

Funktionelle Charakterisierung der TatB-Untereinheit der thylakoidären Tat-Translokase

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Sarah Zinecker

geb. am 14.01.1991 in Halle (Saale)

Die Arbeit wurde begutachtet von:

Prof. Dr. Ralf Bernd Klösgen

Prof. Dr. Gary Sawers

Prof. Dr. Roland Freudl

Die öffentliche Verteidigung erfolgte am 20.11.2020.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I

Abbildungsverzeichnis V

Abkürzungsverzeichnis VIII

Zusammenfassung X

1 Einleitung 1

1.1 Intrazelluläre Kompartimentierung und Membrantransport in Chloroplasten1

1.2 Transitpeptide für den Transport kernkodierter Proteine in Chloroplasten2

1.2.1 *Eigenschaften der stromadirigierenden und thylakoiddirigierenden Domänen*2

1.3 Der Transport über die chloroplastidäre Hüllmembran4

1.4 Proteintransport an der Thylakoidmembran6

1.4.1 *Integration von Proteinen in die Thylakoidmembran*6

1.4.1.1 *Spontane Insertion von Proteinen in die Thylakoidmembran*6

1.4.1.2 *SRP-abhängige Insertion von Proteinen in die Thylakoidmembran*7

1.4.2 *Translokation von Proteinen über die Thylakoidmembran*8

1.4.2.1 *Sec-abhängige Proteintranslokation*8

1.4.2.2 *Tat-abhängige Proteintranslokation*9

Die Identifizierung der Tat-Komponenten9

Topologie und Struktur der Tat-Komponenten10

Derivate des TatABC-Systems12

Tat-Substrate12

Faltungs- und Kofaktorkontrolle13

Der TatBC-Rezeptorkomplex15

Die Tat-Translokase16

Der Mechanismus des Tat-Transports17

Modelle zur Funktionsweise der Tat-Komponenten im Transportprozess18

1.5 *In thylakoido-Rekonstitutionsversuche zur Untersuchung des Tat-Transports*20

1.6 Zielstellung21

2 Material und Methoden22

2.1 Material22

2.1.1 *Chemikalien*22

2.1.2 *Längenstandards*22

2.1.3 *Enzyme*22

2.1.4 *Reaktionskits*22

2.1.5 *Dialyseschläuche*23

2.1.6 *Membranen*23

2.1.7 *Zellaufschluss*23

2.1.8	Affinitätschromatographie	23
2.1.9	RP-HPLC	23
2.1.10	Nukleotide	24
2.1.11	Vektoren	24
2.1.12	Oligonukleotide	24
2.1.13	Klone	26
2.1.13.1	Tat-Substrate	26
2.1.13.2	Tat-Komponenten	26
2.1.14	Bakterienstämme	28
2.1.15	Kulturmedien	28
2.1.16	Antibiotika	29
2.1.17	Antikörper	29
2.1.18	Pflanzenmaterial	30
2.2	Methoden	30
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	30
2.2.1.1	Standardmethoden	30
2.2.1.2	Restriktionsfreie Klonierung	30
2.2.1.3	Zielgerichtete Mutagenese	30
2.2.1.4	Transformation von <i>E. coli</i> Zellen	31
	Elektroporation für elektrokompetente Zellen	31
	Hitzeschock für chemokompetente Zellen.....	31
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden	31
2.2.2.1	<i>In vitro</i> -Synthese von Proteinen	31
2.2.2.2	Polyacrylamid-Gelsysteme	32
2.2.2.3	Heterologe Synthese von Tat-Proteinen.....	33
2.2.2.4	Heterologe Synthese von Tat _{B_M} in Anwesenheit von ³⁵ S-Methionin	34
2.2.2.5	Reinigung von His-tag-Fusionsproteinen mittels Ni ²⁺ -Affinitätschromatographie.....	34
2.2.2.6	Reinigung von radioaktiv markierten His-Tat _{B_M} -Fusionsproteinen mittels Ni ²⁺ Affinitätschromatographie.....	35
2.2.2.7	Abspaltung der N-terminalen tag-Region	36
	Bromcyanspaltung.....	37
	Proteasespaltung (Ulp1).....	37
2.2.2.8	Präparative SDS-PAGE.....	37
2.2.2.9	Elektroelution	38
2.2.2.10	RP-HPLC.....	38
2.2.2.11	Massenspektrometrie	39
2.2.2.12	Dialyse gereinigter Tat-Proteine	39
2.2.2.13	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	39
2.2.2.14	Visualisierung von Proteinen im Polyacrylamidgel	40
	Coomassie-Colloidal-Färbung.....	40
	Zink-Imidazol-Färbung.....	40
2.2.2.15	Autoradiographie	41
2.2.2.16	Ni ²⁺ -Affinitätschromatographie zur Reinigung von Antikörpern	41
2.2.2.17	Western Blot	41
2.2.3	Methoden zur Aufarbeitung von Pflanzenmaterial	43
2.2.3.1	Isolierung von Chloroplasten aus Erbsenkeimlingen	43
2.2.3.2	Bestimmung der Chlorophyllkonzentration.....	44
2.2.3.3	In organello-Transportversuche	44
2.2.3.4	Präparation von Thylakoiden	46

2.2.3.5	<i>Inhibierung des Tat-Transports durch Antikörperbehandlung der Thylakoide</i>	46
2.2.3.6	<i>In thylakoido-Transportversuche</i>	46
2.2.3.7	<i>Rekonstitution des Tat-Transports durch Zugabe von TatA- oder TatB-Varianten</i>	47
2.2.3.8	<i>Solubilisierung von Proteinkomplexen aus Thylakoidmembranen</i>	47
2.2.3.9	<i>Extraktion von Proteinen aus Thylakoidmembranen</i>	48
3	Ergebnisse	49
3.1	Funktionelle Rekonstitution von TatB in Erbsenthylakoiden	49
3.1.1	<i>Heterologe Synthese und Reinigung des TatB-Antigens</i>	49
3.1.2	<i>Rekonstitution des Tat-Transports mit in vitro synthetisiertem TatB</i>	50
3.1.3	<i>Heterologe Synthese und Reinigung von TatA- und TatB-Varianten</i>	54
3.1.4	<i>Rekonstitution des Tat-Transports mit gereinigtem TatB</i>	56
3.1.5	<i>Stabilität der Antikörperbindung im in thylakoido-Rekonstitutionsversuch</i>	59
3.2	Assemblierung von TatB in TatBC-Komplexe	61
3.2.1	<i>Assemblierung von radioaktiv-markiertem TatB</i>	61
3.2.2	<i>Assemblierung von gereinigtem TatB</i>	62
3.2.3	<i>Vergleich verschiedener Expressionssysteme zur Synthese von TatB</i>	63
3.2.4	<i>Rekonstitution des Tat-Transports mit gereinigtem TatB_M</i>	65
3.2.5	<i>Heterologe Synthese von radioaktiv markiertem TatB_M</i>	66
3.2.6	<i>Assemblierung von gereinigtem, radioaktiv markiertem TatB_M</i>	67
3.3	Untersuchung der TatB-Funktion und Analyse von TatB-Varianten	70
3.3.1	<i>Der konservierte Glutamatrest in der TMH von TatB ist nicht essentiell für die Transportrekonstitution</i>	70
3.3.2	<i>Kinetik des Tat-Transports nach TatB-vermittelter Rekonstitution</i>	73
3.3.3	<i>Konzentrationsabhängigkeit der TatB-Rekonstitution und Vergleich zu TatB,E10C</i>	74
3.3.4	<i>TatB aus A. thaliana rekonstituiert den Tat-Transport in Erbsenthylakoiden</i>	77
3.3.5	<i>Die unstrukturierte C-terminale Region von TatB aus P. sativum ist nicht essentiell für die Rekonstitution des Tat-Transports</i>	78
3.4	TatA als kritischer Faktor im in thylakoido-System	80
3.4.1	<i>Die TatA-Menge ist im Tat-Transport limitiert</i>	80
3.4.2	<i>Die TatA-Menge ist in der TatB-vermittelten Rekonstitution des Tat-Transports limitiert</i>	84
3.5	TatB kann im in thylakoido-Transport die Funktion von TatA übernehmen	87
3.5.1	<i>Rekonstitution des Tat-Transports anti-TatA-behandelter Thylakoide mit TatB</i>	87
3.5.2	<i>TatA und TatB rekonstituieren den Tat-Transport NaBr-behandelter Thylakoide</i>	89
3.6	TatAB-Chimären zur Identifizierung funktionell wichtiger Bereiche in den Proteinen TatA und TatB 91	
3.6.1	<i>SDS-PAGE- und Blue Native-PAGE-Analyse thylakoidgebundener TatAB-Chimären</i>	93
3.6.2	<i>Membranstabilität der TatAB-Chimären</i>	94
3.6.3	<i>Rekonstitution des Tat-Transports anti-TatA und anti-TatB-behandelter Thylakoide mit TatAB-Chimären</i>	97

4	Diskussion	99
4.1	Lösliches TatB vermittelt die funktionelle Rekonstitution des Tat-Transports anti-TatB-behandelter Thylakoide.....	99
4.2	Die Bedeutung des Glutamatrests in der TMH von TatA und TatB.....	102
4.3	Die Rolle des C-Terminus von TatB für den Tat-abhängigen Proteintransport	104
4.4	Die TatA-Menge als limitierender Faktor in der TatB-vermittelten Transportrekonstitution	106
4.5	Variabilität des Tat-Transports in <i>in thylakoido</i> -Rekonstitutionsversuchen.....	108
4.6	TatA vs. TatB – Gemeinsamkeiten und Unterschiede	109
4.6.1	<i>Proteinbedarf im Translokationsprozess.....</i>	<i>109</i>
4.6.2	<i>Membranintegration von TatA und TatB</i>	<i>110</i>
4.6.3	<i>Proteinfunktion von TatA und TatB</i>	<i>112</i>
4.6.4	<i>Identifikation funktionell wichtiger Bereiche von TatA und TatB.....</i>	<i>114</i>
4.7	Schlussbemerkungen.....	117
5	Literaturverzeichnis	118
	Publikationen	139
	Danksagung	140
	Erklärung	143
	Lebenslauf	144
	Anhang	145

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung von kernkodierten chloroplastidären Vorläuferproteinen..... 3

Abbildung 1.2: Verschiedene Transportwege im Chloroplasten 4

Abbildung 1.3: Topologie der Tat-Proteine..... 11

Abbildung 1.4: Modell zum Mechanismus des thylakoidären Tat-Transports 17

Abbildung 2.1: Aufbau eines Western-Blots 42

Abbildung 3.1: Heterologe Synthese und Reinigung des TatB-Antigens 50

Abbildung 3.2: Schematische Darstellung von *in thylakoido*-Transportversuchen..... 51

Abbildung 3.3: Rekonstitution des Tat-Transports mit *in vitro* synthetisiertem TatB 53

Abbildung 3.4: Heterologe Synthese und Reinigung verschiedener TatA- und TatB-Varianten 55

Abbildung 3.5: Rekonstitution des Tat-Transports mit gereinigtem TatB 56

Abbildung 3.6: Mögliche Mechanismen der TatB-vermittelten Rekonstitution des Tat-Transports 69

Abbildung 3.7: Stabilität der Antikörperbindung..... 70

Abbildung 3.8: *Blue Native*-PAGE-Analyse von radioaktiv markierten TatBC-Rezeptorkomplexen 71

Abbildung 3.9: Vergleich der heterologen Synthese von SUMO-Tat_{B_M} und *tag*-TatB unter Nutzung des pETSUMO- und des pET30a-Systems mit anschließender Reinigung..... 64

Abbildung 3.10: Rekonstitution des Tat-Transports anti-TatB-behandelter Thylakoide mit gereinigtem TatB und Tat_{B_M}..... 66

Abbildung 3.11: Heterologe Synthese und Reinigung von radioaktiv markiertem SUMO-Tat_{B_M} 67

Abbildung 3.12: Membranbindung und -integration von gereinigtem und radioaktiv markiertem SUMO-Tat_{B_M} bzw. Tat_{B_M} 68

Abbildung 3.13: Membranbindung und -integration von *in vitro* synthetisiertem und radioaktiv markiertem TatB,E10A bzw. TatB,E10C..... 71

