, um Kontakte zwischen zwei Interaktionspartnern zu zeigen (Förster, 1948).

Bei der Titration von SecY ATTO647N zu YidC ATTO520 in Detergens zeigte sich wie erwartet eine Sättigungskurve, mit deren Hilfe die Dissoziationskonstante und die Stöchiometrie ermittelt werden konnten. Überraschenderweise sank das Akzeptor-Signal ab einem

Verhältnis der Interaktionspartner von 1 wieder ab (Abbildung 32). Eine mögliche Erklärung wäre, dass nach Sättigung aller Donor-Farbstoffmoleküle (YidC ATTO520) mit Akzeptor-Farbstoffmolekülen (SecY ATTO647N) jedes weitere Akzeptor-Molekül keinen Interaktionspartner mehr findet. Dies kann zu einem *Self-Quenching* der Fluoreszenz führen. Beim *Self-Quenching*, auch Kreuzrelaxation genannt, wird vor allem bei hohen Konzentrationen Energie des einen Moleküls, das sich in einem angeregten Zustand befindet, auf ein anderes identisches Molekül, das sich im Grundzustand befindet, übertragen. Es handelt sich also um eine spezielle Form des Fluoreszenz-Quenchings, bei der das Fluorophor und der Quencher identisch sind. Voraussetzung ist die Überlappung des Absorptionsspektrums dieses Fluorophors mit seinem eigenen Emissionsspektrum. Das ist bei ATTO647N der Fall (Abbildung 17B). Dadurch wechseln beide ATTO647N-Moleküle zu einem angeregten Zustand, dessen Energieniveau zwischen den beiden Anfangszuständen liegt. Da das Absinken der Energie des ersten Moleküls gleich groß ist wie das Ansteigen der Energie des zweiten Moleküls, wird die Energie nicht als Fluoreszenz freigesetzt, sondern im *Self-Quenching* festgehalten (Ghosh *et al.*, 2013; Katoh *et al.*, 2001). In diesem Fall würde also ein vom Donor angeregtes Akzeptor-Molekül Energie auf ein weiteres Akzeptor-Molekül, das im Überschuss vorhanden ist und damit keinen Interaktionspartner als Donor mehr findet, übertragen anstatt zu fluoreszieren. Je mehr Akzeptor-Moleküle dazukommen umso mehr Energie wird im *Self-Quenching* festgehalten und geht an messbarer Fluoreszenz verloren. Folglich sinkt das Fluoreszenzsignal. Eine weitere Erklärung für das Absinken der Fluoreszenz bei hohen Akzeptor- bzw. SecY-Konzentrationen wäre eine mögliche SecY-Dimerbildung. Dadurch kämen weniger SecY/YidC-Interaktionen zustande, zwischen denen FRET auftreten kann. Durch einen geringeren Energietransfer nimmt das Akzeptor-Fluoreszenzsignal wieder ab. Eine SecY-Dimerbildung ist in unterschiedlichen Studien gezeigt worden (Park & Rapoport, 2012; Zheng *et al.*, 2016). Mit steigender SecY-Konzentration könnte daher die Dimerbildung gegenüber der SecY/YidC-Interaktion begünstigt werden.

Über die Sättigungskurven wurde der K_d -Wert als Maß für die Bindungsaffinität bestimmt. Der K_d -Wert ist definiert als die Konzentration, für die die Fluoreszenz die halbe maximale Fluoreszenz beträgt ($F = \frac{1}{2} F_{\max}$). Je kleiner der K_d -Wert ist, desto schneller wird F_{\max} erreicht und desto größer ist die Affinität der Bindungspartner. Das Reaktionsgleichgewicht liegt dann auf der Seite der gebundenen Interaktionspartner. In Detergens wurde eine Affinität von

27 (\pm 10) nM ermittelt. Die Dissoziationskonstante in DOPC-Proteoliposomen liegt mit 995 nM um mehr als das 30-fache höher. Warum die ermittelte Affinität in Proteoliposomen deutlich schwächer ist, kann unterschiedliche Gründe haben. Dazu müssen verschiedene Fehlerabschätzungen zur Berechnung des K_d -Werts gemacht werden. Eine Annahme der Berechnungen war, dass 100 % von SecY und YidC bei der Rekonstitution in die Proteoliposomen eingebaut wurden. Wurde ein Teil der Proteine nicht eingebaut, gehen diese bei der Rekonstitution verloren. Dies kann die Konzentration des einen Interaktionspartners um einen anderen Anteil als die Konzentration des zweiten Interaktionspartners reduzieren. Damit würden sich die Verhältnisse und damit der K_d -Wert um denselben Anteil verschieben. Wurde zum Beispiel nur 90% des Akzeptors im Vergleich zum Donor rekonstituiert, verringert sich auch der K_d -Wert auf 90%. Bei den Messungen in Detergens waren dagegen immer alle eingesetzten SecY- und YidC-Moleküle im Probenvolumen anwesend.

Die Topologie der Proteine in den Proteoliposomen hat dagegen keinen Einfluss auf den K_d -Wert. Eingebaut in die Proteoliposomen können beide Proteine SecY ATTO647N und

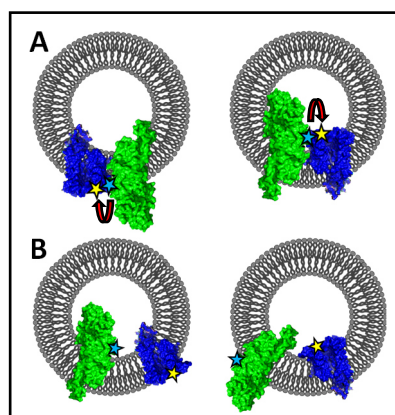


Abbildung 56: Unterschiedliche Topologie-Möglichkeiten nach der Co-Rekonstitution von YidC-ATTO520 und SecY-ATTO647N.

YidC ATTO520 mit der periplasmatischen Farbstoff-markierten Seite nach innen oder beide nach außen zeigen (Abbildung 56A). Außerdem kann eines der beiden Proteine mit dem Farbstoff nach innen und das andere nach außen zeigen und vice versa (Abbildung 56B). Es ergeben sich also vier unterschiedliche Möglichkeiten, wie die Proteine in die Proteoliposomen eingebaut sein können. Es kommt aber nur zu einem FRET-Effekt, wenn SecY ATTO647N und YidC ATTO520 in der richtigen Orientierung zueinander liegen, also so, dass die Farbstoff-markierte Seite beider Proteine auf der gleichen Seite der Membran liegt (Abbildung

56A), und somit nur bei zwei der vier Möglichkeiten. Dadurch verringert sich zwar die Konzentration an Donor- und Akzeptor-Molekülen, die für eine messbare Interaktion zur Verfügung stehen, in diesem Fall aber für den Donor und den Akzeptor im gleichen Maße. Dadurch nimmt dies keinen Einfluss auf den K_d -Wert.

Wie in 2.15.2 beschrieben, kann das Ergebnis durch das schwache Fluoreszieren des Donor-Farbstoffs am Fluoreszenzmaximum des Akzeptors (Abbildung 17A) verfälscht werden, je nachdem, welcher Anteil der Energie vom Donor auf den Akzeptor übertragen wird. Kontroll-

Messungen, um diesen Fehler tatsächlich zu berechnen, sind schwierig, da mit steigender FRET-Effizienz der Fehler abnimmt. Darum wurden die beiden Extremfälle '0 % FRET' und '100 % FRET' betrachtet (3.2.3). Die Fehlerabschätzung zeigt, dass der tatsächliche K_d -Wert in Detergens je nach FRET-Effizienz etwas höher liegt als der berechnete. In den Proteoliposomen stieg im Gegensatz zu den Messungen in Detergens die Donor-Konzentration im Verlauf der Messung, die Akzeptor-Konzentration blieb konstant. Damit müsste bei den Proteoliposomen-Messungen mit steigender Donor-Konzentration mehr Fluoreszenz vom Akzeptor-Signal abgezogen werden. Die Kurve würde im Verlauf flacher, die Sättigung früher erreicht und die Asymptote kleiner werden, was zu einem kleineren K_d -Wert führen würde. Durch diese Fehlerbetrachtung gleichen sich die ermittelten K_d -Werte in Detergens und Proteoliposomen weiter an. Der tatsächliche Wert liegt vermutlich dazwischen.

Bei allen Fehlerbetrachtungen liegt der K_d -Wert im nanomolaren Bereich, was für eine starke Bindung zwischen SecY und YidC spricht. Ein Einfluss der Konzentration auf den K_d -Wert wurde durch eine Wiederholung der Messung mit halber Konzentration beider Proteine ausgeschlossen (Tabelle 15). Die Messungen fanden alle *in vitro* statt. Die *in vivo* Situation unterscheidet sich davon aber durch die Abwesenheit von weiteren Komponenten des Translokationsapparats und Verwendung von DOPC-Lipiden, die vermutlich ebenfalls Einfluss auf die Interaktionsaffinität haben. Die beschriebenen Einflüsse auf den K_d -Wert haben keine Auswirkung auf das Verhältnis von YidC zu SecY. Es ergab sich in allen Fällen ein stöchiometrischer Faktor von 1. Dies ist übereinstimmend mit der Stöchiometrie, die für das sogenannte Holotranslokon über *Cross-Linking* Experimente (Schulze *et al.*, 2014) und über dessen Struktur mit geringer Auflösung (Botte *et al.*, 2016) bestimmt wurde.

Bei weiteren Versuchen mit Proteoliposomen, die SecY und YidC in dem zuvor bestimmten 1:1-Verhältnis enthielten, kam es nur zu einem Energietransfer, wenn SecY und YidC co-rekonstituiert waren. Lagen SecY und YidC in getrennten Liposomen vor, kam es zu keinem Energietransfer. Damit konnte gezeigt werden, dass die beiden Proteine nur lateral miteinander in der Membran interagieren können (Abbildung 37).

Die Fusion der separaten Proteoliposomen durch Calcium und das darauffolgende Auftreten von FRET (Abbildung 38B) beweist, dass die Interaktion in den Proteoliposomen nicht schon vor der Rekonstitution zustande kam oder durch die Rekonstitution erzwungen wurde,

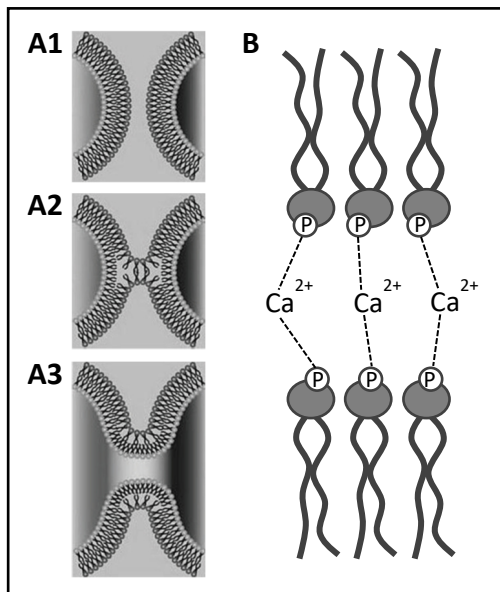


Abbildung 57: Calcium-Fusion von Liposomen. Nachdem sich die Liposomen angenähert haben (A1), beginnt die äußere Lipidschicht zu fusionieren (A2) bevor auch die innere Lipidschicht fusioniert (A3). (B) Die Ca^{2+} -Ionen bilden dabei eine Brücke zwischen den negativ geladenen Phosphatgruppen der beiden Liposomen. (Abbildung A1-A3 aus Roy & Sarkar, 2011)

sondern erst in der Membran stattfand. Die Calcium-Fusion von Liposomen beruht auf Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen Ca^{2+} -Ionen und negativen Ladungen der Lipide (Abbildung 57). Der Effekt wird durch anionische Lipide verstärkt. DOPC besitzt als Zwitterion zwar grundsätzlich eine neutrale Netto-Ladung, in basischem Puffer, wie in diesen Versuchen angewendet, verschiebt sich die Ladung von DOPC aber zum Negativen. Zusätzlich sind die Phosphatgruppen negativ geladen, zwischen denen die Ca^{2+} -Ionen Brücken bilden, die letztendlich zur Fusion führen (Jena, 2009). Dies erklärt, warum eine Ca^{2+} -vermittelte Fusion auch mit DOPC-Liposomen stattfinden konnte. Die niedrige FRET-Effizienz kann zum einen durch eine niedrige Fusionseffizienz erklärt werden. Dazu kommt, dass die Fusion nicht

nur zu SecY/YidC-Proteoliposomen führt, sondern möglicherweise auch SecY/SecY- und YidC/YidC-Proteoliposomen entstanden, bei denen kein FRET auftreten kann.

Durch die Zugabe verschiedener Detergenzien zu den co-rekonstituierten Proteoliposomen konnte gezeigt werden, dass die Interaktion auch nach einer Solubilisierung stabil war. Nicht denaturierende Detergenzien wie DDM und DM, die auch bei der Reinigung von SecY und YidC Verwendung finden, führten nur zur Solubilisierung der Proteine. Die Interaktion blieb dabei größtenteils erhalten. Erst eine Behandlung mit SDS und die damit verbundene Denaturierung der Proteine löste die Interaktion, was im gesunkenen FRET-Signal deutlich wurde (Abbildung 38A).

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Messungen waren in den Proteoliposomen sowie in Detergens nur die beiden Interaktionspartner anwesend. Das Sec/YidC-System umfasst in der Zelle noch einige weitere beteiligte Komponenten, die für die Interaktion von Bedeutung sein können. Im sogenannten Holotranslokon ist neben SecYEG und YidC das

Heterotrimer SecDFyajC im Komplex vorhanden (Schulze *et al.*, 2014). Außerdem spielt das Motorprotein SecA eine wichtige Rolle (Crane & Randall, 2017).

Xie *et al.* (2006) und Nouwen & Driessen (2002) haben gezeigt, dass YidC einen Komplex mit SecDF formt, über das es mit SecY assoziiert ist. Die periplasmatische P1-Domäne von YidC interagiert dabei mit SecF (Xie *et al.* 2006). Anhand dieser Ergebnisse wurde vorgeschlagen, dass SecDFyajC YidC mit SecY verbindet und YidC in Abwesenheit von SecDF nicht effizient an SecYEG binden kann. Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse der FRET-Messungen zeigen aber auch in Abwesenheit von SecDFyajC eine Interaktion zwischen SecY und YidC. Übereinstimmend damit konnten unter SecDF-Depletionsbedingungen SecY/YidC-Kontakte über *in vivo Cross-Linking* nachgewiesen und damit gezeigt werden, dass YidC auch direkt mit SecY interagiert (Sachelaru *et al.*, 2013). Xie *et al.* (2006) zeigten außerdem, dass die Interaktion von SecF mit YidC nicht essentiell für die Lebensfähigkeit der Zelle ist. Auch in früheren Studien wurde gezeigt, dass SecDF nicht absolut essentiell ist (Pogliano & Beckwith, 1994a). Stimmig ist dies auch in Hinsicht auf das deutlich geringere Vorkommen von SecDFyajC in Vergleich zu YidC und SecY (Crane & Randall, 2017). SecDF ist also für die Interaktion nicht zwingend erforderlich, könnte aber einen verstärkenden Effekt haben, was auch die effektivere Insertion verschiedener Substrate durch das Holotranslokon im Vergleich zu SecYEG und YidC gezeigt haben (Komar *et al.*, 2016).

SecA könnte nach Zimmer *et al.* (2008) an der Öffnung des *lateral gates* beteiligt und darum ebenfalls ein wichtiger Faktor für die Interaktion sein. In der Studie von Sachelaru *et al.* (2013) wurde aber gezeigt, dass die An- oder Abwesenheit von SecA keinen Einfluss auf die SecY/YidC-Interaktion hat. In den FRET-Messungen dieser Arbeit war für die SecY/YidC-Interaktion ebenfalls kein SecA nötig.

Bei den FRET-Messungen war außerdem kein Substrat anwesend, für dessen kooperative Insertion die SecY/YidC-Interaktion eigentlich zustande kommt. Aufgrund verschiedener Kristall- und Cryo-EM-Strukturen wird angenommen, dass das Binden von Substraten beziehungsweise deren Signalsequenz zu Konformationsänderungen und der Öffnung des *lateral gates* führt (Egea & Stroud, 2010; Hizlan *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2014; van den Berg *et al.*, 2004). Damit stellte sich die Frage, ob eine Interaktion in Abwesenheit von einem Substratprotein überhaupt zustande kommt. Durch die Ergebnisse der FRET-Messungen ohne Substrat konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Substraten nicht erforderlich für die Interaktion ist. Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen von *in vitro Cross-Linking-*

Experimenten von Sachelaru *et al.* (2013). Hier konnte ebenfalls beobachtet werden, dass YidC auch in Abwesenheit eines Substrats an SecY bindet. YidC wird folglich nicht nur an die aktive SecY-Translokase, die gerade ein Substrat transportiert, rekrutiert, sondern bindet generell an SecY. Ob sich die Affinität der Bindung durch die Öffnung des *lateral gates* durch die Anwesenheit eines Substrats ändert, könnte über FRET-Messungen mit SecY, dessen *lateral gate* nicht geöffnet werden kann, überprüft werden. Über einen Disulfid-Cross-Link zwischen den Positionen 87 in TM2b und 286 in TM7 kann das *gate* geschlossen gehalten werden (du Plessis *et al.*, 2009).

Ähnliche Interaktionen wie die zwischen YidC und dem Sec-Translokon wurden auch in den Homologen Systemen gefunden. In Zellen der Pflanze *Arabidopsis thaliana* wurde über *Cross-Linking* und Co-Immünpräzipitation gezeigt, dass Alb3 mit dem Chloroplasten SecYE assoziiert ist. Die Interaktion scheint aber relativ schwach und kurzlebig zu sein (Klostermann *et al.*, 2002). Die Vermutung ist, dass Alb3 mit SecYE gemeinsam cotranslational Proteine in die Thylakoidmembran inseriert, ähnlich wie die bakteriellen Homologe (Hennon *et al.*, 2015). In Mitochondrien wurde kein SecY-Homolog gefunden, vermutlich wurde es evolutionär durch TIM ersetzt (Tong *et al.*, 2011). Oxa1, das YidC-Homolog der Mitochondrien, inseriert aber in Kooperation mit dem TIM-Komplex Proteine in die Membran (Hennon *et al.*, 2015).

4.2 Das *lateral gate* von SecY kontaktiert die hydrophobe Rutsche von YidC

Es wird vermutet, dass eine Interaktion zwischen SecY und YidC am *lateral gate* und an den YidC-TM3 und 5 stattfindet. Substrathelices von Membranproteinen verlassen SecY durch das *lateral gate* in Richtung Membran (Frauenfeld *et al.*, 2011; van den Berg *et al.*, 2004) und könnten dabei an YidC übergeben werden (Kumazaki *et al.*, 2014b; Petriman *et al.*, 2018; Sachelaru *et al.*, 2013; Schulze *et al.*, 2014). Die Struktur des Holotranslokons zeigt YidC in der Nähe des *lateral gates*. Die Auflösung ist aber zu gering (14 Å), um Details zu erkennen (Botte *et al.*, 2016). Welche genauen Positionen des einen Interaktionspartners dabei mit welchen des anderen in Kontakt stehen sowie der genaue Mechanismus der kooperativen Membraninsertion sind unbekannt. Weitere Beweise und tiefere Einblicke bezüglich der

spezifischen Kontakte lieferten in dieser Arbeit *in vivo* Disulfid-*Cross-Linking* Experimente und *in vitro* FRET-Messungen.

4.2.1 *In vivo Cross-Linking* ergibt Kontakte zwischen dem SecY *lateral gate* und YidC-TM3 und 5

Über Disulfid-*Cross-Linking* konnten Kontakte zwischen dem SecY *lateral gate* und der hydrophoben Substrat-Rutsche von YidC *in vivo* gezeigt werden (Abbildung 22A und 23A). Die entsprechenden SecY/YidC-*Cross-Link* Produkte zeigten sich im SDS-Gel auf einer Höhe von ca. 90-95 kDa. Auf dieser Höhe wurde auch in anderen *Cross-Link*-Studien das SecY/YidC-Produkt gefunden (Petriman *et al.*, 2018; Sachelaru *et al.*, 2013 und 2017). In diesen Studien zeigte sich ebenfalls wie bei den *Cross-Link* Experimenten dieser Arbeit eine weitere Bande zwischen ca. 70 und 80 kDa. Es wurde vermutet, dass diese Bande möglicherweise durch proteolytischen Abbau des SecY/YidC-Produkts entstanden ist. Da in der vorliegenden Arbeit diese Bande auch in Abwesenheit von SecY zu finden war und die Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen YidC durchgeführt wurde, könnte es sich eher um einen *Cross-Link* von YidC mit einem anderen Interaktionspartner handeln. SecE und G sowie YajC besitzen kein Cystein für einen Disulfid-*Cross-Link*. Die anderen Komponenten des Holotranslokons, SecDF, sind deutlich zu groß, wodurch diese Möglichkeiten ausscheiden. Da die YidC-Mutanten ihr Cystein für das Disulfid-*Cross-Linking* in den Substrat-Kontakthelices (Klenner & Kuhn, 2012) TM3 und 5 aufweisen, könnte eventuell ein Kontakt mit einem Substratprotein eine Erklärung sein. Der genauere Ursprung der Bande wurde in dieser Arbeit nicht näher analysiert.

Die Signale der *Cross-Link*-Produkte waren eher schwach im SDS-Gel zu sehen. Dies zeigte sich auch in anderen Studien (Petriman *et al.*, 2018). Eventuell sind die Interaktionen zwischen SecY und YidC *in vivo* eher schwach und kurzlebig. Dafür spricht, dass Petriman *et al.* (2018) nur dann *Cross-Links* beobachten konnten, wenn SecY und YidC in stöchiometrischen Mengen vorhanden waren. Dies entspricht nicht der tatsächlichen Situation *in vivo*, in der ein etwa fünf- bis zehnfacher Überschuss an YidC (2500-3000 pro Zelle; Urbanus *et al.*, 2002) gegenüber SecY (200-1300 pro Zelle, je nach Quelle; Crane & Randall, 2017) vorliegt. Außerdem liegen vermutlich nicht alle SecYEG- und YidC-Proteine als Heterotetramer vor, sondern vielmehr in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen unterschiedlichen Zusammensetzungen verschiedener Bindepartner (Crane & Randall, 2017; Kuhn *et al.*, 2017a). Die Isomerase PpiD

(Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase D) und YidC teilen sich sogar SecY-Bindepositionen (Sachelaru *et al.*, 2013). In den Chloroplasten-Homologen wurde die Interaktion ebenfalls als eher schwach und kurzlebig eingeschätzt (Klostermann *et al.*, 2002). Der *in vitro* gemessene K_d -Wert legte dagegen eine starke Bindungsaffinität nahe. Allerdings ist hier anzumerken, dass der Versuchsaufbau der *in vitro* FRET-Messungen nicht der *in vivo* Situation in der Zelle entsprach. SecYEG und YidC waren auch hier in stöchiometrischen Mengen vorhanden, obwohl YidC *in vivo* wie bereits erwähnt deutlich zahlreicher vertreten ist als SecY. Das Fehlen weiterer Komponenten des Translokationsapparats und potenzieller Interaktionspartner, mit denen YidC und SecY *in vivo* in einem dynamischen Gleichgewicht vorliegen, könnte die schwache Bindung *in vitro* begünstigen. Zusammenfassend kann man vermuten, dass die Interaktion zwischen SecY und YidC *in vivo* eher schwach oder zumindest schwächer als in den *in vitro* Systemen erscheint.

Bisherige *Cross-Link* Studien zeigten oft nur eine Kartierung von SecY/YidC-Kontakten an einem der beiden Interaktionspartner. Wo sich die Interaktionsposition am zweiten Protein genau befindet, blieb aufgrund des Versuchsaufbaus unklar. Beispielsweise konnten in einer ersten detaillierteren Studie zur SecY/YidC-Interaktion über UV-abhängiges *Cross-Linking* mit Para-benzoyl-L-phenylalanin (pBpa) SecY/YidC-Kontakte in allen vier Helices des *lateral gates* *in vivo* identifiziert werden. Da beim pBpa-*Cross-Linking* nur einer der Partner den *Cross-Linker* an einer definierten Position über ein Amber-Stop-Codon eingebaut hat und der zweite Partner unabhängig von einer speziellen Aminosäure und damit unabhängig einer definierten Position gebunden wird, blieb unklar, wo sich die zugehörigen YidC-Kontaktpositionen befinden (Sachelaru *et al.*, 2013). Beim Disulfid-*Cross-Linking* dagegen, wie es in dieser Arbeit Anwendung fand, sind die Positionen in beiden Interaktionspartnern durch das Einführen von Einzelcysteinen an potenziellen Kontaktstellen definiert. Petriman *et al.* (2018) zeigten später durch pBpa-*Cross-Linking* einige YidC-Kontaktpositionen mit SecY. Aus demselben Grund fehlen dann aber die zugehörigen definierten SecY-Positionen. Die Arbeitsgruppe konnte Kontakte der P1-Domäne und, wie in dieser Arbeit, der YidC-TM3 und 5 mit SecY finden. Außerdem kontaktieren die YidC-TM1 und die C1-Domäne SecY. Da zuvor YidC-Kontakte im Inneren des SecY *lateral gates* gefunden wurden (Sachelaru *et al.*, 2017), wird spekuliert, ob daran die im Vergleich zu den übrigen fünf eher flexible YidC-TM1 beteiligt sein könnte (Petriman *et al.*, 2018).