Abbildung 3.14: Rekonstitution des Tat-Transports anti-TatB-behandelter Thylakoide mit gereinigten TatB-Varianten	72
Abbildung 3.15: Kinetik des Tat-Transports unbehandelter und rekonstituierter Thylakoide	74
Abbildung 3.16: Quantifizierung des TatB-Bedarfs.....	76
Abbildung 3.17: Vergleich der Rekonstitution des Tat-Transports anti-TatB-behandelter Thylakoide mit gereinigten TatB aus <i>P. sativum</i> und <i>A. thaliana</i>	77
Abbildung 3.18: Blue Native-PAGE-Analyse von Thylakoiden nach <i>in organello</i> -Transport von TatB und TatC aus <i>P. sativum</i> und <i>A. thaliana</i>	78
Abbildung 3.19: Vergleich der Rekonstitution des Tat-Transports anti-TatB-behandelter Thylakoide mit gereinigten TatB bzw. TatB-core aus <i>P. sativum</i> und <i>A. thaliana</i>	79
Abbildung 3.20: Transport von pOEC16 in Thylakoide nach Durchführung verschiedener Waschschrirte	81
Abbildung 3.21: Detektion von TatA in Thylakoiden nach Durchführung verschiedener Waschschrirte	82
Abbildung 3.22: Untersuchungen zur Extraktion von TatA und TatB aus Thylakoidmembranen in Folge von Waschungen	83
Abbildung 3.23: Rekonstitution des Tat-Transports anti-TatB-behandelter Thylakoide mit TatB unter Zugabe von TatA und TatA,E10C	85
Abbildung 3.24: Rekonstitution des Tat-Transports anti-TatB und anti-TatA-behandelter Thylakoide mit gereinigten TatB aus <i>P. sativum</i> , TatA und TatA,E10C aus <i>A. thaliana</i>	88
Abbildung 3.25: Rekonstitution des Tat-Transports NaBr-behandelter Thylakoide mit gereinigtem TatA aus <i>A. thaliana</i> und TatB aus <i>P. sativum</i>	90
Abbildung 3.26: Aufbau von TatA, TatB und TatAB-Chimären aus <i>P. sativum</i>	92
Abbildung 3.27: Membranbindung und -integration von <i>in vitro</i> synthetisiertem und radioaktiv markiertem TatA, TatB, TatAB und TatBA	94
Abbildung 3.28: Membranstabilität von TatA, TatB, TatAB und TatBA	96
Abbildung 3.29: Rekonstitution des Tat-Transports anti-TatB und anti-TatA-behandelter Thylakoide mit gereinigten TatA, TatAB, TatBA und TatB aus <i>P. sativum</i>	98
Abbildung 4.1: <i>In thylakoido</i> -Rekonstitution des Tat-Transports	100
Abbildung 4.2: Analyse der Hydrophobizität von TatA und TatB aus <i>P. sativum</i>	106

Abbildung 4.2: Analyse der Hydrophobizität von TatB aus *A. thaliana* und *P. sativum*..... **106**

Abbildung 4.3: Analyse der Hydrophobizität und des hydrophoben Moments von TatA und TatB aus *P. sativum* **111**

Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
anti-TatA	TatA-spezifischer Antikörper
anti-TatB	TatB-spezifischer Antikörper
APH	Amphipathische Helix
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
A_{xnm}	Absorption bei x nm
BN	<i>Blue Native</i>
BrCN	Bromcyan
BSA	Bovines Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
C-Terminus	Carboxyterminus
Da	Dalton
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
fw	<i>forward</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h-Domäne	hydrophobe Domäne
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethansulfonsäure
HM	HEPES + Magnesium
HME	HME: HEPES + Magnesium + EDTA
H ₂ O _{bidest}	bidestilliertes Wasser
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IMAC	Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatografie
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
K _m	Michaelis-Konstante
LB	Luria Bertani
LHC	Lichtsammelkomplex (<i>light harvesting complex</i>)
m	maures Protein (<i>mature protein</i> ; in Abbildungsbeschriftungen)
N-Terminus	Aminoterminus
NMR	Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
OD	optische Dichte
OEC	<i>oxygen evolving complex</i>
OEC16	16 kDa-Untereinheit des Wasserspaltungsapparates
OEC23	23 kDa-Untereinheit des Wasserspaltungsapparates
p	<i>precursor</i> (Vorläuferprotein; in Abbildungsbeschriftungen)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pBsc	pBluescript-Vektor

PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
psi	<i>pounds per square inch</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RP-HPLC	<i>reversed phase high-performance liquid chromatography</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RTS	<i>Rapid Translation System</i>
rv	<i>reverse</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
Sec	<i>secretory</i>
SIM	Saccharose-Isolationsmedium
SOC	<i>super optimal catabolite</i>
SPP	stromale Prozessierungspeptidase
SRM	Sorbit-Reisolationsmedium
SRP	<i>signal recognition particle</i>
STD	stromadirigierende Domäne (stroma targeting domain)
t	<i>in vitro</i> -Translation
Tat	<i>twin-arginine translocation</i>
term.	terminal
TEMED	<i>N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin</i>
Ti-1	Translokationsintermediat 1
Ti-2	Translokationsintermediat 2
TIC	<i>translocon of the inner envelope membrane of chloroplasts</i>
TMH	Transmembranhelix
TOC	<i>translocon of the outer envelope membrane of chloroplasts</i>
TPP	thylakoidäre Prozessierungspeptidase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTD	thylakoiddirigierende Domäne (<i>thylakoid targeting domain</i>)
ÜS	Überstand
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Masse/Volumen
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung ($g = 9,81 \text{ m/s}^2$)
ΔpH	Protonengradient
$\Delta\Psi$	Membranpotenzial

Zusammenfassung

Das pflanzliche Tat-System (*twin-arginine translocation*) beinhaltet die Membranproteine TatA, TatB und TatC und ermöglicht die Translokation vollständig gefalteter Proteine über die ionendichte Thylakoidmembran. Der Transportprozess wird ausschließlich über ein Membranpotential, das über einen Protonengradienten (ΔpH) und/oder elektrochemischen Gradienten ($\Delta\Psi$) erzeugt wird, energetisiert. Namensgebend für den Tat-Translokationsweg ist das charakteristische Zwillingsargininmotiv im Transitpeptid der Vorläuferproteine. Während TatB und TatC einen Rezeptorkomplex zur Bindung der Tat-Substrate bilden, interagiert TatA transient mit TatBC-Substrat-Komplexen und vermittelt mit diesen über einen bisher unbekanntem Mechanismus die Translokation der Tat-Substrate.

Diese Arbeit beinhaltet die Analyse der Funktion des TatB-Proteins mit Hilfe des sogenannten *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuchs, der bereits zur Untersuchung der TatA-Aktivität angewendet wurde (Hauer et al., 2013).

Dafür wurde die intrinsische TatB-Funktion in isolierten Thylakoiden aus Erbsenkeimlingen durch Inkubation mit TatB-spezifischem Antikörper inhibiert. Diese Behandlung führte zur vollständigen Blockierung des Tat-Transports, der durch die Zugabe von *in vitro* synthetisiertem bzw. heterolog synthetisiertem und gereinigtem TatB rekonstituiert werden konnte. Es handelt sich hierbei um eine funktionelle Rekonstitution, da ausgeschlossen wurde, dass die Wiederherstellung des Tat-Transports auf einer Reaktivierung des intrinsischen TatB-Proteins beruht.

Da TatB Bestandteil des integralen TatBC-Rezeptorkomplexes ist, ist anzunehmen, dass die TatB-vermittelte Transportrekonstitution auf einer funktionellen Assemblierung des zugegebenen Proteins in den heterooligomeren Komplex basiert. Für *in vitro* synthetisiertes und radioaktiv markiertes TatB konnte die Assemblierung in TatBC-Komplexe bereits mittels *Blue Native*-PAGE-Analyse gezeigt werden (Fincher et al., 2003). In dieser Arbeit wurde außerdem die Assemblierung von heterolog synthetisiertem und gereinigtem TatB in TatBC-Komplexe nachgewiesen.

Interessanterweise vermittelten die TatB-Varianten TatB,E10A und TatB,E10C eine Transportrekonstitution, obwohl die Assemblierung der Proteine in TatBC-Komplexe nicht nachgewiesen werden konnte. Es ist denkbar, dass diese nicht vollständig gestört, sondern nicht detektierbar ist.

Im nächsten Schritt wurde mit Hilfe des *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuchs der TatB-Bedarf des zugegebenen TatB-Proteins während des Tat-Transports bestimmt. Der ermittelte Km-Wert, der die TatB-Konzentration angibt, die den halbmaximalen rekonstituierten Transport vermittelt, liegt für TatB bei 0,15 μM und ist zu TatA vergleichbar ($K_m = 0,12 \mu\text{M}$ in Hauer et al., 2013). Somit ist wahrscheinlich, dass TatA und TatB in äquimolaren Mengen im Translokationsprozess benötigt werden.

Ein wesentlicher Unterschied zur TatA-vermittelten Transportrekonstitution ist jedoch, dass mit TatB-Zugabe zu anti-TatB-behandelten Thylakoiden keine vollständige Rekonstitution erreicht werden kann. Wenn aber zusätzlich TatA zum Transportansatz hinzugegeben wurde, wurde eine zu Kontrollreaktionen vergleichbare TatB-Rekonstitution erreicht. Es liegt nahe, dass TatA aufgrund von Waschschritten in *in thylakoido*-Versuchen partiell aus der Thylakoidmembran extrahiert wird und so im Rekonstitutionsversuch limitiert ist.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TatB eine TatA-Aktivität aufweist, wohingegen TatA allein keine TatB-Rekonstitution vermittelt. Die Bifunktionalität von TatB im *in thylakoido*-System ist eine völlig neue und für die Diskussion der TatA-Funktion möglicherweise fundamental bedeutende Beobachtung.

Mit Hilfe von chimären TatAB-Proteinen konnte abschließend gezeigt werden, dass die APH von TatB essentiell für die Funktion des TatB-Proteins ist.

1 Einleitung

1.1 Intrazelluläre Kompartimentierung und Membrantransport in Chloroplasten

In prokaryotischen und eukaryotischen Zellen laufen gleichzeitig zahlreiche biochemische Reaktionen ab, die zum einen grundlegend verschieden und zum anderen auch gegenläufig sein können. Im Laufe der Evolution erfolgte daher die Separierung dieser intrazellulären Prozesse.

Eine Strategie dafür umfasst die räumliche Konzentrierung von Enzymen, die die konzertierte Katalyse spezifischer Reaktionen ermöglichen. Diese mehrkomponentigen Enzymkomplexe liegen z. B. bei der Synthese von DNA, RNA und Proteinen vor. Eine weitere Möglichkeit zur Organisation von verschiedenen Stoffwechselprozessen und zugehörigen Komponenten beinhaltet die räumliche Trennung durch Membranen (Singer und Nicolson, 1972). Während das Cytoplasma aller Prokaryoten von einer Membran umgeben ist, weisen gram-negative Bakterien zusätzlich eine äußere Membran auf, die die Existenz des periplasmatischen Reaktionsraums bedingt. In Eukaryoten liegen u. a. die Kompartimente Nukleus, Endoplasmatisches Reticulum, Dictyosomen, Lysosomen, Peroxisomen, Mitochondrien und in pflanzlichen Zellen Chloroplasten vor. Jedes Organell vollführt spezifische Funktionen, die mit der Notwendigkeit einer einzigartigen Proteinumgebung einhergehen. Die Synthese erforderlicher Proteine erfolgt dabei hauptsächlich im Cytosol, doch auch in Mitochondrien und Chloroplasten werden Proteine synthetisiert. Nach der Endosymbiotentheorie stammen Mitochondrien und Chloroplasten von ehemals eigenständigen Eubakterien ab, die von einzelligen Protoeukaryoten aufgenommen wurden (Schimper, 1883; Mereschkowsky, 1905; Margulis, 1970; Gray und Doolittle, 1982). Ein Großteil der ursprünglich chloroplastidären Gene wurde in den Kern des eukaryotischen Wirts transferiert (Leister, 2003). So weisen Mitochondrien und Plastiden lediglich ein Restgenom auf und nicht alle in den Organellen benötigten Proteine werden vor Ort synthetisiert. Daher werden nur ca. 5 % der mehr als 3000 in Chloroplasten vorliegenden Proteine im Organell synthetisiert (Leister, 2003; Shi und Theg, 2013).

1.2 Transitpeptide für den Transport kernkodierter Proteine in Chloroplasten

Die kernkodierten Proteine werden im Cytoplasma als sog. Vorläuferproteine mit N-terminalen Transitpeptiden synthetisiert (McFadden, 1999; Bruce, 2000), wobei diese „Adressanhänger“ eine Interaktion mit der Translokationsmaschinerie des Zielorganells und somit den Transport ermöglichen (Sveshnikova et al., 2000; Hinnah et al., 2002; Inaba et al., 2003; Smith et al., 2004). Sog. einfache Transitpeptide, die den Transport des Proteins nur über die äußere und innere Hüllmembran der Chloroplasten in das Stroma vermitteln, weisen eine stromadirigierende Domäne (STD; *stroma targeting domain*) auf, die nach Translokation von der stromalen Prozessierungspeptidase (SPP) abgespalten wird (Perry und Keegstra, 1994; Robinson und Ellis, 1984; Richter und Lamppa 1998).

Liegt der finale Bestimmungsort des kernkodierten Proteins in der Thylakoidmembran oder im -lumen, trägt das Vorläuferprotein in der Regel ein zusammengesetztes Transitpeptid: Zusätzlich zur STD liegt eine thylakoiddirigierende Domäne (TTD) vor (Smeekens et al., 1986; Hagemann et al., 1990). Nach Abspaltung der STD fungiert die TTD als Sortiersignal für den Weitertransport des Proteins (Ko & Cashmore, 1989). Die Prozessierung von Proteinen mit thylakoidärer Lokalisation erfolgt zumeist durch die membranständige, thylakoidäre Prozessierungspeptidase (TPP; Hagemann et al., 1986; Kirwin et al., 1987, 1988). Prozessierte Proteine werden als reife bzw. mature Proteine bezeichnet.

1.2.1 *Eigenschaften der stromadirigierenden und thylakoiddirigierenden Domänen*

STDs weisen keine konservierten Sequenzmotive auf und die Länge der Peptide variiert. Aussagen über die Abundanz bestimmter Aminosäuren sind jedoch möglich: So wurde ein erhöhtes Aufkommen der hydroxylierten Aminosäuren Threonin und Serin nachgewiesen; saure Aminosäuren sind in den eher positiv geladenen Transitpeptiden kaum präsent (von Heijne et al, 1989; Bruce, 2001). In wässriger Umgebung liegen sie unstrukturiert vor (Bruce, 1998; Krimm et al., 1999; Wienk et al., 1999). Dabei unterbinden enthaltene Prolinreste die Ausbildung helikaler Bereiche (Rensink et al., 2000; Zybailov et al., 2008; Lee et al., 2018).

Die TTDs lassen sich im Gegensatz zu den STDs gut in konservierte Sequenzmotive untergliedern (siehe Abbildung 1.1). Es liegt eine positiv geladene N-terminale Region (n) vor, an die sich ein hydrophober Bereich (h), gefolgt von einer polaren c-terminalen (c) Region,

anschließt. In der polaren Region befindet sich das für die Prozessierung relevante Sequenzmotiv AxA (von Heijne, 1985; von Heijne et al., 1989). Der Aufbau der TTD entspricht dem prokaryotischer Signapeptide. Die TTDs werden demzufolge als Signalpeptide bezeichnet.

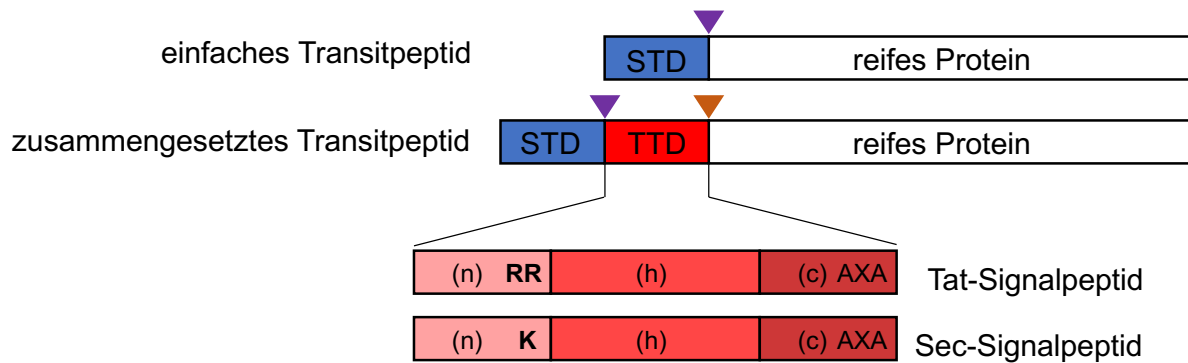


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung von kernkodierten chloroplastidären Vorläuferproteinen. Vorläuferproteine beinhalten ein N-terminales Transitpeptid und den reifen Teil des Proteins. Dabei werden einfache und zusammengesetzte Transitpeptide unterschieden. Ein einfaches Transitpeptid besteht aus einer stromadirigierenden Domäne (STD – blau). Ein zusammengesetztes Transitpeptid beinhaltet die STD in Kombination mit einer thylakoiddirigierenden Domäne (TTD – rot). Der Aufbau der TTD entspricht einem prokaryotischen Signalpeptid. So werden diese folglich auch als Signalpeptide bezeichnet. Sec- und Tat-Signalpeptide werden in (n)-Region, hydrophobe (h)-Region und (c)-Region untergliedert. Das für den Tat-Transport namensgebende Zwillingargininmotiv (RR) befindet sich in der (n)-Region. Sec-Signalpeptide weisen hier einen einzelnen Lysinrest (K) auf. Die Spaltstellen der stromalen Prozessierungspeptidase (violettes Dreieck; im Text abgekürzt als SPP) und der Thylakoid-Prozessierungspeptidase (orangefarbenes Dreieck; im Text abgekürzt als TTD) sind gekennzeichnet. Letztere wird im Signalpeptid mit der Sequenz Ala-X-Ala (AXA) dargestellt. Alle weiteren Details sind Kapitel 1.2.1 zu entnehmen.

Beim Transport eines Vorläuferproteins in das Thylakoidlumen gibt es je nach Transportweg Unterscheidungsmerkmale. Wird das Protein über den Sec-Weg transportiert (siehe Kapitel 1.4.2.1), so liegt in der (n)-Region als Erkennungsmerkmal ein einzelnes Lysin vor und die (h)-Region ist hydrophober. Tat-Signalpeptide weisen in der (n)-Region ein charakteristisches Zwillingargininmotiv auf, wobei das Rieske FeS-Protein mit KR-Motiv (Molik et al., 2001) eine Ausnahme bildet (von Heijne, 1985; Chaddock et al., 1995; Cristobal et al., 1999). In bakteriellen Signalpeptiden handelt es sich um die konservierte Sequenz SRRxFLK an Position x liegt zumeist eine polare Aminosäure vor (Berks, 1996; Stanley et al., 2000). Im C-terminalen Bereich liegt häufig ein einzelner Lysinrest vor, der als Sec-Vermeidungsmotiv (*Sec-avoidance-motif*) gilt (Bogsch et al., 1997).

1.3 Der Transport über die chloroplastidäre Hüllmembran

Kernkodierte Proteine, die mindestens eine STD aufweisen, gelangen über die in den Hüllmembranen vorliegenden membranständigen Translokasen TOC (*translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts*) und TIC (*translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts*) in das Stroma (Abbildung 1.2).

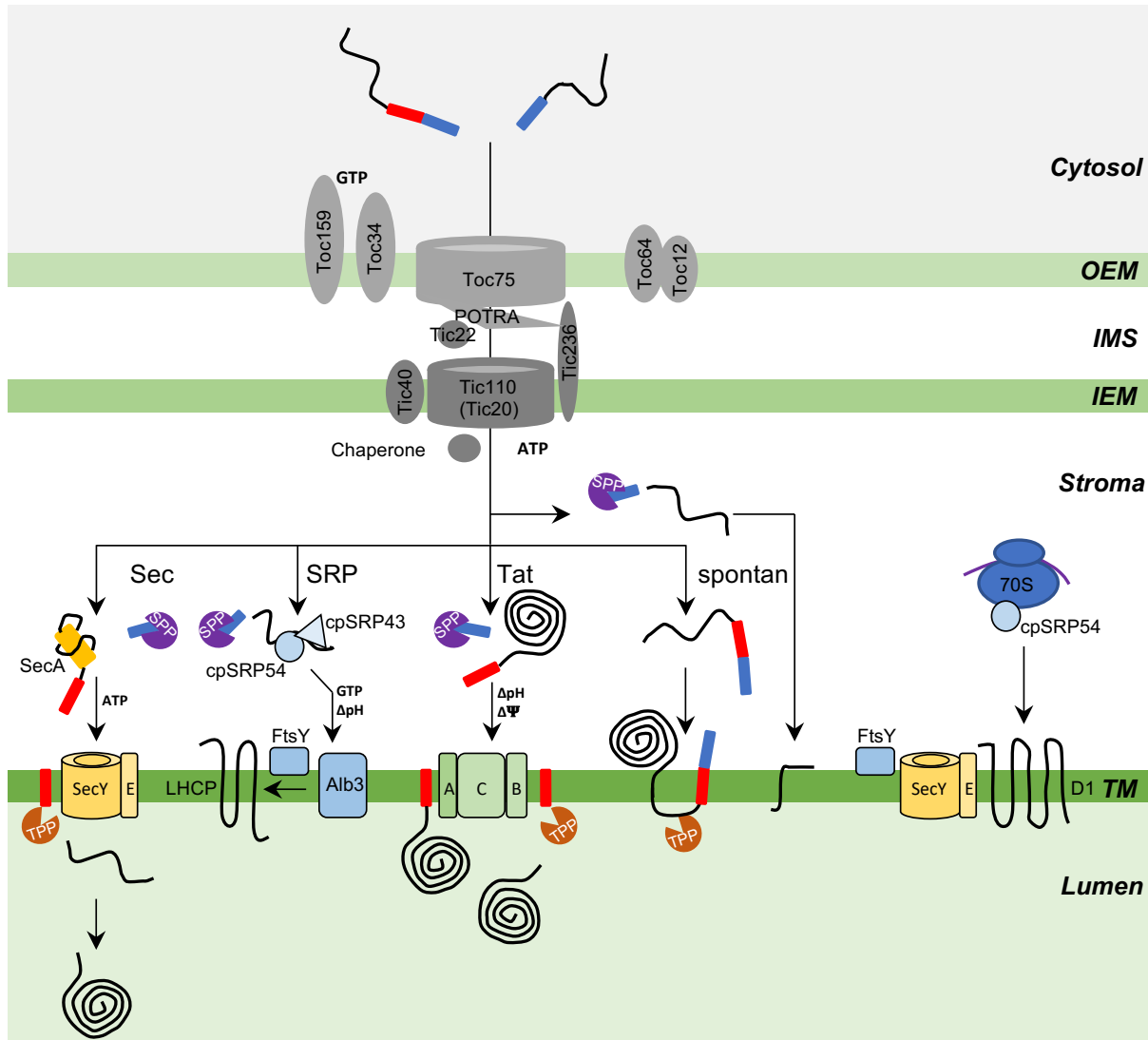


Abbildung 1.2: Verschiedene Transportwege im Chloroplasten (modifiziert nach Gutensohn et al., 2006). Kernkodierte Proteine, die in die Chloroplasten transportiert werden, weisen N-terminale Transitpeptide auf. Stromadirigierende Domänen (STD) sind in blau, thylakoiddirigierende Domänen (TTD) in rot dargestellt. Die Proteine werden über die TOC/TIC-Maschinerie der doppelten Hüllmembran in das Stroma transportiert. Liegt der finale Bestimmungsort des Proteins in der Thylakoidmembran, so erfolgt die Insertion SRP- (*signal recognition particle*), Tat- (*twin-arginine translocation*) abhängig oder spontan. Bei luminaler Lokalisation erfolgt die Translokation des Proteins über den Sec- (*secretory*) bzw. Tat-Transportweg. Die Insertion des im Plastom kodierten D1-Proteins wird über die SRP-Komponenten cpSRP54, FtsY und das Sec-Translokon SecYE vermittelt. Die stromale Prozessierungspeptidase (SPP) und die thylakoidäre Prozessierungspeptidase (TPP) sind als geöffnete Kreise in violett und braun dargestellt. Für jeden Transportweg ist die Energiequelle abgebildet. OEM: *outer envelope membrane*, IMS: *intermembrane space*, IEM: *inner envelope membrane*. Alle weiteren Details sind dem Text zu entnehmen.

Als Kernkomponenten der TOC-Maschinerie wurden die GTP-abhängigen membranständigen Rezeptoren Toc159 und Toc34 sowie die aus 16 β -Faltblättern bestehenden Translokationspore Toc75 identifiziert (Schnell et al., 1997; Hinnah et al., 2002). Toc64 wird als dynamische, integrale Komponente beschrieben, die im Zusammenspiel mit Chaperonen Substrate erkennen kann, welche wiederum an Toc34 und Toc159 des Kernkomplexes vermittelt werden (Sohrt und Soll 2000; Qbadou et al. 2006). Eine vergleichbare Funktion wird auch für das integrale Protein Toc12 postuliert, welches an Toc64 assoziiert vorliegt (Becker et al., 2004).

Die initiale Interaktion eines Vorläuferproteins mit den Kernkomponenten erfolgt energieunabhängig über die löslichen C-terminalen Domänen von Toc159 und Toc34 (Fulgosi und Soll, 2002). Auch Toc75 bindet Transitpeptide (Chen and Li, 2007) und vermittelt in Zusammenspiel mit den Rezeptoren den GTP- und ATP-abhängigen Proteintransport (Theg et al., 1989; Schleiff et al., 2003) über die Hüllmembranen. Die Bindung des Substrats an die TIC-Maschinerie erfolgt im Intermembranraum. Hierbei interagieren vermutlich die drei N-terminalen, hydrophilen POTRA-Domänen (*polypeptide-transport associated*) von Toc75 mit dem löslichen Rezeptor Tic22 (Sommer und Schleiff, 2009; Rudolf et al., 2013). Kürzlich wurde mit TIC236 ein integrales Protein der inneren Membran identifiziert, das mittels einer im Intermembranraum exponierten Domäne mit TOC75 interagiert und somit ein Bindeglied zwischen TOC- und TIC-Maschinerie darstellt (Chen et al., 2018).