Über Disulfid-*Cross-Linking* konnten in der vorliegenden Arbeit direkte Kontaktpositionen zwischen der SecY-TM3 (Position 122, 123) und der YidC-TM3 (Position 428-432) sowie der SecY-TM8 (Position 328) mit der YidC-TM5 (Position 499) gezeigt werden (Abbildung 58). Position 431 in der YidC-TM3 konnte bereits in einer Studie von Petriman *et al.* (2018) als SecY-Kontakt nachgewiesen werden. Jetzt konnte hier eine zugehörige SecY-Position identifiziert werden. An der YidC-TM3 fanden sich eine Vielzahl an Kontakten mit der gleichen SecY-Position. Dies deutet auf eine Flexibilität der Konformation und deren Änderung im Laufe des Insertionsprozesses hin. In einer anderen Studie wurde ebenfalls gezeigt, dass YidC während der Insertion neu positioniert wird. Nach der Bindung von RNCs verliert YidC möglicherweise seine SecY-Kontakte im Inneren des *lateral gates* und bindet dann an dessen Rand (Sachelaru *et al.*, 2017).

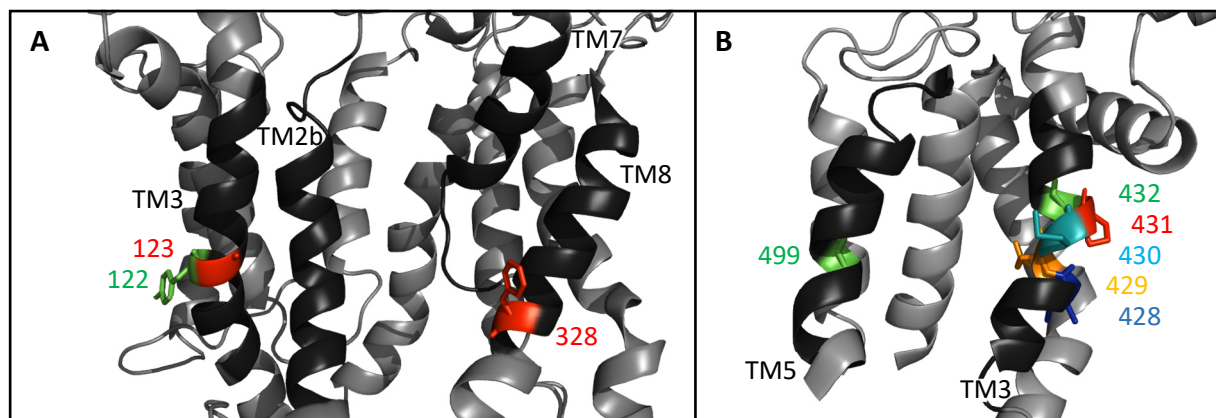


Abbildung 58: Kontaktpositionen der SecY/YidC-YidC-Interaktion in der Kristallstruktur von (A) SecY (PDB 3J01, Frauenfeld *et al.*, 2011) und (B) YidC (PDB 3WVF, Kumazaki *et al.*, 2014b). (A) Die TM des *lateral gates* von SecY sind dunkelgrau eingefärbt und beschriftet. Die YidC-Kontaktpositionen 122, 123 und 328 sind farbig dargestellt. (B) Die TM der hydrophoben Substrat-Rutsche sind dunkelgrau dargestellt. Kontakte zu SecY, Positionen 428-432 und 499, sind bunt eingefärbt.

Kristallstrukturen wie in Abbildung 58 stellen immer nur den Zustand dar, in dem die Proteine kristallisiert wurden. Somit erhält man immer nur eine Momentaufnahme der *in vivo* relevanten Konformationen und kann über die Strukturen allein nicht auf einen sich verändernden genauen Kontakt schließen. Dagegen können beim *in vivo* Disulfid-*Cross-Linking* sämtliche dieser Zustände und Konformationen der SecY/YidC-Interaktion eingefangen werden. Durch die gefundenen direkten Kontaktpositionen konnte ein Kontaktmodell zwischen SecY und YidC erstellt werden (Abbildung 59). Die hydrophobe Substratrutsche von YidC (TM3 und 5) steht in diesem Modell dem SecY *lateral gate*

gegenüber. Aus diesen Kontakten lassen sich Rückschlüsse auf den Ablauf der kooperativen Membraninsertion ziehen (4.2.3).

4.2.2 Die YidC 5S Mutante interagiert nicht mit SecY

Weitere Hinweise zur SecY/YidC-Interaktion lieferten die FRET-Bindungsstudien mit einer YidC-Mutante mit fünf Serin-Substitutionen an Substrat-Kontaktstellen der TM3-5 (Abbildung 39). Diese YidC-Mutante konnte die YidC-Funktion unter Depletionsbedingungen nicht komplementieren (Abbildung 40). Überraschenderweise konnte aber gezeigt werden, dass die Insertion einiger YidC-Substrate nicht von den Mutationen betroffen ist. Dirk Spann konnte in seiner Dissertation beobachten, dass diese Mutante M13 *procoat in vivo* ebenso gut inseriert wie der Wildtyp (Spann, 2017). Mithilfe von AMS-Experimenten wurde außerdem gezeigt, dass auch das *C-tail-anchored* Proteins SciP von YidC 5S inseriert wird (unveröffentlichte Daten von Eva Pross, Arbeitsgruppe A. Kuhn, Universität Hohenheim). Übereinstimmend damit inhibierten die Mutationen von YidC 5S in der Insertionsstudie dieser Arbeit den Einbau von Pf3 *coat* in Proteoliposomen im Vergleich zu wildtypischem YidC nicht (Abbildung 55B). Sowohl M13 *procoat* (Samuelson *et al.*, 2000; Stiegler *et al.*, 2011) als auch SciP (Aschtgen *et al.*, 2012; Pross *et al.*, 2016) und Pf3 *coat* (Chen *et al.*, 2002a; Serek *et al.*, 2004) werden über den YidC-*only* Weg unabhängig von SecY inseriert. Im Gegensatz dazu wurde eine Variante der Untereinheit a der F₁F₀ ATP Synthase in Zellen, die nur YidC 5S exprimierten, nicht in die Membran inseriert (unveröffentlichte Daten von Sri Shanmugam, Arbeitsgruppe R. Dalbey, Ohio State University). An den C-Terminus dieser Variante der Untereinheit a wurde die P2 Domäne der Leaderpeptidase kloniert. Die Membraninsertion der Untereinheit a-P2 wurde zuvor als SecY/YidC-abhängig beschrieben (Yi *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Unfähigkeit der YidC 5S Mutante, den Depletionsstamm zu retten, auf die gestörte SecY-abhängige YidC-Funktion zurückzuführen ist. Durch verschiedene FRET-Messungen wurde gezeigt, dass die Interaktion der YidC 5S Mutante mit SecY im Vergleich zum Wildtyp gestört ist. YidC 5S ist die erste bekannte YidC-Mutante, die nicht mit SecY interagiert. Die deutlich schwächere Bindungsaffinität der YidC 5S Mutante im Vergleich zum YidC WT legt nahe, dass die Positionen 430 und 435 in der Transmembrandomänen 3 sowie die Position 468 in der Transmembrandomäne 4 und die Positionen 505 und 509 in der Transmembrandomäne 5 eine wichtige Rolle für die Interaktion mit SecY und dadurch für die

SecY/YidC-abhängige Insertion spielen. Auch hier waren die Substrat-bindenden TM3 und 5, die eine hydrophobe Substrat-Rutsche darstellen (Klenner & Kuhn, 2012), beteiligt. Dies deckt sich mit den *Cross-Linking* Experimenten dieser Arbeit. Das durch die *Cross-Links* erstellte Kontaktmodell (Abbildung 59) steht somit auch im Einklang mit den Ergebnissen der FRET-Messungen mit der 5S-Mutante. In der oben bereits erwähnten Studie von Petriman *et al.* (2018) konnte ebenfalls ein SecY-Kontakt mit der YidC-TM3 (Position 431) und ein schwacher Kontakt mit der YidC-TM5 (Position 504) gefunden werden. Die dort gefundenen Kontakte liegen direkt neben zwei der Positionen der YidC 5S Mutante.

Die Fähigkeit der YidC 5S Mutante, Pf3 *coat* in Proteoliposomen zu inserieren (3.5.4), wirft weitere Fragen auf. Vier der fünf Serin-Positionen dieser Mutante, nämlich 430 und 435 der TM3, 468 der TM4 und 505 der TM5, sind gleichzeitig Kontaktstellen zwischen der hydrophoben Rutsche von YidC und Pf3 *coat* (Klenner & Kuhn, 2012). Serin ist polar und ersetzt die hydrophoben Aminosäuren Methionin (430), Alanin (435), Prolin (468) und Phenylalanin (505). Daher ist es überraschend, dass die YidC Mutante das Substrat ebenso gut wie wildtypisches YidC inserieren konnte, obwohl einige der Substrat-Kontaktstellen betroffen sind. Die betroffenen Positionen liegen in der Mitte (430) bzw. auf der periplasmatischen Hälfte (435, 468, 505) der Membran. Betrachtet man das Insertionsmodell von Pf3 *coat* (Abbildung 10), stellt man fest, dass die Insertion vermutlich auf der cytoplasmatischen Seite der hydrophoben Rutsche beginnt und die Substrat-TM dann erst weiter nach oben Richtung Periplasma rutscht. Die Disulfid-*Cross-Linking* Experimente von Klenner & Kuhn (2012) und neuere Ergebnisse von He *et al.* (2020) unterstützen dies. Diese ersten kontaktierten Positionen der hydrophoben Rutsche sind bei der YidC 5S Mutante nicht betroffen und könnten eventuell ausreichen, um die Insertion in Gang zu bringen. In einer früheren Studie mit Serin-Mutationen in TM-Helices von YidC wurde gezeigt, dass die meisten Einzelerin-Mutanten und Mutanten mit wenigen Serin-Substitutionen funktional sind, so zum Beispiel die YidC-Mutante S426-430 und S435. Erst wenn mehrere Positionen durch Serin substituiert wurden, zeigten Zellen, die diese YidC-Mutanten exprimierten, einen Wachstumsdefekt. Dies lässt darauf schließen, dass ein Minimum an Hydrophobizität für die intakte YidC-Funktionalität nötig ist (Jiang *et al.*, 2003). Klenner & Kuhn (2012) kombinierten verschiedene Serin-Mutationen an Positionen, die mit Pf3 *coat* in Kontakt stehen. Wurden alle neun Pf3 *coat*-Kontaktpositionen (424, 427, 430, 435, 468, 476, 502, 505, 508) durch Serin ersetzt,

komplementierte die Mutante die YidC-Funktion nicht. Wurden die Positionen anstatt durch das polare Serin mit der hydrophoben Aminosäure Alanin ersetzt, beeinträchtigte dies die YidC-Funktion nicht. Damit wurde gezeigt, dass nicht die einzelnen Aminosäuren, sondern deren summarisch hydrophobe Eigenschaft an den Positionen ausschlaggebend sind. Wurden entweder nur die Positionen in der Mitte und der periplasmatischen Hälfte der Membran (6S: 430, 435, 468, 502, 505, 508) oder nur in der Mitte und der cytoplasmatischen Hälfte (7S: 424, 427, 430, 468, 476, 502, 505) mutiert, blieb die YidC-Funktion erhalten. Die Fähigkeit von YidC, Substrate zu inserieren, scheint also nur dann beeinträchtigt zu sein, wenn mehrere Kontaktpositionen über die gesamte Membranbreite ausgetauscht sind und ein Minimum an Hydrophobizität unterschritten ist. Die YidC 5S Mutante unterscheidet sich von der 6S-Mutante darin, dass die letzte Serin-Substitution an Position 509 und nicht an der Substrat-Kontaktposition 508 liegt. Außerdem ist Position 502 bei YidC 5S nicht substituiert. Insgesamt sind bei YidC 5S also zwei Pf3 *coat* Kontaktpositionen weniger betroffen als bei der funktionellen 6S-Mutante. Damit steht die Funktionalität der YidC 5S Mutanten bezüglich der Insertion der YidC-*only* Substrate in Einklang mit der Funktionalität der 6S-Mutante. Im Gegensatz zur 6S Mutante konnte die 5S Mutante die YidC-Funktion aber nicht komplett übernehmen und führte zu einem Wachstumsdefekt, vermutlich wegen des oben genannten Verlusts der Interaktion mit SecY und der damit einhergehenden gestörten SecY/YidC-abhängigen Insertion. Dies deutet darauf hin, dass die Serin-Substitutionen an den Positionen 430, 435, 468 und 505, welche beide Mutanten 5S und 6S aufweisen, nicht ausreichen, um die SecY-Interaktion bis zu einem Verlust der SecY/YidC-abhängigen Insertion zu beeinträchtigen. Erst die Substitution einer weiteren Aminosäure an Position 509 führt zum Verlust der SecY/YidC-Interaktion. Vermutlich wird nicht eine einzelne Position (509) allein für die gestörte Interaktion verantwortlich sein, sondern vielmehr das Zusammenspiel mehrerer SecY-Kontaktpositionen. Wie bei dem erforderlichen Minimum an Hydrophobizität für die YidC-*only* Insertion könnte es auch ein Minimum an Kontaktstellen mit SecY für eine erfolgreiche kooperative Insertion geben. Interessant wäre die Untersuchung bezüglich der Komplementation und SecY-Interaktion einer 4S-Mutante, die Serin-Substitutionen an den Positionen 430, 435, 468 und 505 aufweist, nicht aber an Position 509.

4.2.3 Das Kontaktmodell der SecY/YidC-Interaktion

Der Kontakt des SecY *lateral gates* mit der hydrophoben Rutsche von YidC wurde bereits in unterschiedlichen Studien vermutet. Einige Substrate wie die Leader Peptidase (Houben *et al.*,

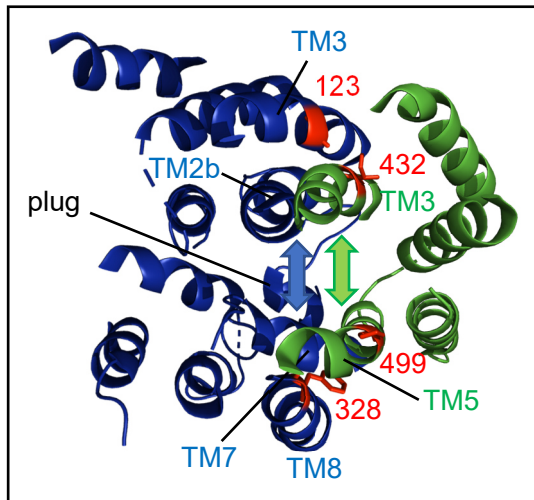


Abbildung 59: Das SecY *lateral gate* interagiert mit der hydrophoben Substratrutsche von YidC. Im Kontaktmodell sind nur die transmembranen Bereiche von SecY (blau) und YidC (grün) dargestellt (cytoplasmatische Ansicht). Die Pfeile zeigen das *lateral gate* bzw. die Lücke zwischen den TM der hydrophoben Rutsche an. Rot dargestellt sind zwei SecY/YidC-Kontakte auf beiden Seiten des *lateral gates*. (kombinierte Kristallstrukturen: SecY: PDB 3J01/Frauenfeld *et al.*, 2011; YidC: PDB 3WVF/Kumazaki *et al.*, 2014b)

2002 und 2004) und FtsQ (Urbanus *et al.*, 2001) stehen sowohl mit SecY als auch mit YidC in Kontakt und legen diese Art der Interaktion nahe. Bei *Cross-Link*-Studien konnten verschiedene SecY/YidC-Interaktionen gezeigt werden. Für Positionen auf der Rückseite von SecY zwischen TM5 und 6 konnten aber keine Kontakte mit YidC gezeigt werden, was ebenso dafür spricht, dass YidC spezifisch am *lateral gate* bindet (Petriman *et al.*, 2018; Sachelaru *et al.*, 2013 und 2017). In der Struktur des Holotranslokons ist zudem zu sehen, dass sich YidC in der Nähe des *lateral gates* befindet, die Auflösung ist aber zu gering (14 Å), um Details zu erkennen (Botte *et al.*, 2016).

Mithilfe der in dieser Arbeit *in vivo* ermittelten direkten Kontakte zwischen SecY und YidC konnte ein Kontaktmodell erstellt werden (Abbildung 59, cytoplasmatische Ansicht), das sich auch mit den

Ergebnissen der FRET-Messungen mit der YidC 5S Mutante deckt. Die in den FRET-Messungen bestimmte Stöchiometrie von eins spiegelt sich in diesem Kontaktmodell ebenfalls wider. Es ist noch einmal anzumerken, dass Kristallstrukturen nur Momentaufnahmen sind und die Konformation der Proteine von deren Bindepartnern und den daraus resultierenden Zuständen abhängig ist. *In vivo* kommt es während des Insertionsvorgangs zu verschiedenen SecY-Konformationsänderungen, an denen unter anderem die *plug*-Helix 2a und vor allem die Helices des *lateral gates* beteiligt sind (1.1.2). Die hier verwendete Struktur von Frauenfeld *et al.* (2011) zeigt SecY gebunden an ein RNC (RNC in der Abbildung nicht dargestellt). Auch YidC ist ein dynamisches und flexibles Protein (Hennon & Dalbey, 2014). Ausgelöst durch das Binden von Substraten kommt es ebenfalls zu Konformationsänderungen (Kedrov *et al.*, 2016;

Imhof et al, 2011; Winterfeld *et al.*, 2009). Die für das Kontaktmodell verwendete YidC-Struktur entstand ohne die Bindung eines Substrats (Kumazaki *et al.*, 2014b). Das Kontaktmodell stellt damit nur einen von vielen möglichen Zuständen der SecY/YidC-Interaktion dar. In dem Modell steht das SecY *lateral gate* (Abbildung 59; blauer Pfeil) der hydrophoben Substrat-Rutsche und der sich zwischen TM3 und 5 öffnenden hydrophilen Tasche (Abbildung 59; grüner Pfeil) von YidC gegenüber. SecYEG und YidC bilden ein Heterotetramer, in dem die Pore von SecY und die hydrophile Tasche von YidC eine gemeinsame Pore bilden. In einer früheren Studie von Sachelaru *et al.* (2017) wurde bereits vermutet, dass YidC Teil des Kanals sein könnte. Der Kontakt des *lateral gates* mit der hydrophoben Rutsche liefert einen weiteren wichtigen Hinweis, wie die SecY/YidC-abhängige Insertion ablaufen könnte. Eine kooperative Insertion über den SecY/YidC-Komplex könnte wie folgt aussehen. YidC-TM3- und 5 binden an das *lateral gate* von SecY. Studien von Sachelaru *et al.* (2017) und Petriman *et al.* (2018) zeigten, dass die TM1 von YidC nicht nur an die äußeren Bereiche des *lateral gates*, sondern auch an dessen Inneres bindet. Durch die Bindung von RNCs an den Komplex (Kater *et al.*, 2019; Park *et al.*, 2014; Sachelaru *et al.*, 2013) und der N-terminalen Signalsequenz an das *lateral gate* (Ge *et al.*, 2014; Egea & Stroud, 2010; Hizlan *et al.*, 2012; Jomaa *et al.*, 2016) kommt es zu Konformationsänderungen innerhalb des SecY/YidC-Komplex, wodurch unter anderem das *lateral gate* geöffnet wird. YidC verliert dann den Kontakt im Inneren des *lateral gates* und verlagert sich mehr in Richtung dessen Rand (Sachelaru *et al.*, 2017). Dadurch würde eine vergrößerte gemeinsame SecYEG-YidC-Pore entstehen. Gemäß diesem Modell wird das Substratprotein durch diese Pore transloziert, wobei transmembrane Segmente durch das *lateral gate* (Frauenfeld *et al.*, 2011; van den Berg *et al.*, 2004) an die hydrophobe Rutsche übergeben werden. An der SecY/YidC-Schnittstelle konnte eine Lipid-gefüllte Kavität gezeigt werden, die dafür eine hydrophobe Umgebung für die Substrat-TM bereitstellt (Komar *et al.*, 2016). YidC erleichtert dann die Insertion der hydrophoben TM in die Membran und deren Faltung. Dabei kann YidC eine Chaperon-Aufgabe erfüllen, das heißt die Substrat-TM von SecY lateral übernehmen und die korrekte Faltung unterstützen ohne an der direkten Insertion beteiligt zu sein. Dies ist zum Beispiel bei MalF (Wagner *et al.*, 2008a) und LacY (Nagamori *et al.*, 2004; Serdiuk *et al.*, 2016, 2017 und 2019; Zhu *et al.*, 2013b) der Fall. Es sind aber auch Substrate bekannt, deren Insertion ohne YidC nicht oder nicht vollständig erfolgt und die somit die Insertase-Funktion von YidC in Anspruch nehmen. In diesen Fällen könnten die gemeinsame SecYEG-YidC-Pore und die hydrophile

Tasche von YidC ebenfalls eine Rolle spielen. Bei anderen Substraten, wie dem zweispännigen CyoA, wird nur eine Region von SecY in die Membran inseriert, eine andere Domäne desselben Substrats nur von YidC (Celebi *et al.*, 2006; van Bloois *et al.*, 2006).

Um den Mechanismus der kooperativen Membraninsertion besser zu verstehen, wären hochauflösende Kristallstrukturen des SecY/YidC-Komplexes mit verschiedenen weiteren Bindepartnern in unterschiedlichen Zuständen interessant.

4.3 *In vitro* Translokation und Insertion von SecY- und YidC-abhängigen Substraten

4.3.1 *In vitro* Experimente mit DOPC-Proteoliposomen

Die Translokations- und Insertionsstudien wurden in DOPC-Proteoliposomen (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin) durchgeführt. Die Phospholipide der *E. coli* Membran setzen sich eigentlich aus 75-80 % Phosphatidylethanolamin (PE), 20 % Phosphatidylglycerol (PG) und 5 % Cardiolipin (CL; Diphosphatidylglycerol) zusammen (Raetz & Dowhan, 1990). DOPC zeigt aber deutlich weniger Eigenfluoreszenz und ergibt somit weniger Hintergrund bei den Fluoreszenzmessungen als PE und PG.

PE ist ein sogenanntes *non-Bilayer*-Lipid. *Non-Bilayer*-Lipide besitzen eine im Vergleich zu ihren Acylketten kleinere Kopfgruppe als *Bilayer*-Lipide. Dadurch haben sie die Form eines Kegels.

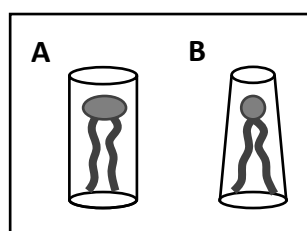


Abbildung 60: (A) *Bilayer*-Lipide mit größeren Kopfgruppen weisen eine zylindrische Form auf. (B) *Non-Bilayer*-Lipide mit kleineren Kopfgruppen zeigen die Form eines Kegels.

Bilayer-Lipide, zu denen DOPC gehört, weisen dagegen durch ihre im Verhältnis größere Kopfgruppe eine zylindrische Form auf (Abbildung 60). Durch die Anwesenheit von *non-Bilayer*-Lipiden in Lipiddoppelschichten wird deren Eigenschaft beeinflusst. Der laterale Druck im Inneren der Doppelschicht ist erhöht und im äußeren Bereich herabgesetzt. Dies steht im Zusammenhang mit den Konformationsänderungen von Membranproteinen und damit deren Funktion. Unter anderem für SecYEG wurde gezeigt, dass *non-Bilayer*-Lipide die Aktivität stimulieren (van Dalen & de Kruijff, 2004; van den Brink-van der Laan *et al.*, 2004). Außerdem wird

davon ausgegangen, dass die geringere Dichte der Kopfgruppen die Insertion von Membranproteinen begünstigt. Am Beispiel der katalytischen Domäne der Signalpeptidase

wurde gezeigt, dass die Membranbindung bei PE und anderen *non-Bilayer*-Lipiden höher ist als bei DOPC (van den Brink-van der Laan *et al.*, 2001). *In vivo* ist PE zwar nicht essentiell für die Protein-Translokation, *in vitro* zeigte sich aber, dass diese in Abwesenheit von PE verlangsamt ist (van Dalen & de Kruijff, 2004). Die Ergebnisse der Insertions- und Translokationsexperimente (Abbildung 55) zeigen, dass diese auch in reinen DOPC-Proteoliposomen ohne *non-Bilayer*-Lipide erfolgreich sind. Die Effizienz könnte eventuell durch Beimischen von PE zu den Proteoliposomen erhöht werden.

Auch bezüglich ihrer Ladung unterscheiden sich Lipide voneinander. PE ist ein zwitterionisches Lipid, das bei physiologischem pH keine Nettoladung besitzt. Negativ geladen sind dagegen PG und CL (Nelson & Cox, 2011b; van Dalen & de Kruijff, 2004). Außerdem ist die Phosphatgruppe bei allen Lipiden negativ geladen. Dass anionische Lipide wichtig für die Translokation sind, wurde *in vivo* und *in vitro* gezeigt. In diesen Studien war die Translokationsrate der OM-Proteine OmpA und PhoE in Abwesenheit von PG deutlich herabgesetzt (de Vrije *et al.*, 1988; Kusters *et al.*, 1991). Der Bedarf von negativ geladenen Lipiden hat mehrere Ursachen. Eine davon ist die Interaktion der anionischen Lipide mit dem positiv geladenen N-Terminus von SecA. Das Binden von SecA an die Lipide stimuliert die ATPase-Aktivität (Lill *et al.*, 1990). Zudem wird die SecA-SecY-Bindung beeinflusst (Koch *et al.*, 2019; Ryabichko *et al.*, 2020) und das SecYEG-Dimer vor allem durch CL, aber auch durch PG stabilisiert (Gold *et al.*, 2010; Ryabichko *et al.*, 2020). Eine weitere Erklärung für die Notwendigkeit von negativ geladenen Lipiden ist, dass in vielen Fällen das positiv geladene Signalpeptid über elektrostatische Wechselwirkungen zu Beginn der Translokation an die Membran bindet. Da auch im *lateral gate* anionische Lipide zu finden sind, könnten diese über eine Interaktion mit den positiv geladenen Resten des Signalpeptids dazu beitragen, dieses richtig zu positionieren und zu stabilisieren (Koch *et al.*, 2019). Experimente mit PhoE zeigten eine von den negativ geladenen Lipiden abhängige Insertion des Signalpeptids in die Membran. Zusätzlich zu der elektrostatischen wird aber eine hydrophobe Bindung vorgeschlagen (Batenburg *et al.*, 1988). Gallusser & Kuhn (1990) konnten zeigen, dass positiv geladene Reste am N- und C-Terminus des Membranproteins M13 *procoat* essentiell für die Bindung an die Membran sind und die Interaktion zwischen Präprotein und negativ geladenen Lipiden vermutlich an der Translokation beteiligt ist. Auch für das spontan inserierende Membranprotein KcsA wurde die Wichtigkeit der elektrostatischen Interaktion zwischen Membran und Protein nachgewiesen (Altrichter & Haase *et al.*, 2017). Zudem könnten

anionische Lipide zur *positive inside* Topologie beitragen, indem sie positive Reste auf der cytoplasmatischen Membranseite festhalten (van Klompenburg, 1997). So zeigt zum Beispiel Pf3 *coat* eine *N-out-C-in* Topologie mit einem negativ geladenen Rest im N-terminalen und zwei positiv geladenen Resten im C-terminalen Segment. Durch Vertauschen der Ladungen an N- und C-Terminus wird Pf3 *coat* in der umgekehrten Orientierung inseriert (Kiefer *et al.*, 1997). Die verwendeten DOPC-Lipide sind wie PE zwitterionische Lipide und damit neutral, je nach pH-Wert aber geladen. In den verwendeten basischen Puffern ist die Netto-Ladung von DOPC ebenfalls negativ. Vermutlich trägt dies dazu bei, dass die *in vitro* Insertions- und Translokationsstudien dieser Arbeit auch mit DOPC-Proteoliposomen erfolgreich waren. Für Pf3 *coat* wurde die *in vitro* Insertion in DOPC-Proteoliposomen bereits in früheren Studien gezeigt (Ernst *et al.*, 2011; Winterfeld *et al.*, 2013). Eventuell könnte die Insertionseffizienz durch das Hinzufügen von negativ-geladenen Lipiden in den Proteoliposomen gesteigert werden, wie es für KcsA gezeigt wurde (Altrichter & Haase *et al.*, 2017).

4.3.2 *In vitro* Translokation und Insertion von proPhoA und Pf3 *coat*

In den *in vitro* Translokations- und Insertionsstudien konnte die Funktionalität der SecY- und YidC-Proteoliposomen gezeigt werden. Das SecY-abhängige/YidC-unabhängige Fragment 1-221 des Präproteins proPhoA der periplasmatischen Alkalischen Phosphatase PhoA (Gouridis *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013) konnte in alle SecYEG-haltigen Proteoliposomen transloziert werden (Abbildung 55A). In dem *in vitro* Versuchsaufbau waren außer SecY und YidC keine weiteren Komponenten des Translokationsapparats anwesend. Für eine erfolgreiche Translokation sind einige Konformationsänderungen innerhalb von SecY erforderlich. Die *plug*-Helix, die den Kanal verschließt, muss diesen freigeben. Zudem müssen der hydrophobe Ring und das *lateral gate* geöffnet werden (du Plessis *et al.*, 2009; van den Berg *et al.*, 2004). Diese Konformationsänderungen werden unter anderem durch das Binden der Signalsequenz an das *lateral gate* verursacht (Ge *et al.*, 2014; Hizlan *et al.*, 2012). Es gibt Hinweise darauf, dass SecA auch an der Öffnung des SecY *lateral gates* beteiligt ist (Allen *et al.*, 2016; Zimmer *et al.*, 2008). Die Beteiligung von SecA an der Öffnung scheint aber nicht zwingend erforderlich zu sein (Hizlan *et al.*, 2012). Die posttranslationale Translokation von proPhoA ist zwar eigentlich abhängig von SecA (Gouridis *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013), trotzdem konnte proPhoA transloziert werden, da hier eine verkürzte, nicht mehr von SecA-

abhängige proPhoA-Version verwendet wurde (unveröffentlichte Daten von Isabel Ernst, Arbeitsgruppe A. Kuhn, Universität Hohenheim; Gouridis *et al.*, 2010).

Das Hüllprotein (*coat protein*) des Bakteriophagen Pf3 ist YidC-abhängig (Chen *et al.*, 2002a; Rohrer & Kuhn, 1990; Serek *et al.*, 2004) und wurde in alle Proteoliposomen, die YidC enthielten, erfolgreich inseriert (Abbildung 55B). Pf3 *coat* besitzt eine TM mit einer *N-out-C-in* Topologie (Ernst *et al.*, 2011; Welsh *et al.*, 1998) und ist damit ein typisches YidC-only Substrat. YidC kann ein- und zweispännige Membranproteine mit kleinen periplasmatischen Domänen selbstständig inserieren (Dalbey *et al.*, 2014; Kuhn, 1988; Wickström *et al.*, 2011). Neben Pf3 *coat* gehören unter anderem auch das Hüllprotein des M13-Phagen (Samuelson *et al.*, 2000), die Untereinheit c der ATP Synthase (van der Laan *et al.*, 2004b; Yi *et al.*, 2003), der mechanosensitive Kanal Mscl (Facey *et al.*, 2007) oder das *C-tail-anchored* Protein SciP (Pross *et al.*, 2016) zu den YidC-only Substraten.

Pf3 *coat* als Sec-unabhängiges Substrat benötigt für seine Insertion keine Komponenten des Sec-Apparats und interagiert nur dann mit SRP, wenn die C-terminale Region verlängert ist (Chen *et al.*, 2002a). Pf3 *coat* konnte inseriert werden, ohne dass SRP im Versuchsaufbau anwesend war. Dies war auch bei anderen *in vitro* Insertionsstudien der Fall (Ernst *et al.*, 2011; Winterfeld *et al.*, 2013). Elektrostatische Anziehungskräfte zwischen dem positiv geladenen C-Terminus (Lysin) von Pf3 *coat* und den negativ-geladenen Lipiden könnten dabei eine Rolle spielen. Eine Interaktion zwischen positiv geladenen Aminosäuren der Substrate und anionischen Lipiden wurde wie bereits oben beschrieben zum Beispiel für M13 *procoat* (Gallusser & Kuhn, 1990) und KcsA (Altrichter & Haase *et al.*, 2017) gezeigt. Außerdem bindet Pf3 *coat* nicht nur an die Lipide, sondern auch an den cytoplasmatischen Bereich von YidC selbst (Winterfeld *et al.*, 2013). Bei der Pf3 *coat*-Insertion wird von einer posttranslationalen Insertion ausgegangen (Robinson & Woolhead, 2013), was der Situation der *in vitro* Experimente entsprach.

Einigen *in vivo* Studien bzw. Experimenten mit INVs (*inner membrane vesicles*) zufolge ist für die Translokation des hydrophilen N-Terminus von Pf3 *coat* mit zwei negativ geladenen Aminosäuren (Asp) ein Membranpotential nötig (He *et al.*, 2020; Kiefer *et al.*, 1997; Kiefer & Kuhn, 1999; Rohrer & Kuhn, 1990). Bei den *in vitro* Insertionsversuchen dieser Arbeit war kein Membranpotential vorhanden. Trotzdem konnte eine Insertion von Pf3 *coat* in die YidC-Proteoliposomen gezeigt werden. Auch andere Pf3-Insertionsstudien mit gereinigtem

rekonstituiertem YidC waren erfolgreich und zeigten keine signifikanten Unterschiede in An- und Abwesenheit eines Membranpotentials (Ernst *et al.*, 2011; Serek *et al.*, 2004). Dies lässt darauf schließen, dass die Insertion von Pf3 *coat in vitro* unabhängig von einem Membranpotential ist. Ähnlich ist es bei einer Sec-abhängigen Translokation. Auch hier ist ein Membranpotential *in vitro* nicht nötig (Basilana & Wickner, 1993). Im Falle der Sec-abhängigen Translokation wurde aber auch gezeigt, dass SecG die Translokation in rekonstituierte Proteoliposomen um etwa das 20-fache stimuliert (Hanada *et al.*, 1994; Nishiyama *et al.*, 1993). In Abwesenheit der PMF ist die Translokation sogar abhängig von SecG. Möglicherweise kann die Abwesenheit des Membranpotentials, das durch die PMF erzeugt wird, durch die Anwesenheit von SecG zumindest teilweise kompensiert werden (Hanada *et al.*, 1996).

Die im ersten Moment überraschende Fähigkeit der YidC 5S Mutante, ein YidC-*only* Substrat trotz substituierter Pf3 *coat*-Kontaktpositionen zu inserieren, wurde in 4.2.2 bereits diskutiert. Um auch die gestörte Sec-abhängige Funktion der YidC 5S Mutante in den Insertionsexperimenten zu überprüfen, wäre an dieser Stelle die Insertion eines Sec/YidC-abhängigen Substrats interessant. Hier käme möglicherweise das M13-Phagenprotein pre-g3p in Frage (unveröffentlichte Daten von Farina Kleinbeck, Arbeitsgruppe A. Kuhn, Universität Hohenheim), wobei pre-g3p abhängig von SecA ist und durch hohe Konzentrationen von Urea oder SecB vor der Faltung geschützt werden müsste. Eine andere Möglichkeit wäre eine Variante des YidC-abhängigen Proteins SciP, das durch einen um 21 Aminosäuren verlängerten C-Terminus auch SecYEG für seine Insertion benötigt (Pross *et al.*, 2016), oder eine MscL-Mutante, die durch Änderung der Ladung in der periplasmatischen Domäne zusätzlich zu YidC auch SecY-abhängig ist (Neugebauer *et al.*, 2012). Außerdem könnte die Insertion von CyoA interessant sein. PreCyoA besitzt als Signalsequenz eine weitere N-terminale TM. Diese Signal-TM und die erste TM des maturen Proteins werden nur in Abhängigkeit von YidC, das heißt unabhängig von SecY, inseriert. Die Insertion der C-terminalen TM erfolgt dagegen unabhängig von YidC durch SecY und nur, wenn zuvor die TM1 inseriert wurde (Celebi *et al.*, 2006; van Bloois *et al.*, 2006). Für die Insertion der beiden Domänen durch YidC bzw. SecYEG könnte daher ein direkter Kontakt zwischen SecY und YidC nicht unbedingt nötig sein und CyoA trotz seiner Abhängigkeit von SecY und YidC möglicherweise auch von der YidC 5S Mutante inseriert werden. Im Vergleich dazu ist bei dem SecY- und YidC abhängigen Substrat LacY YidC nicht für die Insertion selbst, sondern nur für die Faltung notwendig (Nagamori *et al.*, 2004;

Serdiuk *et al.*, 2016, 2017 und 2019; Zhu *et al.*, 2013b). Das lässt vermuten, dass in diesem Fall der direkte SecY/YidC-Kontakt für die Übernahme des Substrats durch YidC vom SecY *lateral gate* essentiell ist. Dafür spricht eine *in vitro* Studie mit Oxa1, das wie YidC 5S nicht mit SecY interagiert und die YidC-Funktion nur von Sec-unabhängigen Substraten, nicht aber im Falle von LacY übernehmen kann (van Bloois *et al.*, 2005). In Einzelmolekül-Kraftspektroskopie-Experimenten konnte allerdings gezeigt werden, dass *in vitro* sowohl SecYEG als auch YidC allein für die Insertion und Faltung von LacY ausreicht. In Anwesenheit von SecYEG übernimmt dieses aber die Führung und YidC ist dann vermutlich nur noch für die Faltung zuständig (Serdiuk *et al.*, 2019; 4.4). Es wäre also interessant zu wissen, ob YidC 5S in SecY/YidC-Proteoliposomen funktional für die LacY-Insertion ist.

4.3.3 Das SecY-YidC-Fusionsprotein inseriert und transloziert YidC- und SecY-abhängige Substrate

Um sicherzustellen, dass die beiden Proteine *in vitro* in der richtigen Orientierung und in unmittelbarer Nähe zueinander sowie der Stöchiometrie von eins vorliegen, wurde das Fusionsprotein SecY-YidC kloniert. Über Komplementationstests konnte gezeigt werden, dass das Fusionsprotein sowohl die SecY- als auch die YidC-Funktion übernehmen kann (Abbildung 46). Am Beispiel des Substrats Pf3 *coat* wurde die erfolgreiche YidC-abhängige Insertion durch das Fusionsprotein gezeigt. (Abbildung 55B). Die SecY-abhängige Translokation des Substrats proPhoA durch das Fusionsprotein konnte ebenfalls beobachtet werden (Abbildung 55A). Die unabhängige Funktion von SecY bzw. YidC war bei dem Fusionsprotein vergleichbar mit den einzelnen Proteinen. Die Funktionalität des Fusionsproteins bezüglich der kooperativen Insertion wurde im Rahmen von Einzelmolekül-Kraftspektroskopie-Experimenten an der ETH Zürich für das SecY/YidC-abhängige LacY gezeigt. In der Linker-Sequenz zwischen SecY und YidC befindet sich eine PreScission Protease Schnittstelle. Der Vergleich des LacY-Insertionsmusters des Fusionsproteins, das mit der PreScission Protease geschnittenen wurde, mit dem ungeschnittenen Protein zeigt, dass die Fusion von SecY und YidC keinen negativen Einfluss auf die Insertase-Funktion hat (Serdiuk *et al.*, 2019).

4.4 Die Insertion und Faltung von LacY wird von SecYEG dominiert

Über AFM- (*atomic force microscopy*, Raster-Kraft-Mikroskopie) basierte Einzelmolekül-Kraftspektroskopie (*single-molecule force spectroscopy*, SMFS) wurde untersucht, wie SecY und YidC, einzeln oder in Kooperation, und das SecY-YidC-Fusionsprotein die Lactose-Permease (LacY) inserieren und falten (Serdiuk *et al.*, 2019). Für diese gemeinsame Studie mit der ETH Zürich wurden Proteoliposomen, die gereinigtes Fusionsprotein, SecYEG, YidC oder SecYEG und YidC enthielten, von mir in Hohenheim hergestellt. Die AFM-basierte Einzelmolekül-Kraftspektroskopie wurde anschließend von einer Arbeitsgruppe der ETH Zürich durchgeführt. Bei dieser Methode wird der C-Terminus von LacY, welches mit einer Phospholipid-Membran rekonstituiert wurde, durch Adhäsion an die Spitze der AFM-Blattfeder (*Cantilever*) gebunden (Abbildung 61). Der C-Terminus ist dafür durch eine polyGly(36)-Sequenz verlängert. Durch Zurückziehen des *Cantilevers* wird LacY, welches zwölf TM besitzt, entfaltet und aus der Membran gezogen. Dabei wird die Biegung der Blattfeder in Abhängigkeit von der Entfernung der *Cantilever*-Spitze zur Membran aufgenommen und als Kraft-Abstand-Kurve dargestellt. Die Kraft-Abstand-Kurve ergibt ein charakteristisches Spektrum, das das schrittweise Entfalten von LacY zeigt. Jeder Peak stellt einen Entfaltungsschritt eines strukturellen LacY-Segments dar (Serdiuk *et al.*, 2017). Dieses Spektrum verhält sich wie ein Fingerabdruck für korrekt gefaltetes LacY. Ist LacY nicht korrekt gefaltet, ändert sich das Muster (Serdiuk *et al.*, 2016). Das entfaltete LacY wird dann von der Donor-Membran zu einer Ziel-Membran mit integriertem SecY, YidC oder SecY und YidC gebracht. Bei der cotranslationalen Insertion verlässt der N-Terminus des Substrats das Ribosom. Aus diesem Grund wird der N-Terminus von LacY nahe (5-10 nm) an die Ziel-Membranoberfläche gebracht. Nach fünf Sekunden wird erneut ein Kraft-Abstand-Spektrum aufgenommen. Der Vergleich mit dem charakteristischen 'Fingerabdruck'-Spektrum zeigt, ob LacY korrekt inseriert und gefaltet wurde. Wird das Spektrum zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Aufbringen von LacY auf die Ziel-Membran aufgenommen, nimmt die Anzahl der Peaks und damit der inserierten Segmente mit der Zeit zu. Die Reihenfolge, in der die Peaks erscheinen, zeigt an in welcher Reihenfolge die TM inseriert werden (Serdiuk *et al.*, 2017).

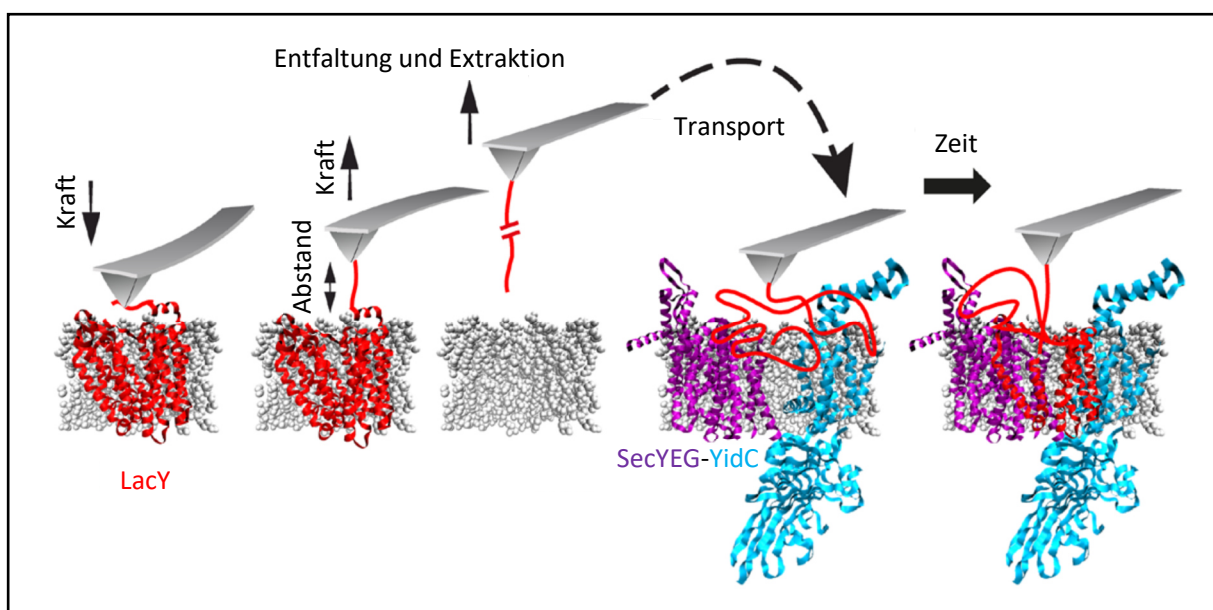


Abbildung 61: AFM-basierte Einzelmolekül-Kraftspektroskopie für Insertions- und Faltungsstudien. Die Spitze des *Cantilevers* bindet den C-Terminus von LacY und zieht daran. Dadurch wird LacY aus der Membran gezogen und entfaltet. Die dafür aufgewendete Kraft wird in Abhängigkeit vom Abstand, den sich der *Cantilever* von der Membran zurückgezogen hat, gemessen und ergibt ein charakteristisches Spektrum. Das entfaltete LacY wird auf eine Membran transferiert, die zum Beispiel SecY-YidC enthält. Nach einer definierten Zeit wird erneut das Kraft-Abstand-Spektrum aufgenommen, um durch den Vergleich mit dem ersten Spektrum die Insertion und Faltung von LacY in die Zielmembran darzustellen. (Abbildung abgeändert aus Serdiuk *et al.*, 2019)

Serdiuk *et al.* (2019) konnten mit dieser Methode am Beispiel von LacY zum ersten Mal Schritt für Schritt beobachten, wie ein Protein in die Membran inseriert und gefaltet wird. Dabei inserierte YidC die einzelnen Segmente in zufälliger Reihenfolge; die Insertion via SecY folgte der Reihenfolge der Segmente. Überraschenderweise konnte die Insertion mit jedem Segment gestartet werden, bevorzugt wurde allerdings das C-terminale Helixbündel. Es wäre zu erwarten gewesen, dass als erstes das N-terminale Segment von LacY, das *in vivo* cotranslational inseriert, eingebaut wird. Durch den Versuchsaufbau ist die Insertion in diesem Fall aber als posttranslational zu betrachten. Lagen SecY und YidC gemeinsam in der Zielmembran vor, folgte die Insertion dem SecY-abhängigen Muster. Dies gilt auch für das in dieser Arbeit klonierte Fusionsprotein. Obwohl LacY *in vivo* von SecY und YidC abhängig ist (Nagamori *et al.*, 2004), konnte LacY in den SMFS-Versuchen aber sowohl von SecYEG als auch von YidC allein inseriert werden. Einige Membranproteine können möglicherweise den einen oder den anderen Weg in die Membran nehmen. Lagen SecY und YidC gemeinsam vor, wurde der Insertions- und Faltungsprozess von der Translokase dominiert. Dies deutet darauf hin, dass YidC *in vivo* nur eine unterstützende Rolle bei der Insertion von LacY einnimmt (Serdiuk *et al.*, 2019). Dies bestätigt die Ergebnisse weiterer Studien, die ebenfalls darauf hinweisen,

dass YidC nur für die Faltung, nicht aber für die Sec-abhängige Insertion von LacY gebraucht wird (Nagamori *et al.*, 2004; van Bloois *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2013b).

4.5 Fazit

Die Sekretion und Insertion von Proteinen in und über die Cytoplasmamembran sind essentielle Prozesse. Der wichtigste Weg hierfür führt über das konservierte Sec-Translokon unabhängig oder in Kooperation mit YidC. Das Verständnis der Insertions- und Sekretionsmechanismen von Proteinen ist auch für die Biotechnologie und medizinische Forschung und Entwicklung von großem Interesse. Medikamente sind oft auf Membranproteine ausgerichtet (Kuhn *et al.*, 2017a). Viele Virulenzfaktoren und Toxine von pathogenen Bakterien werden durch das Sec-System transportiert. Die am Transport in und über die Membran beteiligten Proteine gewannen in den letzten Jahren bei der Suche nach neuen Antibiotika an Bedeutung. Für eine therapeutische Anwendung müssen Inhibitoren aber spezifisch für die bakteriellen Komponenten sein, was durch die Homologie zu den eukaryontischen Vertretern für Schwierigkeiten sorgt. Beispielsweise inhibiert Decatransin sowohl die prokaryontische SecYEG- als auch die eukaryontische Sec61-Translokation (Junne *et al.*, 2015). Lange Zeit konzentrierte man sich daher hauptsächlich auf das Motorprotein SecA. SecA ist in prokaryontischen Zellen essentiell und konserviert, in eukaryontischen Zellen aber nicht vorhanden und bietet sich dadurch als Antibiotika-Target an. Verschiedene SecA-Inhibitoren konnten bereits identifiziert werden (Chaudhary *et al.*, 2015; de Waelheyns *et al.*, 2015; Jin *et al.*, 2018; Rao *et al.*, 2014). Ebenso wurden Antibiotika identifiziert, welche die Signalpeptidase inhibieren. Die Signalpeptidase ist ebenfalls essentiell in Bakterien und unterscheidet sich von ihren eukaryontischen Pendanten in Sequenz, Lokalisierung, Struktur und katalytischem Mechanismus (Rao *et al.*, 2014). Ob sich YidC durch seine Homologie als antibiotisches Ziel eignet, muss weiter untersucht werden. Es wurde entdeckt, dass das Herunterregulieren von YidC Bakterien gegenüber einiger Antibiotika sensibilisiert, was YidC zu einem potentiellen therapeutischen Target macht (Patil *et al.*, 2013). In einer neueren Studie wurde außerdem ein *Staphylococcus aureus* Virulenz-Inhibitor beschrieben, als dessen Ziel unter anderem YidC identifiziert wurde (Hofbauer *et al.*, 2018). Neben der Suche nach neuen Antibiotika ist eine Inhibierung der Translokation außerdem bei der Entwicklung von Medikamenten gegen Krebs interessant, da Krebszellen von einer effizienten

Proteintranslokation zur Unterstützung ihres schnellen Wachstums abhängig sind (van Puyenbroeck & Vermeire, 2018). Ein besseres Verständnis des Proteintransports kann zudem zur Verbesserung von Stämmen und Biomaterial im Rahmen der Produktion von Biopharmazeutika, industriellen Enzymen oder Biokraftstoff und weiteren industriellen Prozessen beitragen (Anné *et al.*, 2016; Karyolaimos *et al.*, 2018 und 2020). Außerdem ist zu erwarten, dass sich die in *E. coli* gewonnenen Erkenntnisse der Proteinsekretion und -insertion auf andere Prokaryonten, Archaeen sowie Eukaryonten und damit auch auf höhere Organismen übertragen lassen, da die involvierten Proteine und Prozesse konserviert sind. Neben den seit längerem bekannten und gut charakterisierten Homologen der YidC/Oxa/Alb-Familie (1.1.3) wurde kürzlich ein weiterer Insertase-Komplex im Endoplasmatischen Retikulum entdeckt und charakterisiert. Der ER-Membrankomplex (*ER membrane complex*, EMC) setzt sich je nach Organismus aus mehreren, bei Wirbeltieren zehn (EMC1-10), EMC-Untereinheiten zusammen (Wideman, 2015). Eine bioinformatische Analyse identifizierte EMC3 als Mitglied der YidC/Oxa/Alb-Insertase-Familie, welches mit drei TM eine minimalistische Version von YidC darstellt (Anghel *et al.*, 2017). Neuere Studien zeigen weitere strukturelle Ähnlichkeiten zwischen YidC und Teilen des eukaryontischen EMC (Bai *et al.*, 2020; O'Donnell *et al.*, 2020; Pleiner *et al.*, 2020). Es gibt außerdem Hinweise auf eine Kooperation von EMC mit dem Sec61-Translokon bei der Insertion von ER-Membranproteinen (Chitwood *et al.*, 2018).