Während für die TOC-Maschinerie aufgeklärt ist, dass Toc75 die Translokationspore darstellt, ist dies für den Transportvorgang an der inneren Hüllmembran unbekannt. Als Porenbildner kommen Tic110 und Tic20 in Frage. Nach Rekonstitution von Tic20 (Kovacs-Bogdan et al. 2011) und Tic110 (Heins et al., 2002; Inaba et al., 2003; Balsera et al., 2009) in Liposomen konnte mit Hilfe elektrophysiologischer Messungen die Ausbildung spannungsgesteuerter Kanäle nachgewiesen werden. Tic40 wird als Co-Chaperon beschrieben, welches im Zuge des Transports gemeinsam mit Tic110 die Rekrutierung von stromalen Chaperonen im Stroma hervorruft (Stahl et al., 1999; Schwenkert et al., 2011; Trösch et al., 2015b). Diese Chaperone sind an der ATP-abhängigen Translokation des Vorläuferproteins über die innere Membran in das Stroma beteiligt (Constan et al., 2004; Kovacheva et al., 2007; Inoue et al., 2013; Liu et al., 2014).

1.4 Proteintransport an der Thylakoidmembran

An der Thylakoidmembran erfolgt der lichtabhängige Elektronentransport und die Regulation dieses Prozesses. Die Thylakoidmembran beinhaltet somit die Photosysteme I und II (PSI und PSII), die Lichtsammelkomplexe (LHCI und LHCII), den Cytochrom b_6f -Komplex sowie die ATP-Synthase und weist im Vergleich zu den Hüllmembranen einen wesentlich höheren Proteingehalt auf (Moreau et al., 1998). Auch Proteine des Thylakoidlumens sind essentiell für die Ausführung des photosynthetischen Elektronentransports. So liegen hier u. a. der lösliche Elektronenüberträger Plastocyanin (PC) und die PSII-assoziierten Proteine des Wasserspaltungsapparates OEC16, OEC23, OEC33, vor.

1.4.1 Integration von Proteinen in die Thylakoidmembran

Die Biogenese der Thylakoide erfordert zahlreiche Proteine, deren Membranintegration bzw. Translokation in das Lumen hauptsächlich über spezifische Transportwege erfolgt.

Membranproteine können SRP- oder Tat-abhängig inseriert werden. Einige Proteine inserieren jedoch unabhängig von Proteinkomponenten und ohne Energiebedarf spontan in die Thylakoidmembran.

1.4.1.1 Spontane Insertion von Proteinen in die Thylakoidmembran

Einige bitope Membranproteine inserieren spontan in die Thylakoidmembran. Dabei integrieren z.B die Proteine TatA, TatB und SecE nach SPP-vermittelter Prozessierung im Stroma in die Thylakoidmembran (Steiner et al., 2002; Fincher et al., 2003; siehe Abbildung 1.2: spontan (rechts)). Im Gegensatz dazu wurden auch Proteine identifiziert, die mit Hilfe ihres Signalpeptids in die Membran inserieren. Dies gilt für die spontane Insertion von CF₁o, einer Untereinheit der ATP-Synthase. Bei CF₁o handelt es sich um ein kernkodiertes Protein mit zusammengesetztem Transitpeptid, welches erst in der Membran eine Transmembranhelix ausbildet. Für die Integration ist das hydrophobe Signalpeptid (TTD) essentiell (Michl et al., 1994; siehe Abbildung 1.2: spontan (rechts)). Es wird angenommen, dass die h-Domäne des Signalpeptids sowie der mature Teil des Proteins helikale Strukturen in der Membran ausbilden, wobei der hydrophile Bereich, der die TPP Schnittstelle enthält, in das Lumen transferiert wird (*loop intermediate*). Nach Prozessierung durch die TPP liegt das

mature Protein integral vor (Robinson et al., 1997). Die Insertion der bitopen Membranproteine PsbW und PsbX erfolgt ebenfalls spontan und in Abhängigkeit vom hydrophoben Signalpeptid, dabei konnte für PsbW das postulierte *loop intermediate* nachgewiesen werden (Lorkovic et al., 1995; Kim et al., 1998; Thompson et al., 1998 und 1999).

1.4.1.2 SRP-abhängige Insertion von Proteinen in die Thylakoidmembran

Der posttranslationelle SRP-Transportweg (*signal recognition particle*) in Chloroplasten vermittelt die Membraninsertion von LHC-Proteinen (*light-harvesting chlorophyll a/b binding proteins*; Li et al., 1995; siehe Abbildung 1.2: SRP). Bei LHCPs (LHC-Proteinen) handelt es sich um integrale Proteine mit drei Transmembranhelices (Kühlbrandt et al., 1994). LHCPs sind Teil der Antennenkomplexe der Photosysteme und gelten als abundanteste Proteine der Thylakoidmembran. LHC-Proteine sind kernkodiert und werden mit einem einfachen Transitpeptid (STD) in das Stroma transportiert und dort prozessiert (Richter und Lamppa, 1999). Die Interaktion mit der Thylakoidmembran wird dann über eine interne Signalsequenz im maturen Teil des Proteins vermittelt (Viitanen et al., 1988).

In *A. thaliana* wurde das Protein LTD identifiziert, das nach Translokation von LHCP über die Hüllmembranen, die Interaktion des Substrats mit dem SRP-Komplex vermittelt (Ouyang et al., 2011). Das Targeting von LHCP zur Thylakoidmembran erfolgt in Form eines intermediären Transitkomplexes, welcher LHCP, cpSRP54 und cpSRP43 beinhaltet (Li et al., 1995; Schünemann et al. 1998; Klimyuk et al. 1999). Wesentlich für den Prozess sind außerdem der peripher an der Membran assoziierte und auch im Stroma vorliegende Rezeptor cpFtsY sowie das polytope Membranprotein Alb3. Der Transfer des Transitkomplexes zur Membran erfolgt maßgeblich über cpFtsY, wobei dieser Rezeptor mit cpSRP54 interagiert. Die Membraninsertion von LHCP ist strikt GTP-abhängig und wird über die GTPase-Aktivität von FtsY und SRP54 reguliert (Yuan et al., 2002). Im *in vitro*-Versuch wurde außerdem gezeigt, dass die Zugabe von ATP die Membranintegration von LHCP positiv beeinflusst (Yuan et al., 2002). Die Freisetzung von LHCP in die Membran wird letztlich über die Insertase Alb3 vermittelt (Lewis et al., 2010; Falk et al., 2010a; Horn et al., 2015; Liang et al., 2016). Alb3 ist homolog zu YidC in Bakterien und Oxa1 in Mitochondrien (Yi und Dalbey, 2005).

Während cpSRP43 ausschließlich dem posttranslationellen SRP-vermittelten Transportweg in Chloroplasten vorbehalten ist (Schünemann et al., 1998; Klimyuk et al., 1999), ist die

Komponente SRP54 in Bakterien, Archaeen und Menschen hochkonserviert (Franklin und Hoffman 1993; Li et al., 1995) und liegt RNA-assoziiert vor (Beckert et al., 2015). Die hier vorliegenden SRP-vermittelten Transportmechanismen vermitteln den co-translationellen Transport von Proteinen zum ER bzw. zur Cytoplasmamembran (Akopian et al., 2013b; Saraogi und Shan, 2014; Voorhees und Hegde 2016). Die SRP-Komponenten cpSRP54, cpFtsY, Alb3 sowie die membranständige Translokase cpSecYE sind ebenfalls an der cotranslationellen Insertion des im Plastom kodierten D1-Proteins (auch PsbA genannt; siehe Abbildung 1.2) beteiligt (Nilsson et al., 1999).

1.4.2 Translokation von Proteinen über die Thylakoidmembran

Proteomanalysen des Thylakoidlumens legen nahe, dass in diesem Kompartiment ca. 80 Proteine vorliegen (Schubert et al., 2002; Järvi et al., 2013). Die luminalen Proteine werden in Abhängigkeit des vorliegenden Signalpeptids (TTD) Tat- oder Sec-abhängig transportiert (siehe Abbildung 1.1 ; Chaddock et al., 1995; Berks et al., 1996; Bogsch et al., 1997).

1.4.2.1 Sec-abhängige Proteintranslokation

Ein Merkmal des Sec-Transportwegs (*secretory*) ist, dass ausschließlich entfaltete Proteine transportiert werden (Endo et al., 1998; Hynds et al., 1998; Marques et al., 2003).

Der Sec-vermittelte Transport von Proteinen kann an der bakteriellen Plasmamembran, am Endoplasmatischen Retikulum sowie an der Thylakoidmembran erfolgen. Dabei ist die Sec-abhängige Translokation in *E. coli* am besten charakterisiert. Als zugehörig zum posttranslationalen Transportsystem in *E. coli* wurden die Membranproteine SecY und SecE und die löslichen Protein SecA und SecB sowie die nicht essentiellen, akzessorischen Proteine SecD, SecF und SecG identifiziert (zusammengefasst in Driessen & Nouwen, 2008; Komadurin & Driessen, 2019). Ein im Cytoplasma synthetisiertes Vorläuferprotein mit Sec-spezifischem Signalpeptid wird über das Chaperon SecB im entfalteten Zustand gehalten und zur ATPase SecA dirigiert (Cabelli et al., 1988; Fekkes et al., 1997 und 1999; Bechtluft et al., 2010). SecA assoziiert dann an die Translokationspore SecYEG und vermittelt unter Hydrolyse von ATP die Proteintranslokation (Economou et al., 1994; du Plessis et al., 2011). Die nicht-essentiellen, akzessorischen und im Komplex vorliegenden Membranproteine SecD und SecF fungieren vermutlich als pmf-getriebene Chaperone des Proteintransports, die darüber hinaus

membrangebundenes SecA stabilisieren (Ecounomou et al., 1995; Duong et al., 1997; Tsukazaki und Nureki, 2011).

Der Sec-abhängige Proteintransport an der Thylakoidmembran vermittelt z. B. die Translokation von Plastocyanin, PsaF und OEC33 (Hulford et al., 1994; Karnauchov et al., 1994; Robinson et al., 1994; Yuan und Cline, 1994). Im Chloroplasten wurden Homologe der Translokase-Komponenten SecY (cpSecY) und SecE (cpSecE) und der ATPase SecA (cpSecA) identifiziert (Nakai et al., 1994; Yuan et al., 1994; Berghöfer et al., 1995, Laidler et al., 1995; Berghöfer und Klösgen, 1996; Roy und Barkan, 1998; Schünemann et al., 1999). Die Energetisierung des Transports ist, wie auch im bakteriellen System, ATP-abhängig. Der Protonengradient hat einen stimulierenden Einfluss auf die Translokation thylakoidärer Proteine (Robinson et al., 1994; Mant et al., 1995). Da kein zu SecB äquivalentes Chaperon entdeckt wurde, ist bisher unklar, wie die Faltung eines Sec-spezifischen Vorläuferproteins verhindert wird.

1.4.2.2 *Tat-abhängige Proteintranslokation*

Der Tat-abhängige Proteintransport wurde in Thylakoidmembranen von Chloroplasten und in der Cytoplasmamembran von Bakterien und Archaeen nachgewiesen. Für die in Thylakoid- und Cytoplasmamembranen lokalisierte Translokase ist bekannt, dass diese den Transport gefalteter Proteine in das Lumen bzw. Periplasma vermittelt (zusammengefasst in Palmer und Stansfeld, 2020). Interessanterweise wird die Tat-abhängige Proteintranslokation ausschließlich über ein Membranpotential energetisiert, dass einen Protonengradienten (ΔpH) und/oder elektrochemischen Gradienten ($\Delta\Psi$) beinhaltet (Mould und Robinson, 1991; Klösgen et al., 1992; Alder und Theg, 2003; Braun et al., 2007).

Die Identifizierung der Tat-Komponenten

Das erste Protein, das mit dem Tat-abhängigen Proteintransport in Chloroplasten in Verbindung gebracht wurde, war TatB (Settles et al., 1997). Die Identifizierung von TatB gelang über die Isolierung einer Transposon-induzierten Mutation in Kerngenom von *Zea mays*. Für die Mutante *hcf106* (*high chlorophyll fluorescence*) konnten verminderte Level bestimmter Thylakoidmembranproteine festgestellt werden, außerdem wurden Translokationsdefekte sichtbar. So akkumulierten z.B. die Tat-Substrate OEC16 und OEC23 im Stroma (Voelker und Barkan, 1995; Settles et al., 1997).

Im Folgenden wurde in *E. coli* das Tat-Operon *tatABCD* entdeckt (Sargent et al., 1998; Weiner et al., 1998). Zusätzlich wurde noch das zu *tatA* homologe *tatE*, das wahrscheinlich aus einer Genduplikation hervorging, gefunden (Sargent et al., 1998; Jack et al., 2001). Während es sich bei TatD um eine nicht in den Transportprozess involvierte Nuklease handelt, sind TatA, TatB und TatC essentiell für das Transportsystem (Bogsch et al., 1998; Sargent et al., 1999; Wexler et al., 2000; Eimer et al., 2015). Im Zuge der Identifikation des Tat-Operons in *E. coli* wurde festgestellt, dass die codierenden Sequenzen von *tatA* und *tatB* Homologien zu *hcf106* aufweisen (Sargent et al., 1998; Weiner et al., 1998). Das pflanzliche Pendant zu *tatA* - *tha4* (*thylakoid assembly 4*) - wurde wiederum über eine Transposon-induzierte Mutation im Kerngenom von *Zea mays* identifiziert. Der Phänotyp der Mutante ähnelt der *hcf106*-Mutante; für die Tat-Substrate ist ein Translokationsdefizit erkennbar (Walker et al., 1999). Die dritte Komponente des Tat-Transportweges wurde zum einen über eine Transposon-induzierte Mutation im Kerngenom von *Arabidopsis thaliana* und über eine cDNA-basierte Methode identifiziert (Mori et al., 2001; Motohashi et al., 2001). Eine zur bakteriellen *tatC*-Sequenz homologe cDNA wurde aus Erbsenpflanzen isoliert. Die cDNA wurde *in vitro* transkribiert und translatiert und das als cpTatC bezeichnete Protein folgend in isolierte Chloroplasten importiert. TatC wurde als integrales Protein in der Thylakoidmembran vorliegend lokalisiert. Isolierte Thylakoide, die mit cpTatC-spezifischem Antikörper behandelt wurden, waren nicht zum Transport von Tat-Substraten befähigt (Mori et al., 2001). Auch die Analyse von TatC-defizienten *Arabidopsis thaliana*-Mutanten verdeutlichte die essentielle Funktion des Proteins im Tat-Transport (Motohashi et al., 2001).