Die Erkenntnisse dieser Arbeit geben weitere Einblicke in den Mechanismus der kooperativen Membraninsertion durch SecY und YidC und tragen so zum besseren Verständnis, wie hydrophobe Bereiche der Proteine in die Membran und hydrophile Bereiche über die Membran gelangen, bei. Trotz der Fortschritte auf diesem Gebiet bleibt Proteintransport ein wichtiges und herausforderndes Thema der Forschung.

ZUSAMMENFASSUNG

YidC/Oxa1/Alb3-Insertasen und das Sec-Translokon sind über alle drei Reiche des Lebens konserviert und stellen den wichtigsten Weg für integrale Proteine in Zellmembranen und Membranen von eukaryontischen Organellen dar. Die Insertion von Membranproteinen in die innere Membran von Gram-negativen Bakterien erfolgt hauptsächlich über die SecYEG-Translokase und die YidC-Insertase, die unabhängig voneinander oder in Kooperation miteinander agieren können. Für die kooperative Insertion wird ein enger Kontakt zwischen SecY und YidC vorausgesetzt. Aufgrund von früheren Interaktions-Studien und einer kürzlich gelösten Struktur des sogenannten Holotranslokons mit geringer Auflösung (14 Å) wird von einem Kontakt zwischen dem *lateral gate* von SecY und der hydrophoben Substratrutsche von YidC ausgegangen. Welche konkreten Domänen von YidC und SecY dabei direkt miteinander interagieren, war bisher nicht bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es, den Kontakt zwischen SecY und YidC detaillierter zu beschreiben. *In vitro* wurde über FRET-Messungen mit Fluoreszenzfarbstoff-markiertem SecY und YidC eine hohe Affinität für die Interaktion der beiden Proteine sowohl in Detergens als auch in DOPC-Proteoliposomen ermittelt. Für die Stöchiometrie der SecY/YidC-Interaktion wurde der Faktor eins bestimmt. Um die genauen Kontakte zwischen SecY und YidC zu identifizieren, wurden *in vivo* Disulfid-Cross-Linking-Experimente durchgeführt. Es konnten direkte Kontakte zwischen der TM3 und TM8 des SecY *lateral gates* und der TM3 beziehungsweise TM5 der hydrophoben Substratrutsche von YidC gezeigt werden. Zudem wurde eine YidC-Mutante mit fünf Serin-Substitutionen, die den Wachstumsdefekt eines YidC-Depletionsstamms nicht wiederherstellen konnte, charakterisiert. Obwohl die Serin-Positionen alle in der Mitte und der periplasmatischen Hälfte der hydrophoben Rutsche von YidC liegen und vier der Positionen mit Substrat-Kontaktstellen übereinstimmen, konnte keine Inhibierung der Insertion der YidC-abhängigen Substrate M13 *procoat* und Pf3 *coat* durch die 5S Mutante im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden. Für die YidC-*only* Insertion scheint ein Minimum an Hydrophobizität nötig zu sein, das bei dieser Mutante nicht unterschritten wird. *In vitro* FRET-Experimente zeigten eine gestörte Interaktion zwischen SecY und dieser YidC 5S Mutante und bestätigten damit erneut eine Beteiligung der hydrophoben Rutsche am SecY/YidC-Kontakt. Anhand der ermittelten *Cross-Link*-Kontakte und der Ergebnisse der FRET-Messungen konnte ein mögliches Kontaktmodell erstellt werden, in dem das SecY *lateral gate*

der hydrophoben Substrat-Rutsche und der sich zwischen TM3 und TM5 öffnenden hydrophilen Tasche von YidC gegenüber steht, wodurch sich eine gemeinsame SecY/YidC-Pore bildet. Die vorliegende Arbeit liefert damit weitere Beweise, dass das *lateral gate* der Sec-Translokase direkt mit der hydrophoben Substratrutsche von YidC interagiert.

In einem weiteren Projekt wurde ein SecY-YidC-Fusionsprotein zur Sicherstellung eines engen Kontakts, der korrekten Orientierung der Proteine zueinander und der richtigen Stöchiometrie in rekonstituierten Proteoliposomen kloniert. Für eine gemeinsame Studie mit der ETH Zürich wurden Proteoliposomen, die das Fusionsprotein, SecYEG, YidC oder SecYEG zusammen mit YidC enthielten, von mir in Hohenheim hergestellt. Die schrittweise Insertion des Sec/YidC-abhängigen Substrats LacY in diese Proteoliposomen wurde von einer Arbeitsgruppe der ETH Zürich mithilfe der AFM-basierten Einzelmolekül-Kraftspektroskopie beobachtet. Die LacY-Insertion wird im Falle des Fusionsproteins und SecYEG in Kombination mit YidC von der Sec-Translokase dominiert, während YidC vermutlich nur eine unterstützende Rolle bei der Proteinfaltung einnimmt.

SUMMARY

YidC/Oxa1/Alb3-insertases and the Sec-translocase are conserved across all three kingdoms of life and constitute the most important pathway for integral proteins into cell membranes and membranes of eukaryotic organelles. The insertion of membrane proteins into the inner membrane of Gram-negative bacteria occurs mainly via the SecYEG-translocase and the YidC-insertase acting independently or in cooperation. For the cooperative insertion a close contact between SecY and YidC is assumed. Previous interaction-studies and a recently solved low-resolution structure of the so-called holo-translocon (14 Å) indicate a contact between the lateral gate of SecY and the hydrophobic substrate slide of YidC. Which specific domains of YidC and SecY thereby interact directly with each other was unknown so far.

The aim of this study was to describe the contact between SecY and YidC in more detail. A high affinity for the interaction of the two proteins in detergent and in DOPC-proteoliposomes was determined via FRET measurements with fluorescently labeled SecY and YidC. For the stoichiometric ratio of the SecY/YidC-interaction a factor of one was calculated. To identify the specific contacts between SecY and YidC *in vivo* disulphide cross-linking experiments were performed. Direct interactions between the transmembrane domain (TM) 3 and TM8 of the SecY lateral gate and TM3 and TM5 of the hydrophobic slide of YidC were found, respectively. Furthermore, a YidC mutant with five serine substitutions, which was unable to rescue a YidC depletion strain, was investigated. Even though the serine positions are located in the middle and the periplasmic half of the hydrophobic slide of YidC and four of the positions are identical with substrate contact sites, no inhibition of insertion for the YidC-dependent substrates M13 *procoat* and Pf3 *coat* by the 5S mutant compared to the wildtype YidC was observed. For the YidC-only pathway a minimum of hydrophobicity seems to be required sufficient to allow the insertion of these substrates. *In vitro* FRET measurements showed an impaired interaction between SecY and the YidC 5S mutant and confirmed once again an involvement of the hydrophobic slide in the SecY/YidC-contact. Based on the cross-linking contacts and the results of the FRET measurements a possible model of the SecY/YidC-contact was established, which shows the SecY lateral gate vis-à-vis of the hydrophobic slide and the hydrophilic groove between TM3 and TM5 of YidC generating a combined SecY/YidC-cavity. Taken together, the present study provides further evidence that the lateral gate of the Sec-translocase directly interacts with the hydrophobic slide of YidC.

In a further project, a SecY-YidC fusion protein was cloned to ensure the two proteins are in close proximity, the correct orientation and proper stoichiometry after reconstitution into proteoliposomes. For a collaboration with the ETH Zürich, proteoliposomes hosting the fusion protein, SecYEG, YidC or SecYEG and YidC together were prepared by myself in Hohenheim. The stepwise insertion of the Sec/YidC-dependent substrate LacY into these proteoliposomes was observed by a collaborating group of the ETH Zürich using AFM-based single-molecule force spectroscopy. The insertion of LacY was observed for the different cases but for the fusion protein and SecYEG combined with YidC the insertion process is dominated by the Sec-translocase, whereas YidC probably only has a supporting function in the folding of the protein.

5 LITERATUR- VERZEICHNIS

5 LITERATURVERZEICHNIS

- Akiyama, Y., & Ito, K. (1990). SecY protein, a membrane-embedded secretion factor of *E. coli*, is cleaved by the ompT protease in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 167(2), 711–715.
- Alami, M., Dalal, K., Lelj-Garolla, B., Sligar, S. G., & Duong, F. (2007). Nanodiscs unravel the interaction between the SecYEG channel and its cytosolic partner SecA. *The EMBO Journal*, 26(8), 1995–2004.
- Allen, W. J., Corey, R. A., Oatley, P., Sessions, R. B., Baldwin, S. A., Radford, S. E., Tuma, R., & Collinson, I. (2016). Two-way communication between SecY and SecA suggests a Brownian ratchet mechanism for protein translocation. *ELife*, 5, e15598.
- Altamura, N., Capitanio, N., Bonnefoy, N., Papa, S., & Dujardin, G. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* OXA1 gene is required for the correct assembly of cytochrome c oxidase and oligomycin-sensitive ATP synthase. *FEBS Letters*, 382(1–2), 111–115.
- Altman, E., Kumamoto, C. A., & Emr, S. D. (1991). Heat-shock proteins can substitute for SecB function during protein export in *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, 10(2), 239–245.
- Altrichter, S., Haase, M., Loh, B., Kuhn, A., & Leptihn, S. (2017). Mechanism of the Spontaneous and Directional Membrane Insertion of a 2-Transmembrane Ion Channel. *ACS Chemical Biology*, 12(2), 380–388.
- Amann, E., Ochs, B., & Abel, K. (1988). Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene*, 69, 301–315.
- Andersson, H., & von Heijne, G. (1994). Membrane protein topology: effects of delta mu H⁺ on the translocation of charged residues explain the 'positive inside' rule. *The EMBO Journal*, 13(10), 2267–2272.
- Anghel, S. A., McGilvray, P. T., Hegde, R. S., & Keenan, R. J. (2017). Identification of Oxa1 Homologs Operating in the Eukaryotic Endoplasmic Reticulum. *Cell Reports*, 21(13), 3708–3716.
- Anné, J., Economou, A., & Bernaerts, K. (2016). Protein Secretion in Gram-Positive Bacteria: From Multiple Pathways to Biotechnology. In *Protein and Sugar Export and Assembly in Gram-positive Bacteria*. (Springer, 1. Auflage), 267–308.

-
- Arndt, E. (1992). The genes for ribosomal protein L15 and the protein equivalent to secY in the archaeobacterium *Haloarcula* (*Halobacterium*) *marismortui*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, *1130*(1), 113–116.
- Aschtgen, M.-S., Zoued, A., Llobès, R., Journet, L., & Cascales, E. (2012). The C-tail anchored TssL subunit, an essential protein of the enteroaggregative *Escherichia coli* Sci-1 Type VI secretion system, is inserted by YidC. *MicrobiologyOpen*, *1*(1), 71–82.
- ATTO-TEC. (2009). ATTO-TEC Fluorescent Labels and Dyes catalogue 2009/2010.
- Auer, J., Spicker, G., & Böck, A. (1991). Presence of a gene in the archaeobacterium *Methanococcus vannielii* homologous to secY of eubacteria. *Biochimie*, *73*(6), 683–688.
- Avanti Polar Lipids. (2019). <https://avantilipids.com/>
- Baba, T., Jacq, A., Brickman, E., Beckwith, J., Taura, T., Ueguchi, C., Akiyama, Y., & Ito, K. (1990). Characterization of cold-sensitive secY mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *172*(12), 7005–7010.
- Bai, L., You, Q., Feng, X., Kovach, A., & Li, H. (2020). Structure of the ER membrane complex, a transmembrane-domain insertase. *Nature*.
- Bajar, B., Wang, E., Zhang, S., Lin, M., & Chu, J. (2016). A Guide to Fluorescent Protein FRET Pairs. *Sensors*, *16*(9), 1488.
- Balzer, D., Ziegelin, G., Pansegrau, W., Kruft, V., & Lanka, E. (1992). KorB protein of promiscuous plasmid RP4 recognizes inverted sequence repetitions in regions essential for conjugative plasmid transfer. *Nucleic Acids Research*, *20*(8), 1851–1858.
- Baneyx, F., & Georgiou, G. (1990). In vivo degradation of secreted fusion proteins by the *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT. *Journal of Bacteriology*, *172*(1), 491–494.
- Basilana, M., & Wickner, W. (1993). Purified *Escherichia coli* preprotein translocase catalyzes multiple cycles of precursor protein translocation. *Biochemistry*, *32*(10), 2626–2630.
- Batenburg, A. M., Demel, R. A., Verkleij, A. J., & de Kruijff, B. (1988). Penetration of the signal sequence of *Escherichia coli* PhoE protein into phospholipid model membranes leads to lipid-specific changes in signal peptide structure and alterations of lipid organization. *Biochemistry*, *27*(15), 5678–5685.
- Bauer, B. W., Shemesh, T., Chen, Y., & Rapoport, T. A. (2014). A “Push and Slide” Mechanism Allows Sequence-Insensitive Translocation of Secretory Proteins by the SecA ATPase. *Cell*, *157*(6), 1416–1429.

- Beck, K., Wu, L.-F., Brunner, J., & Müller, M. (2000). Discrimination between SRP- and SecA/SecB-dependent substrates involves selective recognition of nascent chains by SRP and trigger factor. *The EMBO Journal*, *19*(1), 134–143.
- Beck, K., Eisner, G., Trescher, D., Dalbey, R. E., Brunner, J., & Müller, M. (2001). YidC, an assembly site for polytopic Escherichia coli membrane proteins located in immediate proximity to the SecYE translocon and lipids. *EMBO Reports*, *2*(8), 709–714.
- Bellafiore, S., Ferris, P., Naver, H., Göhre, V., & Rochaix, J.-D. (2002). Loss of Albino3 Leads to the Specific Depletion of the Light-Harvesting System. *The Plant Cell*, *14*(9), 2303–2314.
- Benz, M., Bals, T., Gügel, I. L., Piotrowski, M., Kuhn, A., Schünemann, D., Soll, J., & Ankele, E. (2009). Alb4 of Arabidopsis Promotes Assembly and Stabilization of a Non Chlorophyll-Binding Photosynthetic Complex, the CF1CF0–ATP Synthase. *Molecular Plant*, *2*(6), 1410–1424.
- Bernabeu, C., & Lake, J. A. (1982). Nascent polypeptide chains emerge from the exit domain of the large ribosomal subunit: immune mapping of the nascent chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *79*(10), 3111–3115.
- Blobel, G., & Dobberstein, B. (1975). Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *The Journal of Cell Biology*, *67*(3), 835–851.
- Bondar, A.-N., del Val, C., Freites, J. A., Tobias, D. J., & White, S. H. (2010). Dynamics of SecY Translocons with Translocation-Defective Mutations. *Structure*, *18*(7), 847–857.
- Bonnefoy, N., Chalvet, F., Hamel, P., Slonimski, P. P., & Dujardin, G. (1994). OXA1, a Saccharomyces cerevisiae Nuclear Gene whose Sequence is Conserved from Prokaryotes to Eukaryotes Controls Cytochrome Oxidase Biogenesis. *Journal of Molecular Biology*, *239*(2), 201–212.
- Borowska, M. T., Dominik, P. K., Anghel, S. A., Kossiakoff, A. A., & Keenan, R. J. (2015). A YidC-like Protein in the Archaeal Plasma Membrane. *Structure*, *23*(9), 1715–1724.
- Botte, M., Zaccai, N. R., Lycklama a Nijeholt, J. A., Martin, R., Knoops, K., Papai, G., Zou, J., Deniaud, A., Karuppasamy, M., Jiang, Q. *et al.* (2016). A central cavity within the holo-translocon suggests a mechanism for membrane protein insertion. *Scientific Reports*, *6*(1), 38399–38411.
- Boy, D., & Koch, H.-G. (2009). Visualization of distinct entities of the SecYEG translocon during translocation and integration of bacterial proteins. *Molecular Biology of the Cell*, *20*, 1804–1815.

-
- Boyd, D., & Beckwith, J. (1989). Positively charged amino acid residues can act as topogenic determinants in membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *86*(23), 9446–9450.
- Brundage, L., Hendrick, J. P., Schiebel, E., Driessen, A. J. M., & Wickner, W. (1990). The purified *E. coli* integral membrane protein SecYE is sufficient for reconstitution of SecA-dependent precursor protein translocation. *Cell*, *62*(4), 649–657.
- Burger, G., Gray, M. W., Forget, L., & Lang, B. F. (2013). Strikingly Bacteria-Like and Gene-Rich Mitochondrial Genomes throughout Jakobid Protists. *Genome Biology and Evolution*, *5*(2), 418–438.
- Burkschat, M., Cramer, E., & Kamps, U. (2012). Zusammenhangsmaße. In *Beschreibende Statistik - Grundlegende Methoden der Datenanalyse*. (Springer, 2. Auflage), 239-293.
- Cabelli, R. J., Dolan, K. M., Qian, L., & Oliver, D. B. (1991). Characterization of membrane-associated and soluble states of SecA protein from wild-type and secA51(Ts) mutant strains of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, *266*(36), 24420–24427.
- Campbell, N. A., & Reece, J. B. (2003a). Die Zelle. Membranen: Struktur und Funktion. In *Biologie*. (Spektrum Lehrbuch, 6. Auflage), 169–175.
- Campbell, N. A., & Reece, J. B. (2003b). Stammesgeschichte der biologischen Diversität - Prokaryoten und die Entstehung der Stoffwechselvielfalt. In *Biologie*. (Spektrum Lehrbuch, 6. Auflage), 627–649.
- Cannon, K. S., Or, E., Clemons, W. M., Shibata, Y., & Rapoport, T. A. (2005). Disulfide bridge formation between SecY and a translocating polypeptide localizes the translocation pore to the center of SecY. *The Journal of Cell Biology*, *169*(2), 219–225.
- Cao, G., Kuhn, A., & Dalbey, R. E. (1995). The translocation of negatively charged residues across the membrane is driven by the electrochemical potential: evidence for an electrophoresis-like membrane transfer mechanism. *The EMBO Journal*, *14*(5), 866–875.
- Catipovic, M. A., Bauer, B. W., Loparo, J. J., & Rapoport, T. A. (2019). Protein translocation by the SecA ATPase occurs by a power-stroke mechanism. *The EMBO Journal*, *38*(9), e101140.
- Celebi, N., Yi, L., J. Facey, S., Kuhn, A., & Dalbey, R. E. (2006). Membrane Biogenesis of Subunit II of Cytochrome bo Oxidase: Contrasting Requirements for Insertion of N-terminal and C-terminal Domains. *Journal of Molecular Biology*, *357*(5), 1428–1436.
- Chaturvedi, D., & Mahalakshmi, R. (2017). Transmembrane β -barrels: Evolution, folding and energetics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1859*(12), 2467–2482.

-
- Chatzi, K. E., Sardis, M. F., Economou, A., & Karamanou, S. (2014). SecA-mediated targeting and translocation of secretory proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843(8), 1466–1474.
- Chatzi, K. E., Sardis, M. F., Tsirigotaki, A., Koukaki, M., Šoštarić, N., Konijnenberg, A., Sobott, F., Kalodimos, C. G., Karamanou, S., & Economou, A. (2017). Preprotein mature domains contain translocase targeting signals that are essential for secretion. *Journal of Cell Biology*, 216(5), 1357–1369.
- Chaudhary, A. S., Chen, W., Jin, J., Tai, P. C., & Wang, B. (2015). SecA: a potential antimicrobial target. *Future Medicinal Chemistry*, 7(8), 989–1007.
- Chen, M., Samuelson, J. C., Jiang, F., Muller, M., Kuhn, A., & Dalbey, R. E. (2002a). Direct Interaction of YidC with the Sec-independent Pf3 Coat Protein during Its Membrane Protein Insertion. *Journal of Biological Chemistry*, 277(10), 7670–7675.
- Chen, M., Xie, K., Jiang, F., Yi, L., & Dalbey, R. E. (2002b). YidC, a Newly Defined Evolutionarily Conserved Protein, Mediates Membrane Protein Assembly in Bacteria. *Biological Chemistry*, 383(10), 1565–1572.
- Chen, M., Xie, K., Yuan, J., Yi, L., Facey, S. J., Pradel, N., Wu, L.-F., Kuhn, A., & Dalbey, R. E. (2005). Involvement of SecDF and YidC in the membrane insertion of M13 procoat mutants. *Biochemistry*, 44(31), 10741–10749.
- Chen, Y., Bauer, B. W., Rapoport, T. A., & Gumbart, J. C. (2015). Conformational Changes of the Clamp of the Protein Translocation ATPase SecA. *Journal of Molecular Biology*, 427(14), 2348–2359.
- Chen, Y., Capponi, S., Zhu, L., Gellenbeck, P., Freitas, J. A., White, S. H., & Dalbey, R. E. (2017). YidC Insertase of Escherichia coli: Water Accessibility and Membrane Shaping. *Structure*, 25(9), 1403–1414.
- Chen, Y., Soman, R., Shanmugam, S. K., Kuhn, A., & Dalbey, R. E. (2014). The Role of the Strictly Conserved Positively Charged Residue Differs among the Gram-positive, Gram-negative, and Chloroplast YidC Homologs. *Journal of Biological Chemistry*, 289(51), 35656–35667.
- Chiba, S., Lamsa, A., & Pogliano, K. (2009). A ribosome–nascent chain sensor of membrane protein biogenesis in Bacillus subtilis. *The EMBO Journal*, 28(22), 3461–3475.
- Chitwood, P. J., Juszkiwicz, S., Guna, A., Shao, S., & Hegde, R. S. (2018). EMC Is Required to Initiate Accurate Membrane Protein Topogenesis. *Cell*, 175(6), 1507–1519.
- Chun, S. Y., & Randall, L. L. (1994). In vivo studies of the role of SecA during protein export in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 176(14), 4197–4203.

-
- Collier, D. N., Bankaitis, V. A., Weiss, J. B., & Bassford, P. J. (1988). The antifolding activity of SecB promotes the export of the E. coli maltose-binding protein. *Cell*, *53*(2), 273–283.
- Corey, R. A., Ahdash, Z., Shah, A., Pyle, E., Allen, W. J., Fessl, T., Lovett, J. E., Politis, A., & Collinson, I. (2019). ATP-induced asymmetric pre-protein folding as a driver of protein translocation through the Sec machinery. *ELife*, *8*, e41803.
- Cox, J. C., Nicholls, D. G., & Ingledew, W. J. (1979). Transmembrane electrical potential and transmembrane pH gradient in the acidophile *Thiobacillus ferro-oxidans*. *Biochemical Journal*, *178*(1), 195–200.
- Crane, J. M., & Randall, L. L. (2017). The Sec System: Protein Export in *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*, *7*(2).
- Cunningham, K., Lill, R., Crooke, E., Rice, M., Moore, K., Wickner, W., & Oliver, D. (1989). SecA protein, a peripheral protein of the *Escherichia coli* plasma membrane, is essential for the functional binding and translocation of proOmpA. *The EMBO Journal*, *8*(3), 955–959.
- Dalal, K., Chan, C. S., Sligar, S. G., & Duong, F. (2012). Two copies of the SecY channel and acidic lipids are necessary to activate the SecA translocation ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(11), 4104–4109.
- Dalbey, R. E., Kuhn, A., Zhu, L., & Kiefer, D. (2014). The membrane insertase YidC. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1843*(8), 1489–1496.
- Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(12), 6640–6645.
- Day, P. M., & Theg, S. M. (2018). Evolution of protein transport to the chloroplast envelope membranes. *Photosynthesis Research*, *138*(3), 315–326.
- de Cock, H., Overeem, W., & Tommassen, J. (1992). Biogenesis of outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, *224*(2), 369–379.
- de Vrije, T., de Swart, R. L., Dowhan, W., Tommassen, J., & de Kruijff, B. (1988). Phosphatidylglycerol is involved in protein translocation across *Escherichia coli* inner membranes. *Nature*, *334*(6178), 173–175.
- de Waelheyns, E., Segers, K., Sardis, M. F., Anné, J., Nicolaes, G. A. F., & Economou, A. (2015). Identification of small-molecule inhibitors against SecA by structure-based virtual ligand screening. *The Journal of Antibiotics*, *68*(11), 666–673.