Einige Arbeitsgruppen halten für die pflanzlichen Tat-Proteine an den ursprünglichen Namen Tha4, Hcf106 und cpTatC fest (New et al., 2018). In dieser Arbeit werden die pflanzlichen Tat-Komponenten, wie für *E. coli*, als TatA, TatB und TatC bezeichnet.

Topologie und Struktur der Tat-Komponenten

TatA und TatB entstammen laut phylogenetischer Analysen einem gemeinsamen Vorläufergen und werden folglich einer Proteinfamilie, der TatA-Familie, zugeordnet (Yen et al., 2002). Für TatA aus *Bacillus subtilis* (Hu et al., 2010; Walther et al., 2010), *E. coli* (Rodriguez et al., 2013) und *Arabidopsis thaliana* (Pettersson et al., 2018) liegen bereits Strukturdaten vor, die mittels Kernspinresonanzspektroskopie erstellt wurden. Für TatB aus *E. coli* liegt ebenfalls

eine Struktur vor (Zhang et al., 2014a). Die Strukturdaten verdeutlichen die große Ähnlichkeit der Proteine zueinander (siehe Abbildung 1.3).

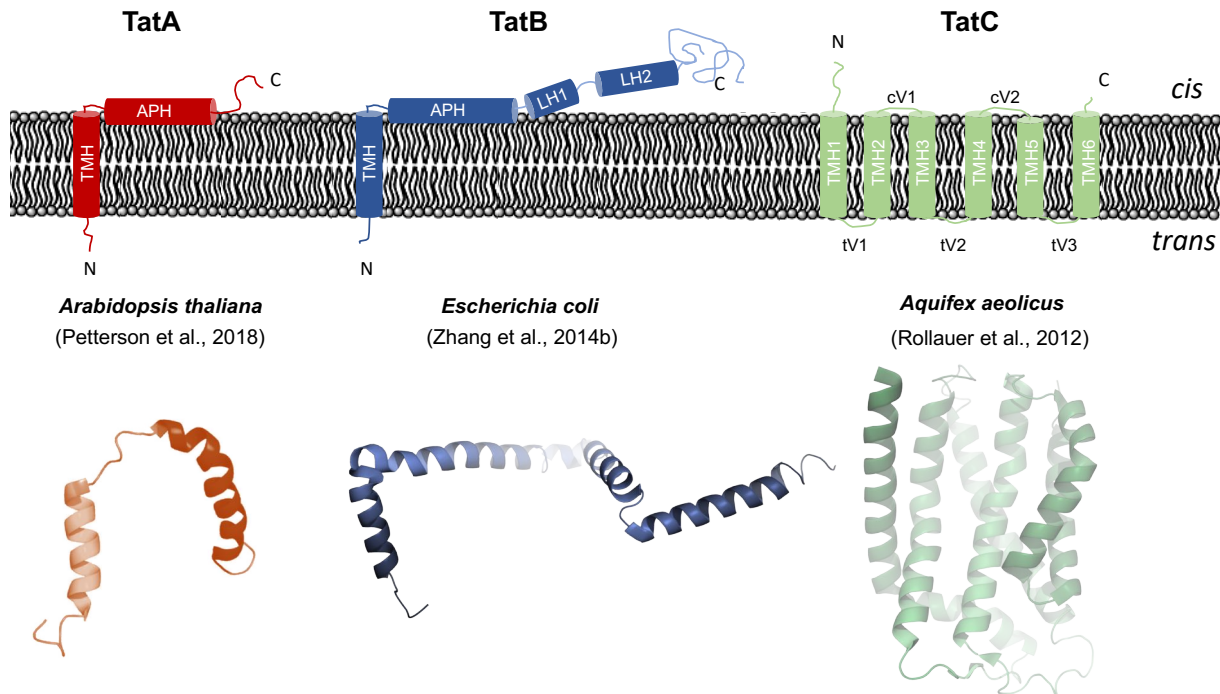


Abbildung 1.3: Topologie der Tat-Proteine. Die Tat-Komponenten TatA (nach Abb. in Petterson et al., 2018; Farbe geändert) TatB (nach Zhang et al., 2014a; PDB code: 2MI2) und TatC (nach Rollauer et al., 2012; PDB code: 4B4A) sind zum einen schematisch und zum anderen basierend auf Strukturdaten (siehe PDB codes) dargestellt. TMH: Transmembranhelix, APH: amphipathische Helix, LH: lösliche Helix, cV: *cis*-Verbindung, tV: *trans*-Verbindung. Weitere Details sind dem Text zu entnehmen.

Bei TatA und TatB handelt es sich um bitope Membranproteine mit einer Transmembranhelix (TMH), die über eine Gelenkregion (auch *hinge*-Region genannt) mit einer amphipathischen Helix (APH) verbunden ist. Im Falle von *E. coli*-TatB schließen sich daran zwei lösliche Helices an (LH1 & LH2; Zhang et al., 2014a). Ob pflanzliche TatB-Proteine hier ebenfalls Helices aufweisen, ist bisher nicht bekannt. Mittels Phyre2, einem *Online tool* für Proteinmodellierung, -vorhersage und -analyse (Kelley et al., 2015) werden jedoch helikale Bereiche im Anschluss an die amphipathische Helix von TatB aus Erbse vorhergesagt (Anhang 16). TatA und TatB weisen am C-terminalen Ende eine unstrukturierte Region auf, die bei TatB deutlich verlängert ist. Der kurze N-Terminus der Proteine liegt im Thylakoidlumen bzw. Periplasma (*trans*) vor, APH und die C-terminale Region befinden sich im Stroma bzw. Cytoplasma (*cis*); Hu et al., 2010; Walther et al., 2010; Rodriguez et al., 2013; Petterson et al., 2018; Zhang et al., 2014a). Bei TatC handelt es sich um ein polytopes Membranprotein mit sechs Transmembranhelices, wobei TMH 5 und TMH 6 kürzer als die restlichen TMHs sind. N-

und C-Terminus von TatC liegen in *cis*-Ausrichtung vor. Die Anordnung der sechs Transmembranhelices entspricht einer gekrümmten Hand, die Struktur weist eine konvexe und eine konkave Seite auf (Rollauer et al., 2012; Ramasamy et al., 2013).

Derivate des TatABC-Systems

Neben den beschriebenen TatABC-Systemen in *E. coli* und Pflanzen existieren auch Systeme mit zwei Tat-Komponenten. So liegen z. B. im grampositiven Bakterium *Bacillus subtilis* die Tat-Systeme TatAdCd und TatAyCy vor. TatAyCy vermittelt den Transport von ca. zehn Substraten. TatAdCd ist hingegen auf den Export der Phosphodiesterase PhoD spezialisiert, welche unter Phosphatmangelbedingungen synthetisiert wird (Jongbloed et al., 2000, 2004 und 2006).

Mit TatAc wurde in *B. subtilis* ein weiteres TatA-Protein identifiziert (Monteferrante et al., 2012), für das kein TatC-Pendant bekannt ist. TatAc kann jedoch mit TatCd und TatCy aktive Translokasen bilden (Monteferrante et al., 2012; Goosens et al., 2015).

Des Weiteren konnten auch mittels phylogenetischer Analysen Homologe der Tat-Komponenten in der inneren Mitochondrienmembran verschiedener Eukaryoten nachgewiesen werden (Carrie et al., 2016; Petru et al., 2018), wobei in den Organismen TatA/TatC-, TatB/TatC- oder ausschließlich TatC-Homologe aufgezeigt wurden. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass kernkodiertes Erbsen-TatA *dual targeting*-Eigenschaften aufweist, also in Chloroplasten und Mitochondrien transportiert wird und somit ebenfalls Teil des mitochondriellen Tat-Transports in Pflanzen sein könnte (Bennewitz et al., 2020). Das Rieske-Protein, eine Untereinheit des Cytochrom bc₁-Komplexes in der inneren Mitochondrienmembran, wurde als Substrat des pflanzlichen Tat-Transports in Mitochondrien identifiziert (Schäfer et al., 2020).

Tat-Substrate

Die Tat-Maschinerie vermittelt den Tat-Transport bereits gefalteter Proteine. Ein Grund für eine auf der *cis*-Seite erforderliche Faltung ist u. a. die Assemblierung von Kofaktoren, wobei dies insbesondere auf bakterielle Tat-Substrate zutrifft (zusammengefasst in Berks et al., 2005). In Chloroplasten jedoch gilt das Rieske-Protein, eine Untereinheit des Cytochrom b₆f-Komplexes in der Thylakoidmembran, als einziges bislang bekanntes Kofaktor-tragendes Protein (Molik et al., 2001).

Für die Modellsubstrate des pflanzlichen Proteintransports OEC16 und OEC23 könnte eine schnelle Faltungskinetik ursächlich für die Nutzung der Tat-Translokase sein (Creighton et al., 1995). Weitere Substrate des chloroplastidären Tat-Transports sind z. B. Hcf136 (PSII-Assemblierungsfaktor), PPO (Polyphenoloxidase) und PSI-N (PSI Untereinheit; zusammengefasst in Albinia et al., 2012).

Des Weiteren sind Tat-Substrate bekannt, die über einen *hitchhiker*-Mechanismus (Huckepack) transportiert werden. So wird die bakterielle [NiFe]-Hydrogenase 2 als Heterodimer transportiert, wobei nur die kleine Untereinheit (HybO) ein N-terminales Signalpeptid beinhaltet (Rodrigue et al., 1999). Voraussetzung für den erfolgreichen Transport beider Untereinheiten in das Periplasma ist die Bildung des heterodimeren Proteinkomplexes. Auch DmsB, eine Untereinheit der bakteriellen DMSO-Reduktase, wird als *hitchhiker* mit DmsA transportiert (Sambasivarao et al., 2000).

Insbesondere diese im Komplex als *hitchhiker* transportierten Proteine belegen die Fähigkeit der bakteriellen Tat-Translokase gefaltete Proteine zu transportieren. Auch der Transport, der durch Methotrexat-Bindung fest gefalteten Dihydrofolatreduktase (DHFR), welche nicht über die Sec-Maschinerie transportiert werden kann, hebt diese herausragende Eigenschaft des Tat-abhängigen Proteintransports an der Thylakoidmembran hervor (Hynds et al., 1998). Des Weiteren wurde gezeigt, dass der gefaltete Trypsin-Inhibitor BPTI (*bovine pancreatic trypsin inhibitor*) Tat-abhängig transportiert wird (Clark und Theg, 1997). Ebenfalls wurde mit Hilfe von *in thylakoido*-Versuchen nachgewiesen, dass rekombinante EGFP-Varianten (*enhanced green fluorescence protein*) Tat-abhängig in das Thylakoidlumen transportiert werden, wenn ein N-terminales Tat-Signalpeptid vorliegt. Die chimären Proteine 33/EGFP und PC/EGFP, die mit einem Sec-Signalpeptid versehen sind, werden hingegen nicht transportiert (Marques et al., 2003). Auch für *E. coli* konnte bestätigt werden, dass korrekt gefaltetes mit einem Tat-Signalpeptid fusioniertes GFP Tat-abhängig in das Periplasma transportiert wird (Thomas et al., 2001).

Faltungs- und Kofaktorkontrolle

Vorangegangene Arbeiten zeigten allerdings, dass die Faltung eines Tat-Substrats, zumindest im Thylakoidtransport, keine Voraussetzung für den Tat-abhängigen Proteintransport ist. So konnten verkürzte und nicht korrekt gefaltete Varianten der DHFR Tat-abhängig in das Thylakoidlumen transportiert werden (Hynds et al., 1998). Ebenfalls wurde gezeigt, dass die

C-terminale Verkürzung des chimären chloroplastidären Tat-Substrats 16/23, das sich aus dem Signalpeptid von OEC16 und dem vom C-terminalen Ende her sukzessiv verkürzten reifen Teil von OEC23 zusammensetzt, zu einer Verminderung der Transporteffizienz aber nicht zur Unterbindung des Transports führt. Hier wird angenommen, dass die TatBC-Substrat-Bindung dieser verkürzten, entfalteten bzw. partiell entfalteten Proteinvarianten beeinträchtigt ist (Schlesier und Klösgen, 2015). Wenn bis zu 120 Aminosäurereste unstrukturierter Polypeptide (GGGGS) in verschiedene Tat-Vorläuferproteine integriert wurden, konnte im *in thylakoido*-System ebenfalls die Translokation dieser Substrate nachgewiesen werden (Cline und McCafferey, 2007). Auch das chimäre Protein 16/33, das das Signalpeptid des Tat-Substrats OEC16 und den maturen Teil des Sec-Substrats OEC33 beinhaltet, wird Tat-abhängig transportiert. Interessanterweise ist jedoch der Transport einer Proteinfraction arretiert. Es wurde festgestellt, dass ein moderat hydrophobes Segment von mOEC33 in der Membran, gefolgt von einem stromal exponierten, moderat hydrophilen Segment entscheidend für die Arretierung der Translokation sind (Dittmar et al., 2014). Außerdem wurde gezeigt, dass mOEC33, obwohl es sich um ein Sec-spezifisches Passagierprotein handelt, nicht vollständig entfaltet vorliegt. Dennoch zeigt die Arretierung des Tat-Transports von mOEC33 eine Inkompatibilität mit der Tat-Translokase an, wenngleich der Transport von 16/33 nicht vollständig unterbunden wird.

Im Gegensatz dazu gibt es verschiedene Publikationen, die für *E. coli* im Vergleich zu pflanzlichen Systemen eine strengere Faltungskontrolle der Tat-Substrate nahelegen. So wurde publiziert, dass Concatamere ungefalteter Domänen des Kernporenproteins Nsp1p aus *Saccharomyces cerevisiae* mit einer Größe von bis zu 30 kDa von der Tat-Translokase transportiert werden können. Wurden jedoch mehrere hydrophobe Reste in die Concatamere eingefügt, erfolgte kein Tat-Transport (Richter et al., 2007). Weitere Experimente mit Concatameren von 110 - 205 Aminosäureresten führten zur Arretierung der Translokation (Lindenstrauß et al., 2009, Taubert et al., 2014).

Außerdem wurde für *E. coli* gezeigt, dass nicht nur der Faltungszustand der Substrate, sondern auch die Kofaktorassamblierung ein kritischer Faktor für die Proteintranslokation sein kann, da die [Fe-S]-tragenden Tat-Substrate NrfC und NapG bei gestörter Kofaktor-Assemblierung nicht transportiert werden (Matos et al., 2008).

Insbesondere mit Hilfe von künstlichen Proteinen, die verschiedene Faltungsstadien aufweisen, konnte gezeigt werden, dass die Effizienz des Tat-Transports in *E. coli* vom

Faltungszustand und der strukturellen Flexibilität dieser Proteine abhängig ist (Rocco et al., 2012; Sutherland et al., 2018). Dennoch kann bisher nicht allgemeingültig formuliert werden, welche Substrateigenschaften die Translokase akzeptiert und wie der Assemblierungs- bzw. Faltungszustand von Tat-Substraten überprüft wird. Als gesichert gilt, dass TatD für diesen Mechanismus irrelevant ist (Matos et al., 2009). Kürzlich publizierte Daten legen nahe, dass insbesondere die löslichen Helices L1 & L2 des TatB-Proteins (siehe Abbildung 1.3) eine Rolle in der Faltungskontrolle von Tat-Substraten spielen (Taw et al., 2020).

Der TatBC-Rezeptorkomplex

TatB und TatC liegen in einem heterooligomeren Komplex vor. Es wird angenommen, dass die Proteine in einer 1:1 Stöchiometrie vorliegen (Bolhuis et al., 2001; Jakob et al., 2009; Tarry et al., 2009; Celedon & Cline, 2012). Die Anzahl der postulierten TatB- bzw. TatC-Protomere variiert hingegen. Es gibt Veröffentlichungen zu di-, tri-, tetra-, hepta- und oktameren TatBC-Komplexen (Tarry et al., 2009; Celedon & Cline, 2012; Aldridge et al., 2014; Blümmel et al., 2015; Alcock et al., 2016). Die Funktion des TatBC-Rezeptorkomplexes liegt in der Erkennung des Tat-Substrates. TatBC-Substrat-Komplexe, die mit Digitonin solubilisiert werden, weisen im *Blue Native*-Gel ein apparentes Laufverhalten von ca. 560 und 620 kDa auf (Berghöfer und Klösgen, 1999). Die Arbeitsgruppen um Kenneth Cline und Carole Dabney-Smith kalkulieren die Größen der TatBC-Komplexe auf ca. 700 kDa (Cline, 2001; Fincher et al., 2003). Ohne Substratbindung ist die Mobilität der TatBC-Komplexe etwas erhöht (Cline et al., 2001; Fincher et al., 2003; Jakob et al., 2009). Auch kleinere Komplexe, die in Größenordnungen von schätzungsweise 300, 400 und 500 kDa auftreten, konnten gezeigt werden und werden als solubilisierungsbedingte Zerfallsprodukte interpretiert (Jakob et al., 2009).

Crosslink-Analysen mit *E. coli*-Proteinen legen nahe, dass TatB mit cV1, tV2 (siehe TatC in Abbildung 1.3) sowie mit TMH4 von TatC interagiert (Zoufaly et al., 2012; Blümmel et al., 2015). Für die TMH von TatB wurde eine Vernetzung mit TMH5 (*E. coli* und *P. sativum*) sowie eine substratabhängige Interaktion mit TMH6 (*nur in E. coli*) beobachtet (Kneuper et al., 2012; Alcock et al., 2016; Habersetzer et al., 2017; New et al., 2018). Kürzlich wurde für *E. coli* gezeigt, dass auch die löslichen Helices (LH1 & LH2) von TatB mit TatC interagieren (Fröbel et al., 2019).

Die Tat-Translokase

TatA ist in Thylakoiden nur transient im Zuge der Translokation eines Substrates mit dem TatBC-Rezeptorkomplex assoziiert und kann im pflanzlichen System nicht in TatBC-Komplexen detektiert werden (Cline & Mori, 2001; Gérard & Cline, 2006; Jakob et al., 2009; Ma & Cline, 2013). Im Gegensatz dazu wurden in *E. coli* TatABC-Komplexe mit einer Größe von ca. 600 kDa nachgewiesen (Orriss et al., 2007).

Für pflanzliche Systeme wird angenommen, dass TatA im inaktiven Zustand als separates Oligomer vorliegt (Cline und Mori, 2001; Mori und Cline, 2002; Leake et al., 2008; Dabney-Smith und Cline, 2009; Jakob et al., 2009). TatA ist im Gegensatz zu TatB und TatC nicht nur in der Thylakoidmembran lokalisiert, sondern wurde auch in löslicher Form im Stroma nachgewiesen (Frielingsdorf et al., 2008).

Mit Hilfe von *Crosslink*-Analysen wurde beobachtet, dass TatA mit TMH4, TMH5 und TMH6 von TatC interagiert, wobei eine Vernetzung zu TMH6 ausschließlich für *E. coli* nachgewiesen wurde (Zoufaly et al., 2012; Aldridge et al., 2014; Habtemichael et al., 2017). Die Interaktion der TMH von TatA mit der TMH5 von TatC in *P. sativum* tritt bei Substratbindung verstärkt auf (Aldridge et al., 2014). Die Vernetzung zu TMH4 wurde unter Transportbedingungen beobachtet (Aldridge et al., 2014). Für *E. coli* wurde gezeigt, dass lösliche Domänen von TatC mit dem N-Terminus und der APH von TatA in Interaktion treten können (Zoufaly et al., 2012; Aldridge et al., 2014; Blümmel et al., 2015). Ebenfalls wurden für *E. coli* für die TMH von TatA enge Kontakte mit TatB gezeigt (Fröbel et al., 2011).

Für das Mengenverhältnis von TatA zu TatB bzw. TatC existieren divergierende Angaben. Während für *E. coli* ein TatA Überschuss angenommen wird (Jack et al., 2001; Sargent et al., 2001; Berks et al., 2003; Celedon & Cline, 2012), gibt es für pflanzliches TatA Daten, die je nach verwendeter Methode und Spezies ein vergleichsweise geringeres (Jakob et al., 2009), vergleichbares (Mori et al., 2001; Jakob et al., 2009) oder höheres (Celedon & Cline 2012) TatA-Level im Vergleich zur Konzentration von TatB und TatC aufzeigen.

Der Mechanismus des Tat-Transports

Im Allgemeinen wird angenommen, dass die Assemblierung der aktiven Tat-Translokase von einem TatBC-Substrat-Komplex ausgeht (Cline & Mori, 2001; Alami et al., 2003; Gérard & Cline, 2006; siehe Abbildung 1.4).

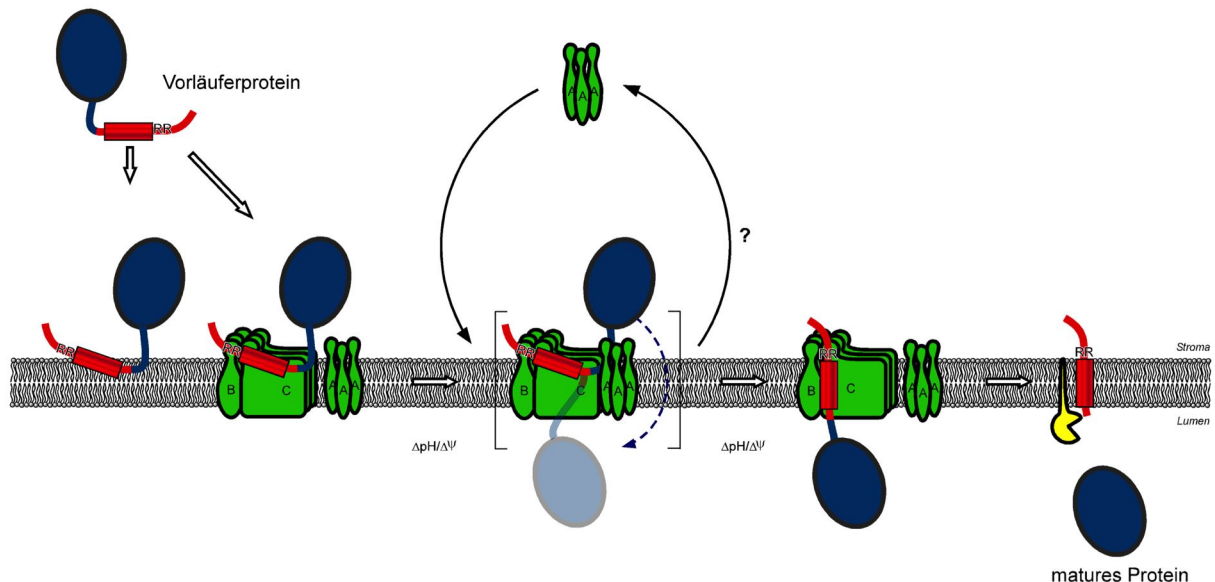


Abbildung 1.4: Modell zum Mechanismus des thylakoidären Tat-Transports (modifiziert nach Frielingsdorf et al., 2008). Nach Bindung an den Tat-Rezeptorkomplex wird das Vorläuferprotein TatA-vermittelt ins Lumen transloziert. Dieser Schritt wird über ein Membranpotential, das einen Protonengradienten (ΔpH) und/oder elektrochemischen Gradienten ($\Delta \Psi$) aufgebaut wird, energetisiert. Die Abspaltung des Signalpeptids erfolgt durch die TPP (in gelb dargestellt). Das mature Protein (auch reifes Protein genannt) wird in das Lumen entlassen. Die Funktionsweise von TatA ist bisher nicht bekannt. Es wurde nachgewiesen, dass TatA im pflanzlichen System nicht nur membranständiges, sondern auch in löslicher Form Protein im Stroma auftritt. Ob die beiden Proteinpools im gegenseitigen Austausch stehen, ist unbekannt. Weitere Details sind dem Text zu entnehmen.

Für einige Tat-Substrate wurde gezeigt, dass diese spontan mit der Lipiddoppelschicht interagieren können und dann möglicherweise zum TatBC-Rezeptorkomplex diffundieren (Brüser et al., 2003; Hou et al., 2006; Bageshwar, 2009; Schlesier und Klösigen, 2010). Relevant für die Interaktion eines Tat-Substrates mit dem TatBC-Rezeptor sind das Zwillingsargininmotiv und die (h)-Region des Signalpeptids. Dabei vollführen die N-terminale Region sowie cV1 (siehe TatC in Abbildung 1.3) von TatC die Erstinteraktion mit dem Signalpeptid (Rollauer et al., 2012; Zoufaly et al., 2012; Ma und Cline, 2013). Außerdem wurde gezeigt, dass TatB mit der (h)-Region des Signalpeptids und dem murenen Teil des Substrates quervernetzt werden kann. Für die TMH5 von TatC wurden ebenfalls enge Kontakte mit der (h)-Region des Signalpeptids festgestellt. (Kreutzenbeck et al., 2007; Lausberg et al., 2012; Aldridge et al., 2014; Blümmel et al., 2015).