- Dealwis, C. G., Brennan, C., Christianson, K., Mandrecki, W., & Abad-Zapatero, C. (1995). Crystallographic analysis of reversible metal binding observed in a mutant (Asp153 - Gly) of *Escherichia coli* alkaline phosphatase. *Biochemistry*, *34*(43), 13967–13973.
- Deitermann, S., Sprie, G. S., & Koch, H.-G. (2005). A Dual Function for SecA in the Assembly of Single Spanning Membrane Proteins in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(47), 39077–39085.
- Dekker, C., Kruijff, B. de, & Gros, P. (2003). Crystal structure of SecB from *Escherichia coli*. *Journal of Structural Biology*, *144*(3), 313–319.
- den Blaauwen, T., Terpetschnig, E., Lakowicz, J. R., & Driessen, A. J. M. (1997). Interaction of SecB with soluble SecA 1. *FEBS Letters*, *416*(1), 35–38.
- Deshaies, R. J., & Schekman, R. (1987). A yeast mutant defective at an early stage in import of secretory protein precursors into the endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Biology*, *105*(2), 633–645.
- Deville, K., Gold, V. A. M., Robson, A., Whitehouse, S., Sessions, R. B., Baldwin, S. A., Radford, S. E., & Collinson, I. (2011). The Oligomeric State and Arrangement of the Active Bacterial Translocon. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(6), 4659–4669.
- Dong, Y., Palmer, S. R., Hasona, A., Nagamori, S., Kaback, H. R., Dalbey, R. E., & Brady, L. J. (2008). Functional Overlap but Lack of Complete Cross-Complementation of *Streptococcus mutans* and *Escherichia coli* YidC Orthologs. *Journal of Bacteriology*, *190*(7), 2458–2469.
- Driessen, A. J. M., & Nouwen, N. (2008). Protein Translocation Across the Bacterial Cytoplasmic Membrane. *Annual Review of Biochemistry*, *77*(1), 643–667.
- du Plessis, D. J. F., Berrelkamp, G., Nouwen, N., & Driessen, A. J. M. (2009). The Lateral Gate of SecYEG Opens during Protein Translocation. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(23), 15805–15814.
- Duong, F. (1998). Sec-dependent membrane protein biogenesis: SecYEG, preprotein hydrophobicity and translocation kinetics control the stop-transfer function. *The EMBO Journal*, *17*(3), 696–705.
- Egea, P. F., & Stroud, R. M. (2010). Lateral opening of a translocon upon entry of protein suggests the mechanism of insertion into membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(40), 17182–17187.
- Eichler, J. (2003). Evolution of the prokaryotic protein translocation complex: a comparison of archaeal and bacterial versions of SecDF. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *27*(3), 504–509.

-
- Erlanson, K. J., Miller, S. B. M., Nam, Y., Osborne, A. R., Zimmer, J., & Rapoport, T. A. (2008). A role for the two-helix finger of the SecA ATPase in protein translocation. *Nature*, *455*(7215), 984–987.
- Ernst, I., Haase, M., Ernst, S., Yuan, S., Kuhn, A., & Leptihn, S. (2018). Large conformational changes of a highly dynamic pre-protein binding domain in SecA. *Communications Biology*, *1*(1), 130.
- Ernst, S., Schönbauer, A.-K., Bär, G., Börsch, M., & Kuhn, A. (2011). YidC-Driven Membrane Insertion of Single Fluorescent Pf3 Coat Proteins. *Journal of Molecular Biology*, *412*, 165–175.
- Errington, J., Appleby, L., Daniel, R. A., Goodfellow, H., Partridge, S. R., & Yudkin, M. D. (1992). Structure and function of the spoIIJ gene of *Bacillus subtilis*: a vegetatively expressed gene that is essential for sigma G activity at an intermediate stage of sporulation. *Journal of General Microbiology*, *138*(12), 2609–2618.
- Facey, S. J., & Kuhn, A. (2003). The sensor protein KdpD inserts into the *Escherichia coli* membrane independent of the Sec translocase and YidC. *European Journal of Biochemistry*, *270*(8), 1724–1734.
- Facey, S. J., Neugebauer, S. A., Krauss, S., & Kuhn, A. (2007). The Mechanosensitive Channel Protein MscL Is Targeted by the SRP to The Novel YidC Membrane Insertion Pathway of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, *365*(4), 995–1004.
- Fekkes, P., & Driessen, A. J. M. (1999). Protein Targeting to the Bacterial Cytoplasmic Membrane. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *63*(1), 161–173.
- Fekkes, P., van der Does, C., & Driessen, A. J. M. (1997). The molecular chaperone SecB is released from the carboxy-terminus of SecA during initiation of precursor protein translocation. *The EMBO Journal*, *16*(20), 6105–6113.
- Fernandez, D. E. (2018). Two paths diverged in the stroma: targeting to dual SEC translocase systems in chloroplasts. *Photosynthesis Research*, *138*(3), 277–287.
- Finke, K., Plath, K., Panzner, S., Prehn, S., Rapoport, T. A., Hartmann, E., & Sommer, T. (1996). A second trimeric complex containing homologs of the Sec61p complex functions in protein transport across the ER membrane of *S. cerevisiae*. *The EMBO Journal*, *15*(7), 1482–1494.
- Fiumera, H. L., Dunham, M. J., Saracco, S. A., Butler, C. A., Kelly, J. A., & Fox, T. D. (2009). Translocation and Assembly of Mitochondrially Coded *Saccharomyces cerevisiae* Cytochrome c Oxidase Subunit Cox2 by Oxa1 and Yme1 in the Absence of Cox18. *Genetics*, *182*(2), 519–528.

-
- Förster, T. (1946). Energiewanderung und Fluoreszenz. *Die Naturwissenschaften*, 33, 166–175.
- Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen Der Physik*, 437(1–2), 55–75.
- Frauenfeld, J., Gumbart, J., Sluis, E. O. van der, Funes, S., Gartmann, M., Beatrix, B., Mielke, T., Berninghausen, O., Becker, T., Schulten, K., & Beckmann, R. (2011). Cryo-EM structure of the ribosome–SecYE complex in the membrane environment. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(5), 614–621.
- Freymann, D. M., Keenan, R. J., Stroud, R. M., & Walter, P. (1997). Structure of the conserved GTPase domain of the signal recognition particle. *Nature*, 385(6614), 361–364.
- Funes, S., Kauff, F., van der Sluis, E. O., Ott, M., & Herrmann, J. M. (2011). Evolution of YidC/Oxa1/Alb3 insertases: three independent gene duplications followed by functional specialization in bacteria, mitochondria and chloroplasts. *Biological Chemistry*, 392(1–2), 13–19.
- Funes, S., Nargang, F. E., Neupert, W., & Herrmann, J. M. (2004). 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. *Molecular Biology of the Cell*, 15(4), 1853–1861.
- Furukawa, A., Nakayama, S., Yoshikaie, K., Tanaka, Y., & Tsukazaki, T. (2018). Remote Coupled Drastic β -Barrel to β -Sheet Transition of the Protein Translocation Motor. *Structure*, 26(3), 485–489.
- Furukawa, A., Yoshikaie, K., Mori, T., Mori, H., Morimoto, Y. v., Sugano, Y., Iwaki, S., Minamino, T., Sugita, Y., Tanaka, Y., & Tsukazaki, T. (2017). Tunnel Formation Inferred from the I-Form Structures of the Proton-Driven Protein Secretion Motor SecDF. *Cell Reports*, 19(5), 895–901.
- Gallusser, A., & Kuhn, A. (1990). Initial steps in protein membrane insertion. Bacteriophage M13 procoat protein binds to the membrane surface by electrostatic interaction. *The EMBO Journal*, 9(9), 2723–2729.
- Gannon, P. M., Li, P., & Kumamoto, C. A. (1989). The mature portion of *Escherichia coli* maltose-binding protein (MBP) determines the dependence of MBP on SecB for export. *Journal of Bacteriology*, 171(2), 813–818.
- Ge, Y., Draycheva, A., Bornemann, T., Rodnina, M. v., & Wintermeyer, W. (2014). Lateral opening of the bacterial translocon on ribosome binding and signal peptide insertion. *Nature Communications*, 5(1), 5263–5268.

-
- Geng, Y., Kedrov, A., Caumanns, J. J., Crevenna, A. H., Lamb, D. C., Beckmann, R., & Driessen, A. J. M. (2015). Role of the Cytosolic Loop C2 and the C Terminus of YidC in Ribosome Binding and Insertion Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 290(28), 17250–17261.
- Geyter, J. de, Smets, D., Karamanou, S., & Economou, A. (2019). Inner Membrane Translocases and Insertases. In *Bacterial Cell Walls and Membranes*. (Springer, 1. Auflage), 337–366.
- Ghosh, M., Nath, S., Hajra, A., & Sinha, S. (2013). Fluorescence self-quenching of tetraphenylporphyrin in liquid medium. *Journal of Luminescence*, 141, 87–92.
- Goding, J. W. (1978). Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent. *Journal of Immunological Methods*, 20, 241–253.
- Gold, V. A. M., Robson, A., Bao, H., Romantsov, T., Duong, F., & Collinson, I. (2010). The action of cardiolipin on the bacterial translocon. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(22), 10044–10049.
- Gold, V. A. M., Whitehouse, S., Robson, A., & Collinson, I. (2013). The dynamic action of SecA during the initiation of protein translocation. *Biochemical Journal*, 449(3), 695–705.
- Görlich, D., & Rapoport, T. A. (1993). Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell*, 75(4), 615–630.
- Gouridis, G., Karamanou, S., Gelis, I., Kalodimos, C. G., & Economou, A. (2009). Signal peptides are allosteric activators of the protein translocase. *Nature*, 462(7271), 363–367.
- Gouridis, G., Karamanou, S., Koukaki, M., & Economou, A. (2010). In Vitro Assays to Analyze Translocation of the Model Secretory Preprotein Alkaline Phosphatase. In *Protein Secretion - Methods and Protocols*. (Springer, 1. Auflage), 157–172.
- Green, E. R., & Meccas, J. (2016). Bacterial Secretion Systems: An Overview. In *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*. (ASMscience, 5. Auflage), 215–239.
- Gu, S.-Q., Frank, P., Wieden, H.-J., Rodnina, M. v., & Wintermeyer, W. (2003). The signal recognition particle binds to protein L23 at the peptide exit of the Escherichia coli ribosome. *RNA*, 9(5), 566–573.
- Halic, M., Becker, T., Pool, M. R., Spahn, C. M. T., Grassucci, R. A., Frank, J., & Beckmann, R. (2004). Structure of the signal recognition particle interacting with the elongation-arrested ribosome. *Nature*, 427(6977), 808–814.

-
- Hanada, M., Nishiyama, K. I., Mizushima, S., & Tokuda, H. (1994). Reconstitution of an efficient protein translocation machinery comprising SecA and the three membrane proteins, SecY, SecE, and SecG (p12). *Journal of Biological Chemistry*, 269(38), 23625–23631.
- Hanada, M., Nishiyama, K., & Tokuda, H. (1996). SecG plays a critical role in protein translocation in the absence of the proton motive force as well as at low temperature. *FEBS Letters*, 381, 25–28.
- Hansen, K. G., & Herrmann, J. M. (2019). Transport of Proteins into Mitochondria. *The Protein Journal*, 38(3), 330–342.
- Hardy, S., & Randall, L. (1991). A kinetic partitioning model of selective binding of nonnative proteins by the bacterial chaperone SecB. *Science*, 251(4992), 439–443.
- Hartl, F.-U., Lecker, S., Schiebel, E., Hendrick, J. P., & Wickner, W. (1990). The binding cascade of SecB to SecA to SecYE mediates preprotein targeting to the E. coli plasma membrane. *Cell*, 63(2), 269–279.
- Hartmann, E., Rapoport, T. A., & Lodish, H. F. (1989). Predicting the orientation of eukaryotic membrane-spanning proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(15), 5786–5790.
- Hartmann, E., Sommer, T., Prehn, S., Görlich, D., Jentsch, S., & Rapoport, T. A. (1994). Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex. *Nature*, 367(6464), 654–657.
- He, H., Kuhn, A., & Dalbey, R. E. (2020). Tracking the Stepwise Movement of a Membrane-inserting Protein In Vivo. *Journal of Molecular Biology*, 432(2), 484–496.
- Hennon, S. W., & Dalbey, R. E. (2014). Cross-Linking-Based Flexibility and Proximity Relationships between the TM Segments of the Escherichia coli YidC. *Biochemistry*, 53(20), 3278–3286.
- Hennon, S. W., Soman, R., Zhu, L., & Dalbey, R. E. (2015). YidC/Alb3/Oxa1 family of insertases. *Journal of Biological Chemistry*, 290(24), 14866–14874.
- Hizlan, D., Robson, A., Whitehouse, S., Gold, V. A., Vonck, J., Mills, D., Kühlbrandt, W., & Collinson, I. (2012). Structure of the SecY Complex Unlocked by a Preprotein Mimic. *Cell Reports*, 1(1), 21–28.
- Hochreiter, B., Pardo-Garcia, A., & Schmid, J. (2015). Fluorescent Proteins as Genetically Encoded FRET Biosensors in Life Sciences. *Sensors*, 15(10), 26281–26314.

-
- Hofbauer, B., Vomacka, J., Stahl, M., Korotkov, V. S., Jennings, M. C., Wuest, W. M., & Sieber, S. A. (2018). Dual Inhibitor of *Staphylococcus aureus* Virulence and Biofilm Attenuates Expression of Major Toxins and Adhesins. *Biochemistry*, *57*(11), 1814–1820.
- Hohlbein, J., Craggs, T. D., & Cordes, T. (2014). Alternating-laser excitation: single-molecule FRET and beyond. *Chemical Society Reviews*, *43*(4), 1156–1171.
- Homma, T., Yoshihisa, T., & Ito, K. (1997). Subunit interactions in the *Escherichia coli* protein translocase: SecE and SecG associate independently with SecY. *FEBS Letters*, *408*(1), 11–15.
- Hou, B., Lin, P. J., & Johnson, A. E. (2012). Membrane Protein TM Segments Are Retained at the Translocon during Integration until the Nascent Chain Cues FRET-Detected Release into Bulk Lipid. *Molecular Cell*, *48*(3), 398–408.
- Houben, E. N. G., ten Hagen-Jongman, C. M., Brunner, J., Oudega, B., & Luirink, J. (2004). The two membrane segments of leader peptidase partition one by one into the lipid bilayer via a Sec/YidC interface. *EMBO Reports*, *5*(10), 970–975.
- Houben, E. N. G., Urbanus, M. L., van der Laan, M., ten Hagen-Jongman, C. M., Driessen, A. J. M., Brunner, J., Oudega, B., & Luirink, J. (2002). YidC and SecY Mediate Membrane Insertion of a Type I Transmembrane Domain. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(39), 35880–35886.
- Huber, D., Jamshad, M., Hanmer, R., Schibich, D., Döring, K., Marcomini, I., Kramer, G., & Bukau, B. (2017). SecA Cotranslationally Interacts with Nascent Substrate Proteins In Vivo. *Journal of Bacteriology*, *199*(2), e00622-16.
- Huber, D., Rajagopalan, N., Preissler, S., Rocco, M. A., Merz, F., Kramer, G., & Bukau, B. (2011). SecA Interacts with Ribosomes in Order to Facilitate Posttranslational Translocation in Bacteria. *Molecular Cell*, *41*(3), 343–353.
- Imhof, N., Kuhn, A., & Gerken, U. (2011). Substrate-Dependent Conformational Dynamics of the *Escherichia coli* Membrane Insertase YidC. *Biochemistry*, *50*(15), 3229–3239.
- Ito, K., Akiyama, Y., Yura, T., & Shiba, K. (1986). Diverse effects of the MalE-LacZ hybrid protein on *Escherichia coli* cell physiology. *Journal of Bacteriology*, *167*(1), 201–204.
- Ito, K. (1984). Identification of the secY (prlA) gene product involved in protein export in *Escherichia coli*. *MGG Molecular & General Genetics*, *197*(2), 204–208.
- Ito, K., Shimokawa-Chiba, N., & Chiba, S. (2019). Sec translocon has an insertase-like function in addition to polypeptide conduction through the channel. *F1000Research*, *8*.

-
- Ito, K., Wittekind, M., Nomura, M., Shiba, K., Yura, T., Miura, A., & Nashimoto, H. (1983). A temperature-sensitive mutant of *E. coli* exhibiting slow processing of exported proteins. *Cell*, *32*(3), 789–797.
- Jena, B. (2009). Membrane Fusion: Role of SNAREs and Calcium. *Protein & Peptide Letters*, *16*(7), 712–717.
- Jiang, F., Chen, M., Yi, L., de Gier, J.-W., Kuhn, A., & Dalbey, R. E. (2003). Defining the Regions of *Escherichia coli* YidC That Contribute to Activity. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(49), 48965–48972.
- Jiang, F., Yi, L., Moore, M., Chen, M., Rohl, T., van Wijk, K.-J., de Gier, J.-W. L., Henry, R., & Dalbey, R. E. (2002). Chloroplast YidC Homolog Albino3 Can Functionally Complement the Bacterial YidC Depletion Strain and Promote Membrane Insertion of Both Bacterial and Chloroplast Thylakoid Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(22), 19281–19288.
- Jin, J., Hsieh, Y., Chaudhary, A. S., Cui, J., Houghton, J. E., Sui, S.-F., Wang, B., & Tai, P. C. (2018). SecA inhibitors as potential antimicrobial agents: differential actions on SecA-only and SecA-SecYEG protein-conducting channels. *FEMS Microbiology Letters*, *365*(15).
- Jomaa, A., Boehringer, D., Leibundgut, M., & Ban, N. (2016). Structures of the *E. coli* translating ribosome with SRP and its receptor and with the translocon. *Nature Communications*, *7*(1), 10471–10479.
- Junne, T., Wong, J., Studer, C., Aust, T., Bauer, B. W., Beibel, M., Bhullar, B., Brucoleri, R., Eichenberger, J., Estoppey, D. *et al.* (2015). Decatransin, a new natural product inhibiting protein translocation at the Sec61/SecYEG translocon. *Journal of Cell Science*, *128*(6), 1217–1229.
- Karamanou, S., Bariami, V., Papanikou, E., Kalodimos, C. G., & Economou, A. (2008). Assembly of the translocase motor onto the preprotein-conducting channel. *Molecular Microbiology*, *70*(2), 311–322.
- Karamanou, S., Vrontou, E., Sianidis, G., Baud, C., Roos, T., Kuhn, A., Politou, A. S., & Economou, A. (1999). A molecular switch in SecA protein couples ATP hydrolysis to protein translocation. *Molecular Microbiology*, *34*(5), 1133–1145.
- Karamyshev, A. L., & Johnson, A. E. (2005). Selective SecA Association with Signal Sequences in Ribosome-bound Nascent Chains. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(45), 37930–37940.

-
- Karyolaimos, A., Ampah-Korsah, H., Zhang, Z., & de Gier, J.-W. (2018). Shaping *Escherichia coli* for recombinant membrane protein production. *FEMS Microbiology Letters*, *365*(15).
- Karyolaimos, A., Dolata, K. M., Antelo-Varela, M., Mestre Borrás, A., Elfageih, R., Sievers, S., Becher, D., Riedel, K., & de Gier, J.-W. (2020). *Escherichia coli* Can Adapt Its Protein Translocation Machinery for Enhanced Periplasmic Recombinant Protein Production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *7*(465).
- Kater, L., Frieg, B., Berninghausen, O., Gohlke, H., Beckmann, R., & Kedrov, A. (2019). Partially inserted nascent chain unzips the lateral gate of the Sec translocon. *EMBO Reports*, *20*(10), e48191.
- Kath, T., & Schäfer, G. (1995). A *secY* homologous gene in the crenarchaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, *1264*(2), 155–158.
- Katoh, R., Sinha, S., Murata, S., & Tachiya, M. (2001). Origin of the stabilization energy of perylene excimer as studied by fluorescence and near-IR transient absorption spectroscopy. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, *145*(1–2), 23–34.
- Kaufmann, A., Manting, E. H., Veenendaal, A. K. J., Driessen, A. J. M., & van der Does, C. (1999). Cysteine-Directed Cross-Linking Demonstrates That Helix 3 of SecE Is Close to Helix 2 of SecY and Helix 3 of a Neighboring SecE. *Biochemistry*, *38*(28), 9115–9125.
- Kedrov, A., Kusters, I., Krasnikov, V. v., & Driessen, A. J. M. (2011). A single copy of SecYEG is sufficient for preprotein translocation. *The EMBO Journal*, *30*(21), 4387–4397.
- Kedrov, A., Sustarsic, M., de Keyser, J., Caumanns, J. J., Wu, Z. C., & Driessen, A. J. M. (2013). Elucidating the Native Architecture of the YidC: Ribosome Complex. *Journal of Molecular Biology*, *425*(22), 4112–4124.
- Kedrov, A., Wickles, S., Crevenna, A. H., van der Sluis, E. O., Buschauer, R., Berninghausen, O., Lamb, D. C., & Beckmann, R. (2016). Structural Dynamics of the YidC:Ribosome Complex during Membrane Protein Biogenesis. *Cell Reports*, *17*(11), 2943–2954.
- Kiefer, D., Hu, X., Dalbey, R. E., & Kuhn, A. (1997). Negatively charged amino acid residues play an active role in orienting the Sec-independent Pf3 coat protein in the *Escherichia coli* inner membrane. *The EMBO Journal*, *16*(9), 2197–2204.
- Kiefer, D., & Kuhn, A. (1999). Hydrophobic forces drive spontaneous membrane insertion of the bacteriophage Pf3 coat protein without topological control. *The EMBO Journal*, *18*(22), 6299–6306.

-
- Kiefer, D., & Kuhn, A. (2018). YidC-mediated membrane insertion. *FEMS Microbiology Letters*, *365*(12).
- Kinch, L. N., Saier, Jr, M. H., & Grishin, N. v. (2002). Sec61 β – a component of the archaeal protein secretory system. *Trends in Biochemical Sciences*, *27*(4), 170–171.
- Klenner, C., & Kuhn, A. (2012). Dynamic Disulfide Scanning of the Membrane-inserting Pf3 Coat Protein Reveals Multiple YidC Substrate Contacts. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(6), 3769–3776.
- Klenner, C., Yuan, J., Dalbey, R. E., & Kuhn, A. (2008). The Pf3 coat protein contacts TM1 and TM3 of YidC during membrane biogenesis. *FEBS Letters*, *582*(29), 3967–3972.
- Klostermann, E., Droste gen. Helling, I., Carde, J.-P., & Schünemann, D. (2002). The thylakoid membrane protein ALB3 associates with the cpSecY-translocase in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal*, *368*(3), 777–781.
- Knüpffer, L., Fehrenbach, C., Denks, K., Erichsen, V., Petriman, N.-A., & Koch, H.-G. (2019). Molecular Mimicry of SecA and Signal Recognition Particle Binding to the Bacterial Ribosome. *MBio*, *10*(4), e01317-19.
- Knyazev, D. G., Kuttner, R., Bondar, A.-N., Zimmerman, M., Siligan, C., & Pohl, P. (2020). Voltage Sensing in Bacterial Protein Translocation. *Biomolecules*, *10*(1), 78-89.
- Knyazev, D. G., Kuttner, R., Zimmermann, M., Sobakinskaya, E., & Pohl, P. (2018). Driving Forces of Translocation Through Bacterial Translocon SecYEG. *The Journal of Membrane Biology*, *251*(3), 329–343.
- Koch, H.-G., Hengelage, T., Neumann-Haefelin, C., MacFarlane, J., Hoffschulte, H. K., Schimz, K.-L., Mechler, B., & Müller, M. (1999). In Vitro Studies with Purified Components Reveal Signal Recognition Particle (SRP) and SecA/SecB as Constituents of Two Independent Protein-targeting Pathways of *Escherichia coli*. *Molecular Biology of the Cell*, *10*, 2163–2173.
- Koch, H.-G., Moser, M., Schimz, K.-L., & Müller, M. (2002). The Integration of YidC into the Cytoplasmic Membrane of *Escherichia coli* Requires the Signal Recognition Particle, SecA and SecYEG. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(8), 5715–5718.
- Koch, H.-G., & Müller, M. (2000). Dissecting the Translocase and Integrase Functions of the *Escherichia coli* SecYEG Translocon. *The Journal of Cell Biology*, *150*(3), 689–694.
- Koch, S., Exterkate, M., López, C. A., Patro, M., Marrink, S. J., & Driessen, A. J. M. (2019). Two distinct anionic phospholipid-dependent events involved in SecA-mediated protein translocation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1861*(11), 183035.

-
- Kohler, R., Boehringer, D., Greber, B., Bingel-Erlenmeyer, R., Collinson, I., Schaffitzel, C., & Ban, N. (2009). YidC and Oxa1 Form Dimeric Insertion Pores on the Translating Ribosome. *Molecular Cell*, *34*(3), 344–353.
- Kol, S., Majczak, W., Heerlien, R., van der Berg, J. P., Nouwen, N., & Driessen, A. J. M. (2009). Subunit a of the F1F0 ATP Synthase Requires YidC and SecYEG for Membrane Insertion. *Journal of Molecular Biology*, *390*(5), 893–901.
- Komar, J., Alvira, S., Schulze, R. J., Martin, R., Lycklama a Nijeholt, J. A., Lee, S. C., Dafforn, T. R., Deckers-Hebestreit, G., Berger, I., Schaffitzel, C., & Collinson, I. (2016). Membrane protein insertion and assembly by the bacterial holo-translocon SecYEG–SecDF–YajC–YidC. *Biochemical Journal*, *473*(19), 3341–3354.
- Kramer, G., Boehringer, D., Ban, N., & Bukau, B. (2009). The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins. *Nature Structural & Molecular Biology*, *16*(6), 589–597.
- Kuhn, A. (1988). Alterations in the extracellular domain of M13 procoat protein make its membrane insertion dependent on secA and secY. *European Journal of Biochemistry*, *177*(2), 267–271.
- Kuhn, A., & Dalbey, R. E. (2016). Protein Translocation: SecA–SecY Conformational Crosstalk Opens Channel. *Current Biology*, *26*(17), R811–R813.
- Kuhn, A., Haase, M., & Leptihn, S. (2017b). Assisted and Unassisted Protein Insertion into Liposomes. *Biophysical Journal*, *113*(6), 1187–1193.
- Kuhn, A., & Kiefer, D. (2017). Membrane protein insertase YidC in bacteria and archaea. *Molecular Microbiology*, *103*(4), 590–594.
- Kuhn, A., Koch, H.-G., & Dalbey, R. E. (2017a). Targeting and Insertion of Membrane Proteins. *EcoSal Plus*, *7*(2).
- Kumamoto, C. A., & Beckwith, J. (1983). Mutations in a new gene, secB, cause defective protein localization in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, *154*(1), 253–260.
- Kumamoto, C. A., & Beckwith, J. (1985). Evidence for specificity at an early step in protein export in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, *163*(1), 267–274.
- Kumamoto, C. A., & Nault, A. K. (1989). Characterization of the Escherichia coli protein-export gene secB. *Gene*, *75*(1), 167–175.
- Kumazaki, K., Chiba, S., Takemoto, M., Furukawa, A., Nishiyama, K., Sugano, Y., Mori, T., Dohmae, N., Hirata, K., Nakada-Nakura, Y. *et al.* (2014a). Structural basis of Sec-independent membrane protein insertion by YidC. *Nature*, *509*(7501), 516–520.

- Kumazaki, K., Kishimoto, T., Furukawa, A., Mori, H., Tanaka, Y., Dohmae, N., Ishitani, R., Tsukazaki, T., & Nureki, O. (2014b). Crystal structure of Escherichia coli YidC, a membrane protein chaperone and insertase. *Scientific Reports*, 4(1), 7299–7304.
- Kusters, R., Dowhan, W., & de Kruijff, B. (1991). Negatively charged phospholipids restore prePhoE translocation across phosphatidylglycerol-depleted Escherichia coli inner membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 266(14), 8659–8662.
- Kusters, R., Lentzen, G., Eppens, E., van Geel, A., van der Weijden, C. C., Wintermeyer, W., & Luirink, J. (1995). The functioning of the SRP receptor FtsY in protein-targeting in E. coli is correlated with its ability to bind and hydrolyse GTP. *FEBS Letters*, 372, 253–258.
- Kusukawa, N., Yura, T., Ueguchi, C., & Ito, K. (1989). Effects of mutations in heat-shock genes groES and groEL on protein export in Escherichia coli. *The EMBO Journal*, 8(11), 3517–3521.
- Ladbrooke, B. D., & Chapman, D. (1969). Thermal analysis of lipids, proteins and biological membranes a review and summary of some recent studies. *Chemistry and Physics of Lipids*, 3(4), 304–356.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Laidler, V., Chaddock, A. M., Knott, T. G., Walker, D., & Robinson, C. (1995). A SecY Homolog in Arabidopsis thaliana. *Journal of Biological Chemistry*, 270(30), 17664–17667.
- Lang, B. F., Burger, G., O’Kelly, C. J., Cedergren, R., Golding, G. B., Lemieux, C., Sankoff, D., Turmel, M., & Gray, M. W. (1997). An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature*, 387(6632), 493–497.
- Lessl, M., Balzer, D., Lurz, R., Waters, V. L., Guiney, D. G., & Lanka, E. (1992). Dissection of IncP conjugative plasmid transfer: definition of the transfer region Tra2 by mobilization of the Tra1 region in trans. *Journal of Bacteriology*, 174(8), 2493–2500.
- Li, W., Schulman, S., Boyd, D., Erlandson, K., Beckwith, J., & Rapoport, T. A. (2007). The Plug Domain of the SecY Protein Stabilizes the Closed State of the Translocation Channel and Maintains a Membrane Seal. *Molecular Cell*, 26(4), 511–521.
- Li, Y., Singhal, R., Taylor, I. W., McMinn, P. H., Chua, X. Y., Cline, K., & Fernandez, D. E. (2015). The Sec2 translocase of the chloroplast inner envelope contains a unique and dedicated SECE2 component. *The Plant Journal*, 84(4), 647–658.
- Lill, R., Cunningham, K., Brundage, L. A., Ito, K., Oliver, D., & Wickner, W. (1989). SecA protein hydrolyzes ATP and is an essential component of the protein translocation ATPase of Escherichia coli. *The EMBO Journal*, 8(3), 961–966.

-
- Lill, R., Dowhan, W., & Wickner, W. (1990). The ATPase activity of secA is regulated by acidic phospholipids, secY, and the leader and mature domains of precursor proteins. *Cell*, *60*(2), 271–280.
- Liu, G., Topping, T. B., Cover, W. H., & Randall, L. L. (1988). Retardation of folding as a possible means of suppression of a mutation in the leader sequence of an exported protein. *Journal of Biological Chemistry*, *263*(29), 14790–14793.
- Liu, G., Topping, T. B., & Randall, L. L. (1989). Physiological role during export for the retardation of folding by the leader peptide of maltose-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *86*(23), 9213–9217.
- Luirink, J., ten Hagen-Jongman, C. M., van der Weijden, C. C., Oudega, B., High, S., Dobberstein, B., & Kusters, R. (1994). An alternative protein targeting pathway in *Escherichia coli*: studies on the role of FtsY. *The EMBO Journal*, *13*(10), 2289–2296.
- Luiten, R. G. M., Schoenmakers, J. G. G., & Konings, R. N. H. (1983). The major coat protein gene of the filamentous *Pseudomonas aeruginosa* phage Pf3: absence of an N-terminal leader signal sequence. *Nucleic Acids Research*, *11*, 8073–8085.
- Ma, C., Wu, X., Sun, D., Park, E., Catipovic, M. A., Rapoport, T. A., Gao, N., & Li, L. (2019). Structure of the substrate-engaged SecA-SecY protein translocation machine. *Nature Communications*, *10*(1), 2872–2880.
- Malkin, L. I., & Rich, A. (1967). Partial resistance of nascent polypeptide chains to proteolytic digestion due to ribosomal shielding. *Journal of Molecular Biology*, *26*(2), 329–346.
- Manting, E. H., van der Does, C., Remigy, H., Engel, A., & Driessen, A. J. M. (2000). SecYEG assembles into a tetramer to form the active protein translocation channel. *The EMBO Journal*, *19*(5), 852–861.
- Martin, R., Larsen, A. H., Corey, R. A., Midtgaard, S. R., Frielinghaus, H., Schaffitzel, C., Arleth, L., & Collinson, I. (2019). Structure and Dynamics of the Central Lipid Pool and Proteins of the Bacterial Holo-Translocon. *Biophysical Journal*, *116*(10), 1931–1940.
- Matin, A., Wilson, B., Zychlinsky, E., & Matin, M. (1982). Proton motive force and the physiological basis of delta pH maintenance in *thiobacillus acidophilus*. *Journal of Bacteriology*, *150*(2), 582–591.
- Meerman, H. J., & Georgiou, G. (1994). Construction and Characterization of a Set of *E. coli* Strains Deficient in All Known Loci Affecting the Proteolytic Stability of Secreted Recombinant Proteins. *Biotechnology*, *12*(11), 1107–1110.
- Ménétret, J.-F., Schaletzky, J., Clemons, W. M., Osborne, A. R., Skånland, S. S., Denison, C., Gygi, S. P., Kirkpatrick, D. S., Park, E., Ludtke, S. J. *et al.* (2007). Ribosome Binding of a

-
- Single Copy of the SecY Complex: Implications for Protein Translocation. *Molecular Cell*, 28(6), 1083–1092.
- Meyer, T. H., Ménétret, J.-F., Breitling, R., Miller, K. R., Akey, C. W., & Rapoport, T. A. (1999). The bacterial SecY/E translocation complex forms channel-like structures similar to those of the eukaryotic sec61p complex. *Journal of Molecular Biology*, 285(4), 1789–1800.
- Meynial-salles, I., Cervin, M. a, & Soucaille, P. (2005). New Tool for Metabolic Pathway Engineering in Escherichia coli: One-Step Method To Modulate Expression of Chromosomal Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4), 2140–2144.
- Michels, M., & Bakker, E. P. (1985). Generation of a large, protonophore-sensitive proton motive force and pH difference in the acidophilic bacteria Thermoplasma acidophilum and Bacillus acidocaldarius. *Journal of Bacteriology*, 161(1), 231–237.
- Miroux, B., & Walker, J. E. (1996). Over-production of Proteins in Escherichia coli: Mutant Hosts that Allow Synthesis of some Membrane Proteins and Globular Proteins at High Levels. *Journal of Molecular Biology*, 260(3), 289–298.
- Mitchell, C., & Oliver, D. (1993). Two distinct ATP-binding domains are needed to promote protein export by Escherichia coli SecA ATPase. *Molecular Microbiology*, 10(3), 483–497.
- Mitra, K., Frank, J., & Driessen, A. (2006). Co- and post-translational translocation through the protein-conducting channel: analogous mechanisms at work? *Nature Structural & Molecular Biology*, 13(11), 957–964.
- Mitra, K., Schaffitzel, C., Shaikh, T., Tama, F., Jenni, S., Brooks, C. L., Ban, N., & Frank, J. (2005). Structure of the E. coli protein-conducting channel bound to a translating ribosome. *Nature*, 438(7066), 318–324.
- Mondal Roy, S., & Sarkar, M. (2011). Membrane Fusion Induced by Small Molecules and Ions. *Journal of Lipids*, 2011, 528784.
- Müller, J. P. (1996). Influence of impaired chaperone or secretion function on SecB production in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 178(21), 6097–6104.
- Murakami, T., Haga, K., Takeuchi, M., & Sato, T. (2002). Analysis of the Bacillus subtilis spoIIIJ Gene and Its Parologue Gene, yqjG. *Journal of Bacteriology*, 184(7), 1998–2004.
- Murén, E. M., Suciu, D., Topping, T. B., Kumamoto, C. A., & Randall, L. L. (1999). Mutational Alterations in the Homotetrameric Chaperone SecB That Implicate the Structure as Dimer of Dimers. *Journal of Biological Chemistry*, 274(27), 19397–19402.

-
- Nagamori, S., Smirnova, I. N., & Kaback, H. R. (2004). Role of YidC in folding of polytopic membrane proteins. *Journal of Cell Biology*, *165*(1), 53–62.
- Nakai, M., Sugita, D., Omata, T., & Endo, T. (1993). Sec-Y Protein Is Localized in Both the Cytoplasmic and Thylakoid Membranes in the Cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *193*(1), 228–234.
- Nakai, M., Tanaka, A., Omata, T., & Endo, T. (1992). Cloning and characterization of the secY gene from the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, *1171*(1), 113–116.
- Nelson, D., & Cox, M. (2001a). Grundlagen der Biochemie - Zellen. In *Lehninger Biochemie*. (Springer, 3. Auflage), 21–56.
- Nelson, D., & Cox, M. (2001b). Struktur und Katalyse - Lipide. In *Lehninger Biochemie*. (Springer, 3. Auflage), 381–409.
- Neugebauer, S. A., Baulig, A., Kuhn, A., & Facey, S. J. (2012). Membrane Protein Insertion of Variant MscL Proteins Occurs at YidC and SecYEG of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, *417*(4), 375–386.
- Neumann-Haefelin, C., Schäfer, U., Müller, M., & Koch, H.-G. (2000). SRP-dependent co-translational targeting and SecA-dependent translocation analyzed as individual steps in the export of a bacterial protein. *The EMBO Journal*, *19*(23), 6419–6426.
- Nishiyama, K., Hanada, M., & Tokuda, H. (1994). Disruption of the gene encoding p12 (SecG) reveals the direct involvement and important function of SecG in the protein translocation of *Escherichia coli* at low temperature. *The EMBO Journal*, *13*(14), 3272–3277.
- Nishiyama, K., Mizushima, S., & Tokuda, H. (1993). A novel membrane protein involved in protein translocation across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, *12*(9), 3409–3415.
- Nouwen, N., & Driessen, A. J. M. (2002). SecDFyajC forms a heterotetrameric complex with YidC. *Molecular Microbiology*, *44*(5), 1397–1405.
- O'Donnell, J. P., Phillips, B. P., Yagita, Y., Juszkievicz, S., Wagner, A., Malinverni, D., Keenan, R. J., Miller, E. A., & Hegde, R. S. (2020). The architecture of EMC reveals a path for membrane protein insertion. *ELife*, *9*, e57887.
- Öjemalm, K., Halling, K. K., Nilsson, I. M., & von Heijne, G. (2012). Orientational Preferences of Neighboring Helices Can Drive ER Insertion of a Marginally Hydrophobic Transmembrane Helix. *Molecular Cell*, *45*(4), 529–540.

- Oliver, D. B., & Beckwith, J. (1981). E. coli mutant pleiotropically defective in the export of secreted proteins. *Cell*, 25(3), 765–772.
- Oliver, D. C., & Paetzel, M. (2008). Crystal Structure of the Major Periplasmic Domain of the Bacterial Membrane Protein Assembly Facilitator YidC. *Journal of Biological Chemistry*, 283(8), 5208–5216.
- Olson, F., Hunt, C. A., Szoka, F. C., Vail, W. J., & Papahadjopoulos, D. (1979). Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 557(1), 9–23.
- Orfanoudaki, G., & Economou, A. (2014). Proteome-wide Subcellular Topologies of E. coli Polypeptides Database (STEPdb). *Molecular & Cellular Proteomics*, 13(12), 3674–3687.
- Origi, A., Natriashvili, A., Knüpfner, L., Fehrenbach, C., Denks, K., Asti, R., & Koch, H.-G. (2019). Yet another job for the bacterial ribosome. *Microbial Cell*, 6(11), 524–526.
- Osborne, A. R., & Rapoport, T. A. (2007). Protein Translocation Is Mediated by Oligomers of the SecY Complex with One SecY Copy Forming the Channel. *Cell*, 129(1), 97–110.
- Palmer, T., & Berks, B. C. (2012). The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nature Reviews Microbiology*, 10(7), 483–496.
- Papanikolaou, Y., Papadovasilaki, M., Ravelli, R. B. G., McCarthy, A. A., Cusack, S., Economou, A., & Petratos, K. (2007). Structure of Dimeric SecA, the Escherichia coli Preprotein Translocase Motor. *Journal of Molecular Biology*, 366(5), 1545–1557.
- Papanikou, E., Karamanou, S., Baud, C., Frank, M., Sianidis, G., Keramisanou, D., Kalodimos, C. G., Kuhn, A., & Economou, A. (2005). Identification of the Preprotein Binding Domain of SecA. *Journal of Biological Chemistry*, 280(52), 43209–43217.
- Park, E., Ménétret, J. F., Gumbart, J. C., Ludtke, S. J., Li, W., Whynot, A., Rapoport, T. A., & Akey, C. W. (2014). Structure of the SecY channel during initiation of protein translocation. *Nature*, 506(7486), 102–106.
- Park, E., & Rapoport, T. A. (2012). Bacterial protein translocation requires only one copy of the SecY complex in vivo. *The Journal of Cell Biology*, 198(5), 881–893.
- Patel, R., Smith, S. M., & Robinson, C. (2014). Protein transport by the bacterial Tat pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843(8), 1620–1628.
- Patil, S. D., Sharma, R., Srivastava, S., Navani, N. K., & Pathania, R. (2013). Downregulation of yidC in Escherichia coli by Antisense RNA Expression Results in Sensitization to Antibacterial Essential Oils Eugenol and Carvacrol. *PLoS ONE*, 8(3), e57370.

-
- Petriman, N.-A., Jauß, B., Hufnagel, A., Franz, L., Sachelaru, I., Drepper, F., Warscheid, B., & Koch, H.-G. (2018). The interaction network of the YidC insertase with the SecYEG translocon, SRP and the SRP receptor FtsY. *Scientific Reports*, *8*(1), 578–593.
- Petrů, M., Wideman, J., Moore, K., Alcock, F., Palmer, T., & Doležal, P. (2018). Evolution of mitochondrial TAT translocases illustrates the loss of bacterial protein transport machines in mitochondria. *BMC Biology*, *16*(1), 141.
- Phillips, G. J., & Silhavy, T. J. (1992). The E. coli ffh gene is necessary for viability and efficient protein export. *Nature*, *359*(3697), 744–746.
- Plath, K., Mothes, W., Wilkinson, B. M., Stirling, C. J., & Rapoport, T. A. (1998). Signal Sequence Recognition in Posttranslational Protein Transport across the Yeast ER Membrane. *Cell*, *94*(6), 795–807.
- Pleiner, T., Pinton Tomaleri, G., Januszyk, K., Inglis, A. J., Hazu, M., & Voorhees, R. M. (2020). Structural basis for membrane insertion by the human ER membrane protein complex. *Science*, eabb5008.
- Pogliano, J. A., & Beckwith, J. (1994a). SecD and SecF facilitate protein export in Escherichia coli. *The EMBO Journal*, *13*(3), 554–561.
- Pogliano, K. J., & Beckwith, J. (1993). The Cs sec mutants of Escherichia coli reflect the cold sensitivity of protein export itself. *Genetics*, *133*(4), 763–773.
- Pogliano, K. J., & Beckwith, J. (1994b). Genetic and molecular characterization of the Escherichia coli secD operon and its products. *Journal of Bacteriology*, *176*(3), 804–814.
- Pool, M. R., Stumm, J., Fulga, T. A., Sinning, I., & Dobberstein, B. (2002). Distinct Modes of Signal Recognition Particle Interaction with the Ribosome. *Science*, *297*(5585), 1345–1348.
- Prabudiansyah, I., & Driessen, A. J. M. (2017). The Canonical and Accessory Sec System of Gram-positive Bacteria. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, *404*, 45–67.
- Price, C. E., & Driessen, A. J. M. (2010). Conserved Negative Charges in the Transmembrane Segments of Subunit K of the NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Determine Its Dependence on YidC for Membrane Insertion. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(6), 3575–3581.
- Pross, E., Soussoula, L., Seitzl, I., Lupo, D., & Kuhn, A. (2016). Membrane Targeting and Insertion of the C-Tail Protein SciP. *Journal of Molecular Biology*, *428*(20), 4218–4227.
- Raetz, C. R. H., & Dowhan, W. (1990). Biosynthesis and function of phospholipids in Escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry*, *265*(3), 1235–1238.

-
- Randall, L. L. (1995). High selectivity with low specificity: how SecB has solved the paradox of chaperone binding. *Trends in Biochemical Sciences*, 20(2), 65–69.
- Randall, L. L., & Hardy, S. J. S. (1986). Correlation of competence for export with lack of tertiary structure of the mature species: A study in vivo of maltose-binding protein in *E. coli*. *Cell*, 46(6), 921–928.
- Randall, L. L., & Hardy, S. J. S. (2002). SecB, one small chaperone in the complex milieu of the cell. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59(10), 1617–1623.
- Randall, L. L., Topping, T. B., Suciu, D., & Hardy, S. J. S. (1998). Calorimetric analyses of the interaction between SecB and its ligands. *Protein Science*, 7(5), 1195–1200.
- Randall, L., Topping, T., & Hardy, S. (1990). No specific recognition of leader peptide by SecB, a chaperone involved in protein export. *Science*, 248(4957), 860–863.
- Rao C.V., S., de Waelheyns, E., Economou, A., & Anné, J. (2014). Antibiotic targeting of the bacterial secretory pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843(8), 1762–1783.
- Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V. G., Chen, G., & Deber, C. M. (2009). Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(6), 1760–1765.
- Rawat, S., Zhu, L., Lindner, E., Dalbey, R. E., & White, S. H. (2015). SecA Drives Transmembrane Insertion of RodZ, an Unusual Single-Span Membrane Protein. *Journal of Molecular Biology*, 427(5), 1023–1037.
- Rehm, H., & Letzel, T. (2010). Rekonstitution von Proteinen. In *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. (Springer, 6. Auflage), 127-142.
- Reithinger, J. H., Yim, C., Kim, S., Lee, H., & Kim, H. (2014). Structural and Functional Profiling of the Lateral Gate of the Sec61 Translocon. *Journal of Biological Chemistry*, 289(22), 15845–15855.
- Riggs, P. D., Derman, A. I., & Beckwith, J. (1988). A mutation affecting the regulation of a secA-lacZ fusion defines a new sec gene. *Genetics*, 118(4), 571–579.
- Robb, A., & Brown, J. D. (2001). Protein Transport: Two Translocons Are Better Than One. *Molecular Cell*, 8(3), 484–486.
- Robinson, P. J., & Woolhead, C. A. (2013). Post-translational membrane insertion of an endogenous YidC substrate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(12), 2781–2788.

-
- Robson, A., Carr, B., Sessions, R. B., & Collinson, I. (2009). Synthetic peptides identify a second periplasmic site for the plug of the SecYEG protein translocation complex. *FEBS Letters*, *583*(1), 207–212.
- Robson, A., & Collinson, I. (2006). The structure of the Sec complex and the problem of protein translocation. *EMBO Reports*, *7*(11), 1099–1103.
- Rohrer, J., & Kuhn, A. (1990). The function of a leader peptide in translocating charged amino acyl residues across a membrane. *Science*, *250*(4986), 1418–1421.
- Rothman, F., & Byrne, R. (1963). Fingerprint analysis of alkaline phosphatase of *Escherichia coli* K12. *Journal of Molecular Biology*, *6*(4), 330–340.
- Ryabichko, S., Ferreira, V. D. M., Vitrac, H., Kiyamova, R., Dowhan, W., & Bogdanov, M. (2020). Cardiolipin is required in vivo for the stability of bacterial translocon and optimal membrane protein translocation and insertion. *Scientific Reports*, *10*(1), 6296.
- Saaf, A., Andersson, H., Gafvelin, G., & Heijne, G. von. (1995). SecA-dependence of the translocation of a large periplasmic loop in the *Escherichia coli* MalF inner membrane protein is a function of sequence context. *Molecular Membrane Biology*, *12*(2), 209–215.
- Sääf, A., Monné, M., de Gier, J.-W., & von Heijne, G. (1998b). Membrane Topology of the 60-kDa Oxa1p Homologue from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(46), 30415–30418.
- Sääf, A., Wallin, E., & von Heijne, G. (1998a). Stop-transfer function of pseudo-random amino acid segments during translocation across prokaryotic and eukaryotic membranes. *European Journal of Biochemistry*, *251*(3), 821–829.
- Sachelaru, I., Petriman, N. A., Kudva, R., Kuhn, P., Welte, T., Knapp, B., Drepper, F., Warscheid, B., & Koch, H.-G. (2013). YidC Occupies the Lateral Gate of the SecYEG Translocon and Is Sequentially Displaced by a Nascent Membrane Protein. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(23), 16295–16307.
- Sachelaru, I., Winter, L., Knyazev, D. G., Zimmermann, M., Vogt, A., Kuttner, R., Ollinger, N., Siligan, C., Pohl, P., & Koch, H.-G. (2017). YidC and SecYEG form a heterotetrameric protein translocation channel. *Scientific Reports*, *7*(1), 101.
- Saller, M. J., Fusetti, F., & Driessen, A. J. M. (2009). *Bacillus subtilis* SpoIIIJ and YqjG Function in Membrane Protein Biogenesis. *Journal of Bacteriology*, *191*(21), 6749–6757.
- Samuelson, J. C., Chen, M., Jiang, F., Möller, I., Wiedmann, M., Kuhn, A., Phillips, G.J., & Dalbey, R. E. (2000). YidC mediates membrane protein insertion in bacteria. *Nature*, *406*(6796), 637–641.