Der initiale Kontakt des Vorläuferproteins mit dem TatBC-Rezeptorkomplex ist reversibel. Es gibt Hinweise, dass TatC in diesem frühen Stadium der Translokation zunächst als Insertase fungiert (Fröbel et al., 2012b) und die vom Membranpotential abhängige, Membraninsertion eines Signalpeptids vermittelt (Alami et al., 2003, Gérard und Cline, 2007, Blümmel et al., 2015, Hamsanathan et al., 2017).

Die folgende transiente Interaktion von TatA mit dem substratbindenden TatBC-Komplex führt zur Ausbildung der aktiven Translokase (Mori und Cline, 2002; Aldridge et al., 2014). TatA oligomerisiert in Abhängigkeit vom Membranpotential am Substrat-Rezeptorkomplex und vermittelt schließlich die Translokation des Proteins auf die *trans*-Seite der Membran (Mori und Cline, 2002; Dabney-Smith et al., 2006; Dabney-Smith und Cline, 2009; Alcock et al., 2013; Rose et al., 2013). Im Zuge des Transports wurde auch beobachtet, dass TatA mit dem reifen Teil eines Substrats interagiert (Maurer et al., 2010). Nach erfolgtem Transport disassembliert TatA vom Rezeptorkomplex (Alcock et al., 2013; Taubert und Brüser, 2014). Die Prozessierung des Substrats erfolgt durch die TPP (Halpin et al., 1989).

Für *E. coli* wurde gezeigt, dass TatA und TatB im Zuge der Ausbildung der aktiven Translokase einen Positionswechsel an den TatC-Bindestellen, die in TMH6 und TMH5 liegen, vornehmen (Alcock et al., 2016; Habersetzer et al., 2017). Dieser Positionswechsel wurde bisher für den thylakoidären Tat-Transport nicht nachgewiesen (Aldridge et al., 2014; zusammengefasst in New et al., 2018).

Modelle zur Funktionsweise der Tat-Komponenten im Transportprozess

Der Mechanismus des Tat-Transports, insbesondere die Funktion von TatA, ist noch nicht bekannt. Eine besondere Herausforderung in der Erforschung des Tat-Transportwegs stellt die transiente Natur der Translokase dar. So konnte die aktive Translokase noch nicht strukturell analysiert werden, es liegen ausschließlich Strukturdaten für die einzelnen Tat-Komponenten vor (siehe Abbildung 1.3). Verschiedene Beobachtungen führten dennoch zur Etablierung einiger Modellvorstellungen zum Transportmechanismus. Da TatA nur im Zuge des Translokationsprozesses mit dem TatBC-Substrat-Rezeptorkomplex interagiert, wird eine zentrale Rolle des Proteins vermutet. Eine Hypothese ordnet TatA eine Funktion als temporäre Translokationspore zu (Mori und Cline, 2002; Alami et al., 2003; Gohlke et al., 2005; Dabney-Smith et al., 2006). Dabei könnte es sich um Translokationsporen handeln, die eine substratspezifisch adaptierbare oder eine feste Größe aufweisen (Gohlke et al., 2005; Oates

et al., 2005; Dabney-Smith et al., 2006; Leake et al., 2008; Dabney-Smith und Cline, 2009). Unveröffentlichte Daten der AG Klösigen ergaben keinen Hinweis darauf, dass der TatA-Bedarf beim Thylakoidtransport mit der Masse oder der räumlichen Ausdehnung des Passagierproteins korreliert (Manuskript in Vorbereitung). Diese Daten widersprechen dem Modell einer adaptierbaren Pore.

Es wird postuliert, dass TatA-Protomere ringförmig oligomerisieren, wobei die Pore nach einem „Falltürmechanismus“ öffnet. Dieser Mechanismus beinhaltet die konzertierte Membraninsertion der im Zentrum der Pore angeordneten amphipathischen Helices (Berks et al., 2000; Chan et al., 2007; Dabney-Smith et al., 2006; Gouffi et al., 2004; Walther et al., 2013). Die für einen Falltürmechanismus erforderliche duale Topologie der amphipathischen Helix des TatA-Proteins aus *E. coli* wurde mit Hilfe von APH-Fusionsproteinen und Proteasezugänglichkeit der APH nach Insertion einer Proteaseschnittstelle (Gouffi et al., 2004) sowie Zugänglichkeit einer Thiol-reaktiven Reagenz zu substituierten Cysteinresten beobachtet (Chan et al., 2007). Koch et al. (2012) und Aldridge et al. (2012) hingegen, die ebenfalls mit Cystein-substituiertem TatA arbeiteten, konnten keine duale Topologie für *E. coli*- bzw. Erbsen-TatA nachweisen und stellten somit die Konformationsänderung von TatA in Frage.

Walther et al. (2013) postulierten bezugnehmend auf eine mögliche duale Topologie von TatA, dass die APH und die C-terminale Region von TatA aufgrund komplementärer Ladungsmuster über Salzbrücken stabilisiert werden könnten, die die Konformationsänderung des Proteins begünstigen (*charge zipper*-Modell, Walther et al., 2013). Es wurde mittels *Blue Native*-PAGE-Analyse gezeigt, dass die Oligomerisierung von TatAd aus *B. subtilis* bei Ladungsinversion einzelner Aminosäurereste, die an der Ausbildung intermolekularer Salzbrücken beteiligt sind, nicht beeinträchtigt ist. Im Gegensatz dazu führte die Ladungsinversion einzelner Aminosäurereste in intramolekularen Salzbrücken zur Disassemblierung von TatA. Dieser Effekt konnte wiederum aufgehoben werden, wenn die Ladung beider Salzbrückenpartner invertiert wurde. Alcock et al. (2017) konnten hingegen mit Hilfe von *in vivo*-Versuchen nicht bestätigen, dass die Inversion einzelner geladener Aminosäurereste die Oligomerisierung von TatA beeinträchtigt. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass diverse geladene Aminosäurereste in APH und C-terminaler Region essentiell für den Tat-Transport sind, da die Substitution dieser Aminosäurereste zur Inhibierung des Tat-Transports führt. Des Weiteren wird generell in

Frage gestellt, ob die *hinge*-Region ausreichend flexibel ist, um die Integration der APH in die Membran zu ermöglichen (Dabney-Smith et al., 2006).

Ein anderes Modell sieht vor, dass TatA-Oligomere die Membran destabilisieren, indem eine temporäre Ausdünnung herbeigeführt wird, die den Transport von Substraten ermöglicht (Brüser und Sanders et al., 2003). Ausgangspunkt für diese Theorie ist die Annahme, dass die Transmembranhelix von TatA zu kurz ist, um die Lipiddoppelschicht vollständig zu durchspannen (Rodriguez et al., 2013). Petterson et al. (2018) analysierten mittels Kernspinresonanzspektroskopie die Struktur von TatA aus *A. thaliana* und stellten hingegen fest, dass sich der N-Terminus der TMH des Proteins in Mizellen unter Zusatz von Lipiden um zwei bis drei Aminosäurereste ausdehnen kann. Diese Dynamik der TMH könnte als treibende Kraft für eine lokale Ausdünnung der Lipiddoppelschicht fungieren. Für *E. coli* wurde kürzlich gezeigt, dass TMH und APH von TatA unter Transportbedingungen gemeinsam transient in die Lipiddoppelschicht eintauchen, wodurch eine lokale Membranausdünnung herbeigeführt wird (Hou et al., 2018).

Des Weiteren ist es möglich, dass der TatBC-Rezeptorkomplex als eigentliches Translokationselement fungiert, welches durch die Assoziation von TatA in einen aktiven Zustand überführt wird. So wurde für TatA mit Hilfe von Transportversuchen mit intakten Thylakoiden ein positiv kooperativer Effekt im Translokationsprozess ermittelt, der wiederum eine Funktion als Coenzym nahelegt (Hauer et al., 2013).

1.5 *In thylakoido*-Rekonstitutionsversuche zur Untersuchung des Tat-Transports

Das Hauptziel der Forschung zum Tat-Transport ist die Entschlüsselung des Translokationsmechanismus. Eine Möglichkeit dazu stellt die Analyse der Tat-Komponenten dar. Die funktionelle Untersuchung des pflanzlichen Tat-Transportsystems basiert vor allem auf Transportversuchen mit isolierten Thylakoiden (*in thylakoido*-Versuche) und *in vitro* synthetisierten Tat-Substraten. Die aus *Zea mays* und *Pisum sativum* isolierten Thylakoide erwiesen sich dabei als effiziente *in thylakoido*-Systeme, die authentische und chimäre Tat-Substrate quantitativ in das Thylakoidlumen transportieren (z.B. Cline et al., 1992; Klösgen et al., 1992; Robinson et al., 1994; Berghöfer & Klösgen, 1999).

Mit Hilfe des *in thylakoido*-Transportsystems konnte eine Methode etabliert werden, die die funktionelle Analyse von TatA ermöglicht. So konnte die Aktivität des intrinsischen Proteins durch Extraktion mit chaotropen Salzen oder durch Behandlung der isolierten Thylakoide mit

TatA-spezifischen Antikörpern zunächst ausgeschaltet werden und durch Zugabe von extern zugegebenem TatA wiederhergestellt werden (Dabney-Smith et al., 2003; Frielingsdorf et al., 2008; Hauer et al., 2013). Durch solche *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuche war es möglich, den TatA-Bedarf während des Tat-Transports eines Modellsubstrats zu bestimmen (Hauer et al., 2013) sowie verschiedene TatA-Varianten zu charakterisieren (Dabney-Smith et al., 2003; Hauer et al., 2017).

1.6 Zielstellung

Hauptziel dieser Arbeit war die Analyse der TatB-Funktion mit Hilfe von *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuchen. Dafür sollte zunächst die intrinsische TatB-Funktion in isolierten Thylakoiden aus *Pisum sativum* mit Hilfe eines TatB-spezifischen Antikörpers inhibiert und anschließend durch die Zugabe von *in vitro* synthetisiertem oder heterolog synthetisiertem und gereinigtem TatB rekonstituiert werden. Außerdem sollte die Assemblierung des gereinigten TatB-Proteins in die TatBC-Komplexe nachgewiesen werden.

Zunächst sollte mit Hilfe von *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuchen der TatB-Bedarf während des Tat-Transport eines Modellsubstrats bestimmt werden. Des Weiteren war die Charakterisierung verschiedener TatB-Varianten geplant. Da die TatA-Menge im Rahmen von Waschsritten im *in thylakoido*-Versuch limitiert ist, sollte überprüft werden, ob die Zugabe von TatA die TatB-vermittelte Rekonstitution des Tat-Transports beeinflusst.

In Pflanzen und in *E.coli*-Bakterien üben TatA und TatB verschiedene Funktionen im Translokationsprozess aus. Während TatA den Transport eines Substrats vermittelt und dabei nur transient mit dem TatBC-Rezeptorkomplex interagiert, vollführt TatB im heterooligomeren Komplex mit TatC die Funktion des Substratrezeptors (Settles & Martienssen, 1998; Cline & Mori, 2001; Mori & Cline, 2002; Maurer et al., 2010; Alcock et al., 2013; Aldridge et al., 2014). Um zu analysieren, ob die TMH- bzw. die APH- und C-terminalen Regionen der strukturell ähnlichen Proteine für die Funktionsausprägung relevant sind, wurden TatAB-Chimären erstellt. Diese chimären Proteine sollten in einem weiteren Teil der Arbeit in Rekonstitutionsversuchen charakterisiert werden, in denen die intrinsische Funktion von TatA (Hauer et al., 2013) bzw. TatB inhibiert wurde.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf), Biomol (Hamburg), GE Healthcare (München), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (München), Invitrogen (Karlsruhe) und Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot) bezogen. Die eingesetzten Radiochemikalien wurden von der Firma Perkin-Elmer (Rodgau-Jügesheim) bezogen.