-
- Samuelson, J. C., Jiang, F., Yi, L., Chen, M., de Gier, J.-W., Kuhn, A., & Dalbey, R. E. (2001). Function of YidC for the Insertion of M13 Procoat Protein in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(37), 34847–34852.
- Sanganna Gari, R. R., Chattrakun, K., Marsh, B. P., Mao, C., Chada, N., Randall, L. L., & King, G. M. (2019). Direct visualization of the *E. coli* Sec translocase engaging precursor proteins in lipid bilayers. *Science Advances*, *5*(6), eaav9404.
- Sanganna Gari, R. R., Frey, N. C., Mao, C., Randall, L. L., & King, G. M. (2013). Dynamic Structure of the Translocon SecYEG in Membrane. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(23), 16848–16854.
- Saparov, S. M., Erlandson, K., Cannon, K., Schaletzky, J., Schulman, S., Rapoport, T. A., & Pohl, P. (2007). Determining the Conductance of the SecY Protein Translocation Channel for Small Molecules. *Molecular Cell*, *26*(4), 501–509.
- Scaramuzzi, C. D., Stokes, H. W., & Hiller, R. G. (1992). Characterisation of a chloroplast-encoded sec Y homologue and atpH from a chromophytic alga. Evidence for a novel chloroplast genome organisation. *FEBS Letters*, *304*(2–3), 119–123.
- Schaffitzel, C., Oswald, M., Berger, I., Ishikawa, T., Abrahams, J. P., Koerten, H. K., Koning, R. I., & Ban, N. (2006). Structure of the *E. coli* signal recognition particle bound to a translating ribosome. *Nature*, *444*(7118), 503–506.
- Scheuring, J., Braun, N., Nothdurft, L., Stumpf, M., Veenendaal, A. K. J., Kol, S., van der Does, C., Driessen, A. J. M., & Weinkauff, S. (2005). The Oligomeric Distribution of SecYEG is Altered by SecA and Translocation Ligands. *Journal of Molecular Biology*, *354*(2), 258–271.
- Schiebel, E., Driessen, A. J. M., Hartl, F.-U., & Wickner, W. (1991). $\Delta\mu\text{H}^+$ and ATP function at different steps of the catalytic cycle of preprotein translocase. *Cell*, *64*(5), 927–939.
- Schlegel, S., Löfblom, J., Lee, C., Hjelm, A., Klepsch, M., Strous, M., Drew, D., Slotboom, D. J., & de Gier, J.-W. (2012). Optimizing Membrane Protein Overexpression in the *Escherichia coli* strain Lemo21(DE3). *Journal of Molecular Biology*, *423*(4), 648–659.
- Schuenemann, D., Amin, P., Hartmann, E., & Hoffman, N. E. (1999b). Chloroplast SecY Is Complexed to SecE and Involved in the Translocation of the 33-kDa but Not the 23-kDa Subunit of the Oxygen-evolving Complex. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(17), 12177–12182.
- Schuenemann, T. A., Delgado-Nixon, V. M., & Dalbey, R. E. (1999a). Direct Evidence That the Proton Motive Force Inhibits Membrane Translocation of Positively Charged Residues within Membrane Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(11), 6855–6864.

-
- Schulze, R. J., Komar, J., Botte, M., Allen, W. J., Whitehouse, S., Gold, V. A. M., Lycklama a Nijeholt, J. A., Huard, K., Berger, I., Christiane Schaffitzel, C., & Collinson, I. (2014). Membrane protein insertion and proton-motive-force-dependent secretion through the bacterial holo-translocon SecYEG–SecDF–YajC–YidC. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(13), 4844–4849.
- Scotti, P. A., Urbanus, M. L., Brunner, J., Gier, J. L. de, Heijne, G. von, van der Does, C., Driessen, A. J. M., Oudega, B., & Luirink, J. (2000). YidC, the Escherichia coli homologue of mitochondrial Oxa1p, is a component of the Sec translocase. *The EMBO Journal*, *19*(4), 542–549.
- Seitl, I., Wickles, S., Beckmann, R., Kuhn, A., & Kiefer, D. (2014). The C-terminal regions of YidC from *Rhodospirillum rubrum* and *Oceanicaulis alexandrii* bind to ribosomes and partially substitute for SRP receptor function in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, *91*(2), 408–421.
- Serdiuk, T., Balasubramaniam, D., Sugihara, J., Mari, S. A., Kaback, H. R., & Müller, D. J. (2016). YidC assists the stepwise and stochastic folding of membrane proteins. *Nature Chemical Biology*, *12*(11), 911–917.
- Serdiuk, T., Mari, S. A., & Müller, D. J. (2017). Pull-and-Paste of Single Transmembrane Proteins. *Nano Letters*, *17*(7), 4478–4488.
- Serdiuk, T., Steudle, A., Mari, S. A., Manioglu, S., Kaback, H. R., Kuhn, A., & Müller, D. J. (2019). Insertion and folding pathways of single membrane proteins guided by translocases and insertases. *Science Advances*, *5*(1), eaau6824.
- Serek, J., Bauer-Manz, G., Struhalla, G., van den Berg, L., Kiefer, D., Dalbey, R. E., & Kuhn, A. (2004). *Escherichia coli* YidC is a membrane insertase for Sec-independent proteins. *The EMBO Journal*, *23*(2), 294–301.
- Serrano, M., Côte, L., Opdyke, J., Moran, C. P., & Henriques, A. O. (2003). Expression of spoIIJ in the Prespore Is Sufficient for Activation of σ G and for Sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *185*(13), 3905–3917.
- Shajani, Z., Sykes, M. T., & Williamson, J. R. (2011). Assembly of Bacterial Ribosomes. *Annual Review of Biochemistry*, *80*(1), 501–526.
- Skalitzky, C. A., Martin, J. R., Harwood, J. H., Beirne, J. J., Adamczyk, B. J., Heck, G. R., Cline, K., & Fernandez, D. E. (2011). Plastids Contain a Second Sec Translocase System with Essential Functions. *Plant Physiology*, *155*(1), 354–369.

-
- Smith, M. A., Clemons, W. M., DeMars, C. J., & Flower, A. M. (2005). Modeling the Effects of prl Mutations on the Escherichia coli SecY Complex. *Journal of Bacteriology*, *187*(18), 6454–6465.
- Smith, V. F., Schwartz, B. L., Randall, L. L., & Smith, R. D. (2008). Electrospray mass spectrometric investigation of the chaperone SecB. *Protein Science*, *5*(3), 488–494.
- Soman, R., Yuan, J., Kuhn, A., & Dalbey, R. E. (2014). Polarity and Charge of the Periplasmic Loop Determine the YidC and Sec Translocase Requirement for the M13 Procoat Lep Protein. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(2), 1023–1032.
- Spann, D. (2017). *The function of E. coli YidC for the membrane insertion of the M13 procoat protein*. (Dissertation) Stuttgart: Universität Hohenheim
- Spann, D., Pross, E., Chen, Y., Dalbey, R. E., & Kuhn, A. (2018). Each protomer of a dimeric YidC functions as a single membrane insertase. *Scientific Reports*, *8*(1), 589–600.
- Steinberg, R., Knüpfner, L., Origi, A., Asti, R., & Koch, H.-G. (2018). Co-translational protein targeting in bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, *365*(11).
- Stiegler, N., Dalbey, R. E., & Kuhn, A. (2011). M13 Procoat Protein Insertion into YidC and SecYEG Proteoliposomes and Liposomes. *Journal of Molecular Biology*, *406*(3), 362–370.
- Strack, B., Lessl, M., Calendar, R., & Lanka, E. (1992). A common sequence motif, -E-G-Y-A-T-A-, identified within the primase domains of plasmid-encoded I- and P-type DNA primases and the α protein of the Escherichia coli satellite phage P4. *Journal of Biological Chemistry*, *267*(18), 13062–13072.
- Studier, F. W., & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, *189*(1), 113–130.
- Sugimura, K., & Higashi, N. (1988). A novel outer-membrane-associated protease in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, *170*(8), 3650–3654.
- Suh, J.-W., Boylan, S. A., Thomas, S. M., Dolan, K. M., Oliver, D. B., & Price, C. W. (1990). Isolation of a secY homologue from Bacillus subtilis: evidence for a common protein export pathway in eubacteria. *Molecular Microbiology*, *4*(2), 305–314.
- Sundberg, E., Slagter, J. G., Fridborg, I., Cleary, S. P., Robinson, C., & Coupland, G. (1997). ALBINO3, an Arabidopsis nuclear gene essential for chloroplast differentiation, encodes a chloroplast protein that shows homology to proteins present in bacterial membranes and yeast mitochondria. *The Plant Cell*, *9*(5), 717–730.

-
- Szoka, Francis Papahadjopoulos, D. (1980). Comparative Properties Preparation Of Lipid Vesicles (Liposomes). *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 9, 467–508.
- Tam, P. C. K., Maillard, A. P., Chan, K. K. Y., & Duong, F. (2005). Investigating the SecY plug movement at the SecYEG translocation channel. *The EMBO Journal*, 24(19), 3380–3388.
- Tanaka, Y., Sugano, Y., Takemoto, M., Mori, T., Furukawa, A., Kusakizako, T., Kumazaki, K., Kashima, A., Ishitani, R., Sugita, Y. *et al.* (2015). Crystal Structures of SecYEG in Lipidic Cubic Phase Elucidate a Precise Resting and a Peptide-Bound State. *Cell Reports*, 13(8), 1561–1568.
- Tjalsma, H., Bron, S., & van Dijl, J. M. (2003). Complementary Impact of Paralogous Oxa1-like Proteins of *Bacillus subtilis* on Post-translocational Stages in Protein Secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 278(18), 15622–15632.
- Tomkiewicz, D., Nouwen, N., van Leeuwen, R., Tans, S., & Driessen, A. J. M. (2006). SecA Supports a Constant Rate of Preprotein Translocation. *Journal of Biological Chemistry*, 281(23), 15709–15713.
- Tong, J., Dolezal, P., Selkrig, J., Crawford, S., Simpson, A. G. B., Noinaj, N., Buchanan, S. K., Gabriel, K., & Lithgow, T. (2011). Ancestral and Derived Protein Import Pathways in the Mitochondrion of *Reclinomonas americana*. *Molecular Biology and Evolution*, 28(5), 1581–1591.
- Topping, T. B., Woodbury, R. L., Diamond, D. L., Hardy, S. J. S., & Randall, L. L. (2001). Direct Demonstration That Homotetrameric Chaperone SecB Undergoes a Dynamic Dimer-Tetramer Equilibrium. *Journal of Biological Chemistry*, 276(10), 7437–7441.
- Torriani, A. (1968). Alkaline Phosphatase Subunits and Their Dimerization In Vivo. *Journal of Bacteriology*, 96(4), 1200–1207.
- Tsukazaki, T. (2018). Structure-based working model of SecDF, a proton-driven bacterial protein translocation factor. *FEMS Microbiology Letters*, 365(12).
- Tsukazaki, T. (2019). Structural Basis of the Sec Translocon and YidC Revealed Through X-ray Crystallography. *The Protein Journal*, 38(3), 249-261.
- Tsukazaki, T., Mori, H., Echizen, Y., Ishitani, R., Fukai, S., Tanaka, T., Perederina, A., Vassylyev, D. G., Kohno, T., Maturana, A. D. *et al.* (2011). Structure and function of a membrane component SecDF that enhances protein export. *Nature*, 474(7350), 235–238.
- Tsukazaki, T., Mori, H., Fukai, S., Ishitani, R., Mori, T., Dohmae, N., Perederina, A., Sugita, Y., Vassylyev, D. G., Ito, K., & Nureki, O. (2008). Conformational transition of Sec machinery inferred from bacterial SecYE structures. *Nature*, 455(7215), 988–991.

- Urbanus, M. L., Fröderberg, L., Drew, D., Björk, P., de Gier, J.-W. L., Brunner, J., Oudega, B., & Luirink, J. (2002). Targeting, Insertion, and Localization of *Escherichia coli* YidC. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(15), 12718–12723.
- Urbanus, M. L., Scotti, P. A., Froderberg, L., Sääf, A., de Gier, J.-W. L., Brunner, J., Samuelson, J. C., Dalbey, R. E., Oudega, B., & Luirink, J. (2001). Sec-dependent membrane protein insertion: sequential interaction of nascent FtsQ with SecY and YidC. *EMBO Reports*, *2*(6), 524–529.
- Valent, Q. A., Kendall, D. A., High, S., Kusters, R., Oudega, B., & Luirink, J. (1995). Early events in preprotein recognition in *E. coli*: interaction of SRP and trigger factor with nascent polypeptides. *The EMBO Journal*, *14*(22), 5494–5505.
- Valent, Quido A., Scotti, P. A., High, S., de Gier, J.-W., von Heijne, G., Lentzen, G., Wintermeyer, W., Oudega, B., & Luirink, J. (1998). The *Escherichia coli* SRP and SecB targeting pathways converge at the translocon. *The EMBO Journal*, *17*(9), 2504–2512.
- van Bloois, E., Haan, G.-J., de Gier, J.-W., Oudega, B., & Luirink, J. (2006). Distinct Requirements for Translocation of the N-tail and C-tail of the *Escherichia coli* Inner Membrane Protein CyoA. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(15), 10002–10009.
- van Bloois, E., Koningstein, G., Bauerschmitt, H., Herrmann, J. M., & Luirink, J. (2007). *Saccharomyces cerevisiae* Cox18 complements the essential Sec-independent function of *Escherichia coli* YidC. *FEBS Journal*, *274*(21), 5704–5713.
- van Bloois, E., Nagamori, S., Koningstein, G., Ullers, R. S., Preuss, M., Oudega, B., Harms, N., Kaback, H. R., Herrmann, J. M., & Luirink, J. (2005). The Sec-independent Function of *Escherichia coli* YidC Is Evolutionary-conserved and Essential. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(13), 12996–13003.
- van Dalen, A., & de Kruijff, B. (2004). The role of lipids in membrane insertion and translocation of bacterial proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1694*(1–3), 97–109.
- van Dalen, A., van der Laan, M., Driessen, A. J. M., Killian, J. A., & de Kruijff, B. (2002). Components required for membrane assembly of newly synthesized K⁺ channel KcsA. *FEBS Letters*, *511*(1–3), 51–58.
- van de Vossenberg, J. L. C. M., Albers, S.-V., van der Does, C., Driessen, A. J. M., & van Klompenburg, W. (1998). The positive inside rule is not determined by the polarity of the $\Delta\psi$. *Molecular Microbiology*, *29*(4), 1125–1126.

-
- van den Berg, B., Clemons, W. M., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S. C., & Rapoport, T. A. (2004). X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature*, *427*(6969), 36–44.
- van den Brink-van der Laan, E., Antoinette Killian, J., & de Kruijff, B. (2004). Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1666*(1–2), 275–288.
- van den Brink-van der Laan, E., Dalbey, R. E., Demel, R. A., Killian, J. A., & de Kruijff, B. (2001). Effect of Nonbilayer Lipids on Membrane Binding and Insertion of the Catalytic Domain of Leader Peptidase. *Biochemistry*, *40*(32), 9677–9684.
- van der Does, C., Manting, E. H., Kaufmann, A., Lutz, M., & Driessen, A. J. M. (1998). Interaction between SecA and SecYEG in Micellar Solution and Formation of the Membrane-Inserted State. *Biochemistry*, *37*(1), 201–210.
- van der Laan, M., Urbanus, M. L., ten Hagen-Jongman, C. M., Nouwen, N., Oudega, B., Harms, N., Driessen, A. J. M., & Luirink, J. (2003). A conserved function of YidC in the biogenesis of respiratory chain complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(10), 5801–5806.
- van der Laan, M., Bechtluft, P., Kol, S., Nouwen, N., & Driessen, A. J. M. (2004b). F1F0 ATP synthase subunit c is a substrate of the novel YidC pathway for membrane protein biogenesis. *Journal of Cell Biology*, *165*(2), 213–222.
- van der Laan, M., Nouwen, N., & Driessen, A. J. M. (2004a). SecYEG Proteoliposomes Catalyze the $\Delta\phi$ -Dependent Membrane Insertion of FtsQ. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(3), 1659–1664.
- van Klompenburg, W. (1997). Anionic phospholipids are determinants of membrane protein topology. *The EMBO Journal*, *16*(14), 4261–4266.
- van Puyenbroeck, V., & Vermeire, K. (2018). Inhibitors of protein translocation across membranes of the secretory pathway: novel antimicrobial and anticancer agents. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *75*(9), 1541–1558.
- von Heijne, G. (1986). The distribution of positively charged residues in bacterial inner membrane proteins correlates with the trans-membrane topology. *The EMBO Journal*, *5*(11), 3021–3027.
- von Heijne, G. (1989). Control of topology and mode of assembly of a polytopic membrane protein by positively charged residues. *Nature*, *341*(6241), 456–458.
- Wagner, S., Klepsch, M. M., Schlegel, S., Appel, A., Draheim, R., Tarry, M., Högbom, M., van Wijk, K. J., Slotboom, D. J., Persson, J. O., & de Gier, J.-W. (2008b). Tuning Escherichia

-
- coli for membrane protein overexpression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(38), 14371–14376.
- Wagner, S., Pop, O., Haan, G.-J., Baars, L., Koningstein, G., Klepsch, M. M., Genevoux, P., Luirink, J., & de Gier, J.-W. (2008a). Biogenesis of MalF and the MalFGK 2 Maltose Transport Complex in *Escherichia coli* Requires YidC. *Journal of Biological Chemistry*, 283(26), 17881–17890.
- Wang, F., Chan, C., Weir, N. R., & Denic, V. (2014). The Get1/2 transmembrane complex is an endoplasmic-reticulum membrane protein insertase. *Nature*, 512(7515), 441–444.
- Wang, S., Yang, C.-I., & Shan, S. (2017). SecA mediates cotranslational targeting and translocation of an inner membrane protein. *The Journal of Cell Biology*, 216(11), 3639–3653.
- Wannas, F. A., Gafel, R. A. A., Jaffer, N. D., & Husien, N. S. M. (2019). A Literature Review on the Fluorescence and phosphorescent. *American International Journal of Sciences and Engineering Research*, 2(1), 47–55.
- Watanabe, M., & Blobel, G. (1989). Cytosolic factor purified from *Escherichia coli* is necessary and sufficient for the export of a preprotein and is a homotetramer of SecB. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(8), 2728–2732.
- Weiss, J. B., Ray, P. H., & Bassford, P. J. (1988). Purified secB protein of *Escherichia coli* retards folding and promotes membrane translocation of the maltose-binding protein in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(23), 8978–8982.
- Welsh, L. C., Symmons, M. F., Sturtevant, J. M., Marvin, D. A., & Perham, R. N. (1998). Structure of the capsid of pf3 filamentous phage determined from X-ray fibre diffraction data at 3.1 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 283(1), 155–177.
- Welte, T., Kudva, R., Kuhn, P., Sturm, L., Braig, D., Müller, M., Warscheid, B., Drepper, F., & Koch, H. G. (2012). Promiscuous targeting of polytopic membrane proteins to SecYEG or YidC by the *Escherichia coli* signal recognition particle. *Molecular Biology of the Cell*, 23(3), 464–479.
- Whitehouse, S., Gold, V. A. M., Robson, A., Allen, W. J., Sessions, R. B., & Collinson, I. (2012). Mobility of the SecA 2-helix-finger is not essential for polypeptide translocation via the SecYEG complex. *The Journal of Cell Biology*, 199(6), 919–929.
- Wickles, S., Singharoy, A., Andreani, J., Seemayer, S., Bischoff, L., Berninghausen, O., Soeding, J., Schulten, K., van der Sluis, E. O., & Beckmann, R. (2014). A structural model of the active ribosome-bound membrane protein insertase YidC. *ELife*, 3, e03035.

-
- Wickström, D., Wagner, S., Simonsson, P., Pop, O., Baars, L., Ytterberg, A. J., van Wijk, K. J., Luirink, J., & de Gier, J.-W. L. (2011). Characterization of the Consequences of YidC Depletion on the Inner Membrane Proteome of *E. coli* Using 2D Blue Native/SDS-PAGE. *Journal of Molecular Biology*, *409*(2), 124–135.
- Wideman, J. G. (2015). The ubiquitous and ancient ER membrane protein complex (EMC): tether or not? *F1000Research*, *4*, 624.
- Wild, J., Altman, E., Yura, T., & Gross, C. A. (1992). DnaK and DnaJ heat shock proteins participate in protein export in *Escherichia coli*. *Genes & Development*, *6*(7), 1165–1172.
- Wild, J., Walter, W. A., Gross, C. A., & Altman, E. (1993). Accumulation of secretory protein precursors in *Escherichia coli* induces the heat shock response. *Journal of Bacteriology*, *175*(13), 3992–3997.
- Winterfeld, S., Ernst, S., Börsch, M., Gerken, U., & Kuhn, A. (2013). Real Time Observation of Single Membrane Protein Insertion Events by the *Escherichia coli* Insertase YidC. *PLoS ONE*, *8*(3), e59023.
- Winterfeld, S., Imhof, N., Roos, T., Bär, G., Kuhn, A., & Gerken, U. (2009). Substrate-Induced Conformational Change of the *Escherichia coli* Membrane Insertase YidC. *Biochemistry*, *48*(28), 6684–6691.
- Wolfe, P. B., Rice, M., & Wickner, W. (1985). Effects of Two *sec* Genes on Protein Assembly into the Plasma Membrane of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *260*(3), 1836–1841.
- Xie, K., Kiefer, D., Nagler, G., Dalbey, R. E., & Kuhn, A. (2006). Different Regions of the Nonconserved Large Periplasmic Domain of *Escherichia coli* YidC Are Involved in the SecF Interaction and Membrane Insertase Activity. *Biochemistry*, *45*(44), 13401–13408.
- Yi, L., Celebi, N., Chen, M., & Dalbey, R. E. (2004). Sec/SRP Requirements and Energetics of Membrane Insertion of Subunits a, b, and c of the *Escherichia coli* F₁F₀ ATP Synthase. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(38), 39260–39267.
- Yi, L., Jiang, F., Chen, M., Cain, B., Bolhuis, A., & Dalbey, R. E. (2003). YidC Is Strictly Required for Membrane Insertion of Subunits a and c of the F₁F₀ ATP Synthase and SecE of the SecYEG Translocase. *Biochemistry*, *42*(35), 10537–10544.
- Yu, Z., Koningstein, G., Pop, A., & Luirink, J. (2008). The Conserved Third Transmembrane Segment of YidC Contacts Nascent *Escherichia coli* Inner Membrane Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(50), 34635–34642.
- Zalisko, B. E., Chan, C., Denic, V., Rock, R. S., & Keenan, R. J. (2017). Tail-Anchored Protein Insertion by a Single Get1/2 Heterodimer. *Cell Reports*, *20*(10), 2287–2293.

-
- Zhang, H., Hsieh, Y., Lin, B., Yu, L., Yang, H., Jiang, C., Sui, S.-f., & Tai, P. C. (2013). Specificity of SecYEG for PhoA precursors and SecA homologs on SecA protein-conducting channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 437(2), 212–216.
- Zhang, X. C., & Han, L. (2016). How does a β -barrel integral membrane protein insert into the membrane? *Protein Cell*, 7(7), 471–477.
- Zheng, Z., Blum, A., Banerjee, T., Wang, Q., Dantis, V., & Oliver, D. (2016). Determination of the Oligomeric State of SecYEG Protein Secretion Channel Complex Using in Vivo Photo- and Disulfide Cross-linking. *Journal of Biological Chemistry*, 291(11), 5997–6010.
- Zhu, L., Kaback, H. R., & Dalbey, R. E. (2013b). YidC Protein, a Molecular Chaperone for LacY Protein Folding via the SecYEG Protein Machinery. *Journal of Biological Chemistry*, 288(39), 28180–28194.
- Zhu, L., Klenner, C., Kuhn, A., & Dalbey, R. E. (2012). Both YidC and SecYEG Are Required for Translocation of the Periplasmic Loops 1 and 2 of the Multispanning Membrane Protein TatC. *Journal of Molecular Biology*, 424(5), 354–367.
- Zhu, L., Wasey, A., White, S. H., & Dalbey, R. E. (2013a). Charge Composition Features of Model Single-span Membrane Proteins That Determine Selection of YidC and SecYEG Translocase Pathways in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 288(11), 7704–7716.
- Zimmer, J., Nam, Y., & Rapoport, T. A. (2008). Structure of a complex of the ATPase SecA and the protein-translocation channel. *Nature*, 455(7215), 936–943.
- Zimmer, J., & Rapoport, T. A. (2009). Conformational flexibility of the ATPase SecA enables peptide interaction and translocation. *Journal of Molecular Biology*, 394(4), 606–612.

6 ANHANG

6 ANHANG

6.1 Sequenzen

6.1.1 DNA- und Proteinsequenz von SecY

Die in der Sequenz markierten Merkmale sind nicht wie hier dargestellt in einer einzigen verwendeten SecY-Variante vorhanden, sondern in unterschiedlichen Sequenzen je nach Bedarf (siehe 2.3.1) enthalten.

	N-terminaler His ₁₀ -Tag
	C ₀ : ersetzte endogene Cysteine (329, 385)
	getestete <i>Cross-Link</i> -Positionen: 122-124; 328
	Fluoreszenzmarkierung M142C
	Transmembrandomänen (nach UniProtKB - P0AGA2)

```

                                His10                                1  2  3  4  5  6  7  8  9
Met HisHisHis HisHisHis HisHisHis HisMetAlaLys GlnProGly LeuAspPhe
1 ATG CATCATC ATCATCATCA TCATCATCAT CATATGGCTA AACACCGGG ATTAGATTTT

10 GlnSerAlaLys GlyGlyLeu GlyGluLeu LysArgArgLeu LeuPheVal IleGlyAla
61 CAAAGTGCCA AAGGTGGCTT AGGCGAGCTG AAACGCAGAC TGCTGTTTGT TATCGGTGCG

30 LeuIleValPhe ArgIleGly SerPheIle ProIleProGly IleAspAla AlaValLeu
121 CTGATTGTGT TCCGTATTGG CTCTTTTATT CCGATCCCTG GTATTGATGC CGCTGTA CTT

50 AlaLysLeuLeu GluGlnGln ArgGlyThr IleIleGluMet PheAsnMet PheSerGly
181 GCCAAACTGC TTGAGCAACA GCGAGGCACC ATCATTGAGA TGTTTAACAT GTTCTCTGGT

                                TM2b
70 GlyAlaLeuSer ArgAlaSer IlePheAla LeuGlyIleMet ProTyrIle SerAlaSer
241 GGTGCTCTCA GCCGTGCTTC TATCTTTGCT CTGGGGATCA TGCCGTATAT TTCGGCGTCG

90 IleIleIleGln LeuLeuThr ValValHis ProThrLeuAla GluIleLys LysGluGly
301 ATCATTATCC AGCTGCTGAC GGTGGTTCAC CCAACGTTGG CAGAAATTAA GAAAGAAGGG

                                122 123 124  TM3
110 GluSerGlyArg ArgLysIle SerGlnTyr ThrArgTyrGly ThrLeuVal LeuAlaIle
361 GAGTCTGGTC GTCGTAAGAT CAGCCAGTAC ACCCGCTACG GTACTCTGGT GCTGGCAATA

                                142
130 PheGlnSerIle GlyIleAla ThrGlyLeu ProAsnMetPro GlyMetGln GlyLeuVal
421 TTCCAGTCGA TCGGTATTGC TACCGGTCTG CCGAATATGC CTGGTATGCA AGGCTGGTGT

150 IleAsnProGly PheAlaPhe TyrPheThr AlaValValSer LeuValThr GlyThrMet
481 ATTAACCCGG GCTTTGCATT CTACTTCACC GCTGTTGTAA GTCTGGTCAC AGGAACCATG

170 PheLeuMetTrp LeuGlyGlu GlnIleThr GluArgGlyIle GlyAsnGly IleSerIle
541 TTCCTGATGT GGTGGGCGA ACAGATTACT GAACGAGGTA TCGGCAACGG TATTTCAATC

190 IleIlePheAla GlyIleVal AlaGlyLeu ProProAlaIle AlaHisThr IleGluGln
601 ATTATCTTCG CCGGTATTGT CGCGGGACTC CCGCCAGCCA TTGCCATAC TATCGAGCAA

```

210 AlaArgGlnGly AspLeuHis PheLeuVal LeuLeuLeuVal AlaValLeu ValPheAla
661 GCGCGTCAAG GCGACCTGCA CTCCTCGTG TTGCTGTTGG TTGCAGTATT AGTATTTGCA

230 ValThrPhePhe ValValPhe ValGluArg GlyGlnArgArg IleValVal AsnTyrAla
721 GTGACGTTCT TTGTTGTATT TGTGAGCGT GGTCAACGCC GCATTGTGGT AAACACTACGC

250 LysArgGlnGln GlyArgArg ValTyrAla AlaGlnSerThr HisLeuPro LeuLysVal
781 AACCGTCAGC AAGGTCGTCG TGTCTATGCT GCACAGAGCA CACATTTGCC GCTGAAAGTG

TM7

270 AsnMetAlaGly ValIlePro AlaIlePhe AlaSerSerIle IleLeuPhe ProAlaThr
841 AATATGGCGG GGGTAATCCC GGCAATCTTC GCTCCAGTA TTATTCTGTT CCCGGCGACC

290 IleAlaSerTrp PheGlyGly GlyThrGly TrpAsnTrpLeu ThrThrIle SerLeuTyr
901 ATCGCGTCAT GGTTCGGGGG CGGTACTGGT TGGAAGTGGC TGACAACAAT TTCGCTGTAT

TM8 328 C₀

310 LeuGlnProGly GlnProLeu TyrValLeu LeuTyrAlaSer AlaIleIle PhePheAla
961 TTGCAGCCTG GGCAACCGCT TTATGTGTTA CTCTATGCGT CTGCAATCAT CTCCTTCGCG

330 PhePheTyrThr AlaLeuVal PheAsnPro ArgGluThrAla AspAsnLeu LysLysSer
1021 TTCTTCTACA CGGCGTTGGT TTTCAACCCG CGTGAAACAG CAGATAACCT GAAGAAGTCC

350 GlyAlaPheVal ProGlyIle ArgProGly GluGlnThrAla LysTyrIle AspLysVal
1081 GGTGCATTTG TACCAGGAAT TCGTCCGGGA GAGCAAACGG CGAAGTATAT CGACAAAGTA

C₀

370 MetThrArgLeu ThrLeuVal GlyAlaLeu TyrIleThrPhe IleSerLeu IleProGlu
1141 ATGACCCGCC TGACCCTGGT TGGTGCGCTG TATATTACCT TTATCTCCCT GATCCCGGAG

390 PheMetArgAsp AlaMetLys ValProPhe TyrPheGlyGly ThrSerLeu LeuIleVal
1201 TTCATGCGTG ATGCAATGAA AGTACCGTTC TACTTCGGTG GGACCTCACT GCTTATCGTT

410 ValValValIle MetAspPhe MetAlaGln ValGlnThrLeu MetMetSer SerGlnTyr
1261 GTTGTCTGTA TTATGGACTT TATGGCTCAA GTGCAAACCTC TAATGATGTC CAGTCAGTAT

430 GluSerAlaLeu LysLysAla AsnLeuLys GlyTyrGlyArg ***
1321 GAGTCTGCAT TGAAGAAGGC GAACCTGAAA GGCTACGGCC GATAA 1365

6.1.2 DNA- und Proteinsequenz von YidC

Die in der Sequenz markierten Merkmale sind nicht wie hier dargestellt in einer verwendeten YidC-Variante vorhanden, sondern in unterschiedlichen Sequenzen je nach Bedarf (siehe 2.3.2) enthalten.

	C-terminaler His ₁₀ -Tag
	C ₀ : ersetztes endogenes Cystein (423)
	getestete <i>Cross-Link</i> -Positionen: 428-434, 498-501
	Positionen der 5S Mutante: 430, 435, 468, 505, 509
	Fluoreszenzmarkierung W23C
	Transmembrandomänen (nach UniProtKB - P25714)

1 MetAspSerGln ArgAsnLeu LeuValIle AlaLeuLeuPhe ValSerPhe MetIleTrp
1 ATGGATTTCG AACGCAATCT TTTAGTCATC GCTTTGCTGT TCGTGTCTTT CATGATCTGG

23

21 GlnAlaTrpGlu GlnAspLys AsnProGln ProGlnAlaGln GlnThrThr GlnThrThr
61 CAAGCC TGGG AGCAGGATAA AAACCCGCAA CCTCAGGCC AACAGACCAC GCAGACAACG

41 ThrThrAlaAla GlySerAla AlaAspGln GlyValProAla SerGlyGln GlyLysLeu
121 ACCACCGCAG CGGGTAGCGC CGCCGACCAG GCGTACCGG CCAGTGGCCA GGGGAACTG

61 IleSerValLys ThrAsnVal LeuAspLeu ThrIleAsnThr ArgGlyGly AspValGlu
181 ATCTCGGTTA AGACCAACGT GCTTGATCTG ACCATCAACA CCCGTGGGGG TGATGTTGAG

81 GlnAlaLeuLeu ProAlaTyr ProLysGlu LeuAsnSerThr GlnProPhe GlnLeuLeu
241 CAAGCTCTGC TGCCTGCTTA CCCGAAAGAG CTGAACTCTA CCCAGCCGTT CCAGCTGTTG

101 GluThrSerPro GlnPheIle TyrGlnAla GlnSerGlyLeu ThrGlyArg AspGlyPro
301 GAACTTCAC CGCAGTTTAT TTATCAGGCA CAGAGCGGTC TGACCGGTCG TGATGGCCCG

121 AspAsnProAla AsnGlyPro ArgProLeu TyrAsnValGlu LysAspAla TyrValLeu
361 GATAACCCGG CTAACGGCCC GCGTCCGCTG TATAACGTTG AAAAAGACGC TTATGTGCTG

141 AlaGluGlyGln AsnGluLeu GlnValPro MetThrTyrThr AspAlaAla GlyAsnThr
421 GCTGAAGGTC AAAACGAACT GCAGGTGCCG ATGACGTATA CCGACGCGGC AGGCAACACG

161 PheThrLysThr PheValLeu LysArgGly AspTyrAlaVal AsnValAsn TyrAsnVal
481 TTTACCAAAA CGTTTGTCTT GAAACGTGGT GATTACGCTG TCAACGTCAA CTACAACGTG

181 GlnAsnAlaGly GluLysPro LeuGluIle SerSerPheGly GlnLeuLys GlnSerIle
541 CAGAACGCTG GCGAGAAACC GCTGGAAATC TCCTCGTTTG GTCAGTTGAA GCAATCCATC

201 ThrLeuProPro HisLeuAsp ThrGlySer SerAsnPheAla LeuHisThr PheArgGly
601 ACTCTGCCAC CGCATCTCGA TACCGGAAGC AGCAACTTCG CACTGCACAC CTTCCGTGGC

221 AlaAlaTyrSer ThrProAsp GluLysTyr GluLysTyrLys PheAspThr IleAlaAsp
661 GCGGCGTACT CCACGCCTGA CGAGAAGTAT GAGAAATACA AGTTTCGATAC CATTGCCGAT

241 AsnGluAsnLeu AsnIleSer SerLysGly GlyTrpValAla MetLeuGln GlnTyrPhe
721 AACGAAAACC TGAACATCTC TTCGAAAGGT GGTGGGTGG CGATGCTGCA ACAGTATTTT

261 AlaThrAlaTrp IleProHis AsnAspGly ThrAsnAsnPhe TyrThrAla AsnLeuGly
781 GCGACGGCGT GGATCCCGCA TAACGACGGT ACCAACAAC TCTATAACCGC TAATCTGGGT

281 AsnGlyIleAla AlaIleGly TyrLysSer GlnProValLeu ValGlnPro GlyGlnThr
841 AACGGCATCG CCGCTATCGG CTATAAATCT CAGCCGGTAC TGTTTCAGCC TGGTTCAGACT

301 GlyAlaMetAsn SerThrLeu TrpValGly ProGluIleGln AspLysMet AlaAlaVal
901 GGCGCGATGA ACAGCACCTT GTGGGTTGGC CCGGAAATCC AGGACAAAAT GGCAGCTGTT

321 AlaProHisLeu AspLeuThr ValAspTyr GlyTrpLeuTrp PheIleSer GlnProLeu
961 GCTCCGCACC TGGATCTGAC CGTTGATTAC GGTGGTTGT GGTTCATCTC TCAGCCGCTG

341 PheLysLeuLeu LysTrpIle HisSerPhe ValGlyAsnTrp GlyPheSer IleIleIle
1021 TTCAAAC TGC TGAAATGGAT CCATAGCTTT GTGGTAACT GGGGCTTCTC CATTATCATC

361 IleThrPheIle ValArgGly IleMetTyr ProLeuThrLys AlaGlnTyr ThrSerMet
1081 ATCACCTTTA TCGTTCGTGG CATCATGTAC CCGCTGACCA AAGCGCAGTA CACCTCCATG

381 AlaLysMetArg MetLeuGln ProLysIle GlnAlaMetArg GluArgLeu GlyAspAsp
1141 GCGAAGATGC GTATGTTGCA GCCGAAGATT CAGGCAATGC GTGAGCGTCT GGGCGATGAC

401 LysGlnArgIle SerGlnGlu MetMetAla LeuTyrLysAla GluLysVal AsnProLeu
1201 AAACAGCGTA TCAGCCAGGA AATGATGGCG CTGTACAAAG CTGAGAAGGT TAACCCGCTG

```

          C0                428 429 430  431 432 433 434  435   TM3
421 GlyGlySerPhe ProLeuLeu IleGlnMet ProIlePheLeu AlaLeuTyr TyrMetLeu
1261 GCGGCCAGCT TCCCGCTGCT GATCCAGATG CCAATCTTCC TGGCCTTGTA CTACATGCTG

441 MetGlySerVal GluLeuArg GlnAlaPro PheAlaLeuTrp IleHisAsp LeuSerAla
1321 ATGGGTTCCTG TTGAAGTTCG TCAGGCACCG TTTGCACTGT GGATCCACGA CCTGTCGGCA

          468
461 GlnAspProTyr TyrIleLeu ProIleLeu MetGlyValThr MetPhePhe IleGlnLys
1381 CAGGACCCGT ACTACATCCT GCCGATCCTG ATGGGCGTAA CGATGTTCTT CATTCAGAAG

          498 499 500
481 MetSerProThr ThrValThr AspProMet GlnGlnLysIle MetThrPhe MetProVal
1441 ATGTCGCCGA CCACAGTGAC CGACCCGATG CAGCAGAAGA TCATGACCTT TATGCCGGTC

          501                505   TM5   509
501 IlePheThrVal PhePheLeu TrpPhePro SerGlyLeuVal LeuTyrTyr IleIleSer
1501 ATCTTCACCG TGTCTTCCT GTGGTTCCTG TCAGGTCTGG TGCTGTACTA TATCATCAGC

521 AsnLeuValThr IleIleGln GlnGlnLeu IleTyrArgGly LeuGluLys ArgGlyLeu
1561 AACCTGGTAA CCATTATTCA GCAGCAGCTG ATTTACCGTG GTCTGGAAAA ACGTGGCCTG

          His10
541 HisSerArgGlu LysLysLys SerHisHis HisHisHisHis HisHisHis His***
1621 CATAGCCGCG AGAAGAAAAA ATCCACCAC CACCACCACC ACCACCACCA CCACTGA

```

6.1.3 DNA- und Proteinsequenz des SecY-YidC-Fusionsproteins

An die SecY-Sequenz (siehe 6.1.1) schließt sich eine Linker-Sequenz an, die die Schnittstelle der PreScission Protease enthält, gefolgt von der YidC-Sequenz (siehe 6.1.2). Das Stop-Codon von SecY sowie das Start-Codon von YidC wurden entfernt. Dargestellt ist nur die Sequenz um den Linker, die restliche SecY- bzw. YidC-Sequenz ist oben dargestellt.

- Ende der SecY-Sequenz (ohne Stop-Codon)
- Linker mit **PreScission Schnittstelle**
- Beginn der YidC-Sequenz (ohne Start-Codon)

```

TyrGlyArgGln LeuLeuGlu ValLeuPhe GlnGlyProGlu LeuHisLeu AspSerGln
TACGGCCGAC AATTGCTGGA AGTGCTGTTT CAGGGCCCGG AATTGCATCT GGATTCGCAA

```

6.1.4 Proteinsequenz von proPhoA

Die Sequenz der verkürzten proPhoA-Variante (1-221) besitzt an Position 222 ein Cystein zur Fluoreszenzmarkierung.

- Signalpeptid
- C-terminaler His₆-Tag
- C₀: ersetzte endogene Cysteine (190, 200)
- Fluoreszenzmarkierung 222C

Signalpeptid



```

1  MKQSTIALAL LPLLFTPVTK ARTPEMPVLE NRAAQGDITA PGGARRLTGD QTAALRDSLS
61  DKPAKNIILL IGDGMGDSEI TAARNYAEGA GGFFKGDIAL PLTGQYTHYA LNKKTGKPDY
121 VTDSAASATA WSTGVKTYNG ALGVDIHEKD HPTILEMAKA AGLATGNVST AELQDATPAA
181 190      200      222 His6
    LVAHVTSRKA YGPSATSEKA PGNALEKGGK GSITEQLLNA R16LEHHHHHH

```

6.1.5 Proteinsequenz von Pf3 coat

Die Sequenz des Pf3 coat Proteins, das für das Insertionsexperiment eingesetzt wurde, trägt im N-terminalen Segment ein Cystein für die Fluoreszenzmarkierung.

 Fluoreszenzmarkierung 16C
 Transmembrandomänen (nach UniProtKB - P03623)

```

1  MQSVITDVTG QLTAV16CADIT TIGGAIIVLA AVVLGIRWIK AQFF 44

```

6.2 Abkürzungen

Å	Ångström
ADP	Adenosindiphosphat
AFM	<i>atomic force microscopy</i> , Raster-Kraft-Mikroskopie
Alb3	Albino-3
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Ara	Arabinose
ATP	Adenosintriphosphat
CL	Cardiolipin
CMC	<i>critical micelle concentration</i> ; Kritische Mizellbildungskonzentration
Cu-P	Kupfer-Phenanthrolin
CV	<i>column volume</i> ; Säulenvolumen
Da	Dalton
DDM	n-Dodecyl β-D-maltosid

DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
DOPC	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DTNB	5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)
DTT	Dithiothreitol
DUF	<i>Domain of Unknown Function</i> ; YidC-Homolog Archaeen
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> ; Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskop
EMC	<i>ER membrane complex</i> ; ER Membrankomplex
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> ; und andere
Ffh	<i>fiftyfour-homolog</i> ; 54-Homolog
Glc	Glukose
HCl	Hydrogenchlorid; Salzsäure
His-Tag	Polyhistidin-Tag
IMAC	<i>immobilized metal ion affinity chromatography</i> ; Metallchelat-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
LB	Luria Bertani
M	molar
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
Ni	Nickel
NTA	<i>nitrilotriacetic acid</i> ; Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
OM-Proteine	<i>outer membrane</i> -Proteine; Membranproteine der äußeren Membran
Oxa1	<i>Oxidase assembly</i> ; mitochondriales YidC-Homolog
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> ; phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol

PMF	<i>proton motive force</i> ; protonenmotorische Kraft
PMFS	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	<i>ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
SEC	<i>size-exclusion chromatography</i> ; Größenausschluss-Chromatographie
SMFS	<i>single-molecule force spectroscopy</i> ; Einzelmolekül-Kraftspektroskopie
SRP	<i>signal recognition particle</i> ; Signalerkennungspartikel
Staph A	<i>Staphylococcus aureus</i> Protein A
TAT	<i>twin arginine translocase</i>
TCA	<i>trichloroacetic acid</i> ; Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembrandomäne(n)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett
WT	Wildtyp
α	alpha, anti

PUBLIKATIONEN

Teile der Arbeit wurden veröffentlicht:

Serdiuk, T., **Studle, A.**, Mari, S. A., Manioglu, S., Kaback, H. R., Kuhn, A., & Müller, D. J. (2019). Insertion and folding pathways of single membrane proteins guided by translocases and insertases. *Science Advances*, 5(1), eaau6824.

Teile der Arbeit wurden präsentiert:

Cooperative membrane insertion by SecYEG and YidC. Posterpräsentation.

Gordon Conference, Galveston USA, 2018: Protein Transport Across Cell Membranes

Bacterial Protein Export, Leuven Belgien, 2018: Bacterial Protein Export

DANKSAGUNG

Zu allererst bedanke ich mich bei **Herrn Prof. Dr. Andreas Kuhn** für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit an seinem Institut durchführen zu können. Vielen Dank für Ihre Betreuung, die Unterstützung und Motivation und Ihre immer offene Tür.

Ein riesiges Dankeschön geht an Gisela Nagler. Liebe **Gisela**, vielen Dank für die schöne und unterhaltsame Zeit mit dir im Labor. Danke für deine Unterstützung, egal ob moralisch, fachlich oder einfach nur, wenn mich die SDS-Gele mal wieder zur Verzweiflung gebracht haben. Ich konnte mich immer auf dich verlassen und hätte mir keine bessere Labornachbarin wünschen können.

Wenn aus Kollegen Freunde werden... Vielen Dank an meine Mitstreiter **Farina, Max, Eva, Sabrina** und **Sandra** für das Zusammenhalten und sich gegenseitig unterstützen, für viele hilfreiche Diskussionen und vor allem für viele schöne Tage und lustige Abende. **Farina**, danke für die Unterstützung auf unterschiedlichste Art und Weise über die gesamte Zeit meiner Doktorarbeit und das gemeinsame Cola trinken, wenn morgens auch mal gar nichts mehr ging. **Max**, danke für die Rettung, wenn das Fluorolog einfach nicht so wollte wie ich und sogar danke für das ab und zu 'mich mit einem Satz auf die Palme bringen'. Genauso möchte ich mich bei **Betty, Renate, Simone, Doro, Markus, Domenico und allen weiteren Kollegen des Instituts 250a** für die Unterstützung und schöne Zeit bedanken. Nicht vergessen werden darf die beste Laborhündin Lusi, die immer für gute Laune gesorgt hat. Ohne euch alle wäre die Zeit nur halb so schön gewesen. Ihr habt die Latte für alle zukünftigen Kollegen weit hoch gelegt.

Zum Schluss möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken. **Mama** und **Papa**, danke für eure unendliche Unterstützung über all die Jahre und dass ihr immer an mich geglaubt habt. **Oma** und **Opa**, der Dank geht ebenso an euch. **Jasmin**, danke für dein unermüdliches Korrektur-Lesen. **Manu**, danke, dass du immer für mich da bist, und das weit über das Lösen meiner Computer-Probleme hinaus. **Benni, Jasmin, Kathrin** und **Mandy**, danke, dass ihr mich immer wieder motiviert habt. Studentenreitgruppe Hohenheim, danke, dass ihr mich ab und zu für ein Wochenende aus der Realität geholt habt.

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name Anja Steudle
Geburtstag und –ort 23.10.1986 in Esslingen am Neckar
Staatsangehörigkeit Deutschland

Ausbildung

seit 10/2013 Promotion "Funktion und Dynamik eines gemeinsamen Insertionskomplexes der Sec-Translokase und YidC-Insertase in der bakteriellen Membran.", Universität Hohenheim, Institut für Mikrobiologie, Prof. Dr. rer. nat. Andreas Kuhn

10/2013-09/2019 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Universität Hohenheim, Institut für Mikrobiologie, Prof. Dr. rer. nat. Andreas Kuhn

10/2012-07/2013 Masterarbeit "Interaktionen der Membrantranslokase SecYEG mit MscL.", Universität Hohenheim, Institut für Mikrobiologie, Prof. Dr. rer. nat. Andreas Kuhn

12/2011-03/2012 Projektarbeit "Einzelcystein-Mutanten im SecY *lateral gate* zur Untersuchung der Substratfreisetzung in die Membran mittels Crosslink mit MscL.", Universität Hohenheim, Institut für Mikrobiologie, Prof. Dr. rer. nat. Andreas Kuhn

10/2010-09/2013 Studium der Enzym-Biotechnologie, Universität Hohenheim
Abschluss: Master of Science

02/2010-08/2010 Bachelorarbeit "Entwicklung eines Immunoassays zum Nachweis von SDF1- α .", Ibt – immunological and biochemical testsystems GmbH, Reutlingen, Prof. Dr. rer. nat. Winfried Linxweiler

09/2008-02/2009 Praxissemester am Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB, Abteilung Molekulare Biotechnologie

09/2006-08/2010 Studium der Biotechnologie, Hochschule Esslingen
Abschluss: Bachelor of Science

09/1997-06/2006 Heinrich-Heine-Gymnasium, Ostfildern-Nellingen
Abschluss: Abitur

Stuttgart, 04.11.2020
Ort und Datum


Unterschrift

ERKLÄRUNG

Eidesstattliche Versicherung gemäß § 7 Absatz 7 der Promotionsordnung der Universität Hohenheim zum Dr. rer. nat.

1. Bei der eingereichten Dissertation zum Thema

Funktion und Dynamik eines gemeinsamen Insertionskomplexes der Sec-Translokase und
YidC-Insertase in der bakteriellen Membran

handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner
unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus
anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.

3. Ich habe nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung oder -beratung in
Anspruch genommen.

4. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und der strafrechtlichen Folgen einer
unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärung bestätige ich: Ich versichere an Eides statt, dass
ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Stuttgart, 04.11.2020

Ort und Datum



Unterschrift

Eidesstattliche Versicherung, Belehrung

Die Universität Hohenheim verlangt eine Eidesstattliche Versicherung über die Eigenständigkeit der erbrachten wissenschaftlichen Leistungen, um sich glaubhaft zu versichern, dass die Promovendin bzw. der Promovend die wissenschaftlichen Leistungen eigenständig erbracht hat.

Weil der Gesetzgeber der Eidesstattlichen Versicherung eine besondere Bedeutung beimisst und sie erhebliche Folgen haben kann, hat der Gesetzgeber die Abgabe einer falschen eidesstattlichen Versicherung unter Strafe gestellt. Bei vorsätzlicher (also wissentlicher) Abgabe einer falschen Erklärung droht eine Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder eine Geldstrafe.

Eine fahrlässige Abgabe (also Abgabe, obwohl Sie hätten erkennen müssen, dass die Erklärung nicht den Tatsachen entspricht) kann eine Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder eine Geldstrafe nach sich ziehen.

Die entsprechenden Strafvorschriften sind in § 156 StGB (falsche Versicherung an Eides Statt) und in § 161 StGB (Fahrlässiger Falscheid, fahrlässige falsche Versicherung an Eides Statt) wiedergegeben.

§ 156 StGB: Falsche Versicherung an Eides Statt

Wer vor einer zur Abnahme einer Versicherung an Eides Statt zuständigen Behörde eine solche Versicherung falsch abgibt oder unter Berufung auf eine solche Versicherung falsch aussagt, wird mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft.

§ 161 StGB: Fahrlässiger Falscheid, fahrlässige falsche Versicherung an Eides Statt

Abs. 1: Wenn eine der in den §§ 154 und 156 bezeichneten Handlungen aus Fahrlässigkeit begangen worden ist, so tritt Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder Geldstrafe ein.

Abs. 2: Straflosigkeit tritt ein, wenn der Täter die falsche Angabe rechtzeitig berichtigt. Die Vorschriften des § 158 Absätze 2 und 3 gelten entsprechend.

Ich habe die Belehrung zur Eidesstattlichen Versicherung zur Kenntnis genommen.

Stuttgart, 04.11.2020

Ort und Datum



Unterschrift