2.1.2 Längenstandards

Art	Name	Hersteller
DNA-Marker	1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot)
Proteinmarker	PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot)
	HMW Native Marker	GE Healthcare (München)

2.1.3 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
<i>Phusion</i> DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot)
PfuTurbo® DNA-Polymerase	Stratagene (La Jolla, USA)
Restriktionsendonuklease <i>DpnI</i> , <i>NotI</i>	Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot)
RiboLock™ Ribonuklease-Inhibitor	Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot)
T4-DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot)
T3-RNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot)
T7-RNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot)
NZYTaq-DNA-Polymerase	Nzytech (Lissabon, Portugal)
Thermolysin	Sigma-Aldrich (München)

2.1.4 Reaktionskits

Bezeichnung	Hersteller
<i>Flexi</i> ® Rabbit Reticulocyte Lysate System	Promega (Mannheim)
<i>QuikChange</i> ® Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene (La Jolla, USA)
<i>NucleoSpin</i> ® Plasmid	Macherey-Nagel (Düren)
<i>Nucleobond</i> ® AX	Macherey-Nagel (Düren)
<i>NucleoSpin</i> ® Extract	Macherey-Nagel (Düren)
<i>RTS 100 Wheat Germ CECF Kit</i>	5PRIME (Hilden), später biotechrabbit (Hennigsdorf)
<i>SureClean Plus</i>	Bioline (Luckenwalde)

Bezeichnung	Hersteller
Wheat Germ Extract	Promega (Mannheim)

2.1.5 Dialyseschläuche

Bezeichnung	Eigenschaften	Hersteller
ZelluTrans 1,0 V	MWCO 1 kDa	Roth (Karlsruhe)
MEMBRA-CEL® dialysis tubing	MWCO 3,5 kDa	Serva (Heidelberg)

2.1.6 Membranen

Bezeichnung	Eigenschaften	Hersteller
Amersham Hybond PVDF-Membran	0,2 µM	Roth (Karlsruhe)
Potran Nitrocellulose	0,1 µM	Schleicher & Schuell (München)

2.1.7 Zellaufschluss

Bezeichnung	Hersteller
French Pressure Cell Press (FA-078A)	SLM AMINCO (jetzt Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Roth)
French Pressure Cell FA-031 (40K)	St. Leon-Roth
Ultraschall-Homogenisator HD 3100 Sonotrode MS 72	Bandelin (Berlin)

2.1.8 Affinitätschromatographie

Bezeichnung	Eigenschaften	Hersteller
Ni Sepharose Fast Flow	Ni ²⁺ -NTA-Sepharose	GE Healthcare (München)
Econo-Pac® Chromatography Columns (20 ml)	Schwerkraftsäule, beladen mit 5 ml Ni ²⁺ -NTA-Sepharose	Bio-Rad (Hercules, USA)
EC 125/4 Nucleosil 500-5 C3 PPN	HPLC-Säule	Macherey-Nagel (Düren)

2.1.9 RP-HPLC

Bezeichnung	Eigenschaften	Hersteller
Chromaster HPLC-System	5430 Diode Array 5310 Column Oven 5260 Auto Sampler (mit Foxy 18 mm) 5110 Pump	VWR (Darmstadt)
HPLC-Steuerungsprogramm	EZChrom <i>Elite</i>	Agilent Technologies (Waldbronn)
RP-HPLC Säule	EC 125/4 Nucleosil 500-5 C3 PPN	Macherey-Nagel (Düren)

2.1.10 Nukleotide

Bezeichnung	Hersteller
RNA-Cap-Strukturanalogon	New England Biolabs (Frankfurt/Main)
Ribonukleotide	Roche (Basel)
Desoxyribonukleotide	Roth (Karlsruhe)

2.1.11 Vektoren

Bezeichnung	Herkunft
pBSC II KS	Clausmeyer et al., 1993
pBAT	Annweiler et al., 1991, Vektorkarte in Anhang 1
pIVEX 1.3 WG	SPRIME (Hilden), Vektorkarte in Anhang 2
pET30a	erhalten von Dr. Mario Jakob, Merck (Darmstadt), Vektorkarte in Anhang 3
pET28a	erhalten von Dr. Mario Jakob, Novagen, Vektorkarte in Anhang 4
pETSUMO	erhalten von AG Sinning (Heidelberg), Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Roth), Vektorkarte in Anhang 5

2.1.12 Oligonukleotide

→ vorhandene Primer zur Sequenzierung (MWG Biotech, Ebersberg):

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
M13 fw	GGTTTTCCCAGTCACGACGTTG
M13 rv	CACACAGGAAACAGCTATGACC
T7 prom	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 term	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

→ Rf-Primer zur Erstellung von Klonen aus *Pisum sativum* mittels Restriktionsfreier (Rf) Klonierung (Metabion (Martinsried) und Biologio BV (Nijmegen, Niederlande):

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
BAG pea BAT fw	TCGAAGCTTGATATCGAATTCATGTTTGGTCCTAAAGGTCTTGCTGAGG
mTatB pea BAT Rf rv	GGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCTATAAATCCGAAGGTAACGACG
Zielklon / Template	TatB-Antigen (pBAT) / TatB _{v245M} (pBAT)
BAG pea pIVEX fw	CCCCACAACAGCTTGTGCAACCATGTTTGGTCCTAAAGGTCTTGCTGAGG
mTatB pea pIVEX Rf rv	GAACCCCCCGGGAGCTCGCTCGAGCTATAAATCCGAAGGTAACGACG
Zielklon / Template	TatB-Antigen (pIVEX) / TatB _{v245M} (pIVEX)
TatA(N20Bpea)BAT Rf fw	TCGAAGCTTGATATCGAATTCATGGCCTTCTCGGTCTAGGCGTGCTG
mTatB pea BAT Rf rv	GGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCTATAAATCCGAAGGTAACGACG
Zielklon / Template	TatAB (pBAT) / TatAB (pET30a)

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
mTatA1 pea BAT Rf fw	GACTCGAAGCTTGATATCGAATTCATGGCCTTCTTCGGTCTAGGCGTGC
mTatA1 pea BAT CtM Rf rv	CCGCTCTAGAAGCTAGTGGATCCTCACATTACATTATCCTTTGTGCTGG
Zielklon / Template	TatA _{E71D Ct.M} (pBAT) / pTatA _{E71D Ct.M} (pBAT)
mTatB pea BAT Rf fw	GACTCGAAGCTTGATATCGAATTCATGGCGTCTCTCTTTGGGTTGGAG
mTatB pea BAT Rf rv	GGCGGCCGCTCTAGAAGCTAGTGGATCCCTATAAATCCGAAGGTAACGACG
Zielklon / Template	TatB _{V245M} (pBAT) / pTatB _{V245M} (pBAT)
mTatB pea BAT Rf fw	ACTCGAAGCTTGATATCGAATTCATGGCGTCTCTCTTTGGGTTGGAG
TatB/A int Rf rv	CTTCGGGCAATTTCTTGGGACCGAAAACCAACAAAGCCACAACCCC
Zielklon / Template	TatBA _{E71D Ct.M} (pBAT) / TatB _{V245M} (pBAT)
TatA(N20Bpea)BAT Rf fw	CTCGAAGCTTGATATCGAATTCATGGCCTTCTTCGGTCTAGGCGTGCCTG
mTatB pea BAT Rf rv	GGCGGCCGCTCTAGAAGCTAGTGGATCCCTATAAATCCGAAGGTAACGACG
Zielklon / Template	TatAB (pBAT) / TatAB (pET30a)
HS-TatBp30Rf fw	CGACGACGACGACAAGGCCATGGCGTCTCTCTTTGGGTTGGAGCAC
TatB/A int Rf rv	CTTCGGGCAATTTCTTGGGACCGAAAACCAACAAAGCCACAACCCC
Zielklon / Template	TatBA (pET30a) / TatB (pET30a)
SUMO wo SAM fw	AGAGAACAGATTGGTGGAGCGTCTCTCTTTGGGGT
SUMO wo SAM rv	ACCCCAAAGAGAGACGCTCCACCAATCTGTTCTCT
Zielklon / Template	TatB ohne SA-linker und Startmet.(pETSUMO) / TatB (pETSUMO)

→ Primer für die zielgerichtete Mutagenese (*Quik Change*) folgender Klone

(Metabion, Martinsried):

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
mBE11CnewQCM fw	CTCTCTTTGGGGTTGGAGCACCTTGTGCTTTGGTAATTGGGGTTGTGGC
mBE11CnewQCM rv	GCCACAACCCCAATTACCAAAGCACAAGGTGCTCCAACCCCAAAGAGAG
Zielkonstrukt	TatB,E10C (pBAT) und TatB,E10A (pET30); <i>Pisum sativum</i>
mBpea E11A QCM fw	GGTTGGAGCACCTGCAGCTTTGGTAATGT
mBpea E11A QCM rv	CAATTACCAAAGCTGCAGGTGCTCCAACC
Zielkonstrukt	TatB,E10A (pBAT) und TatB,E10A (pET30); <i>Pisum sativum</i>
30-mPeaB-MJ-fw	GTTACCTTCGGATTTAATGTAGCTCGAGCACCACC
30-mPeaB-MJ-rv	GGTGGTGTGCTCGAGCTACATTAATCCGAAGGTAAC
Zielkonstrukt	TatTB _M (pET30) und TatTB _M (pETSUMO); <i>Pisum sativum</i>
30-mPeaB-His-fw	CACCACCACCACATGAGATCCGGCTGCTA
30-mPeaB-His-rv	TAGCAGCCGGATCTCATGTGGTGGTGGTGGTG
Zielkonstrukt	TatTB _{M-His} (pET30); <i>Pisum sativum</i>
Pea TatB V245M fw	GAAACTGCTGCAACTATGCCACCACCACAG
Pea TatB V245M rv	CTGTGGTGGTGGCATAGTTGCAGCAGTTTC
Zielkonstrukt	TatAB _{V245M} (pBAT); <i>Pisum sativum</i>

2.1.13 Klone

→ Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Klone

Die Klone lagen entweder bereits vor oder wurden im Rahmen der Arbeit erstellt (Herkunft: ¹Clausmeyer et al., 1993; ²Kathleen Heilmann; ³eigene Masterarbeit; ⁴diese Arbeit; ⁵Sascha Paatz; ⁶Dr. Mario Jakob).

2.1.13.1 Tat-Substrate

→ Konstrukte zur *in vitro*-Synthese von Tat-Substraten mittels Flexi[®]Rabbit Reticulocyte Lysate System

Bezeichnung	Vektor	Promotor	Linearisierung
pOEC16 (Abk.) ¹	pBSC II KS	T7	HindIII
pOEC23 (Abk.) ¹	pBSC II KS	T7	Sall
16/23 (Abk.) ¹	pBSC II KS	T7	Sall

2.1.13.2 Tat-Komponenten

→ Konstrukte zur *in vitro*-Synthese von Tat-Proteinen mittels Flexi[®]Rabbit Reticulocyte Lysate System (pBAT), Wheat Germ Extract (pBAT) und Rapid Translation System (pIVEX)

Die Insertion der Zielsequenzen erfolgte für pBAT-Konstrukte mittels *EcoRI* und *BamHI*, für pIVEX-Konstrukte mittels *NcoI* und *XhoI*. Die pBAT-Konstrukte wurden vor *in vitro*-Transkription mit *NotI* linearisiert. Da TatA und TatB aus *A. thaliana* und *P. sativum* keinen Methioninrest enthalten, wurde jeweils ein einzelner Aminosäureaustausch zur radioaktiven Markierung mittels ³⁵S-Methionin vorgenommen. Die Position des Aminosäureaustauschs ist in der Bezeichnung angegeben.

Bezeichnung	Vektor	Promotor	synthetisiertes Protein
TatB _{V245M} (<i>P. sativum</i>) ³	pBAT	T3	reifes Protein
TatB _{V245M} (<i>P. sativum</i>) ³	pIVEX	T7	reifes Protein
pTatB _{V245M} (<i>P. sativum</i>) ²	pBAT	T3	Vorläuferprotein
pTatB _{L213M} (<i>A. thaliana</i>) ²	pBAT	T3	Vorläuferprotein
TatB,E10A _{V245M} (<i>P. sativum</i>) ⁴	pBAT	T3	reifes Protein, Aminosäureaustausch in TMH

Bezeichnung	Vektor	Promotor	synthetisiertes Protein
TatB,E10C _{V245M} (<i>P. sativum</i>) ⁴	pBAT	T3	reifes Protein, Aminosäureaustausch in TMH
TatB-Antigen _{V245M} (<i>P. sativum</i>) ⁴	pBAT	T3	reifes Protein ohne TMH, Beginn ab <i>hinge</i> -Glycinrest, ohne C-term. His- <i>tag</i>
TatB-Antigen _{V245M} (<i>P. sativum</i>) ⁴	pIVEX	T7	reifes Protein ohne TMH, Beginn ab <i>hinge</i> -Glycinrest, ohne C-term. His- <i>tag</i>
TatA _M (<i>P. sativum</i>) ⁴	pBAT	T3	reifes Protein, mit C-term. Methionin
TatAB _{V245M} (<i>P. sativum</i>) ⁴	pBAT	T3	reifes Protein, chimäres Protein (TMH von TatA, APH und C-term. Region von TatB)
TatBA _M (<i>P. sativum</i>) ⁴	pBAT	T3	reifes Protein, chimäres Protein (TMH von TatB, APH und C-term. Region von TatA), mit C-term. Methionin

→ Konstrukte zur heterologen Synthese in *E. coli*-Zellen des Stammes BL21(DE3)

Die Insertion der Zielsequenzen erfolgte für pET30a- bzw. pETSUMO-Konstrukte mittels *EcoRI* und *BamHI*, für pIVEX-Konstrukte mittels *NcoI* und *XhoI*. Bei restriktionsfreier Klonierung (siehe Kapitel 2.2.1.2) wurden die Oligonukleotide, die der Amplifikation des Megaprimeres dienten, mit den genannten Schnittstellen synthetisiert (siehe Kapitel 2.1.12 Oligonukleotide für restriktionsfreie Klonierung). Die Synthese der SUMO-Protease Ulp1 erfolgte ausgehend von pET28a, wobei Ulp1 mit N-terminaler His/*ZZ-tag*-Region vorlag. Dieses Konstrukt wurde von der Arbeitsgruppe Sinning (Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Die Aminosäuresequenzen ausgewählter Tat-Proteine sind in Anhang 19 dargestellt.

Bezeichnung	Vektor	Eigenschaften des gereinigten Proteins
TatB (<i>P. sativum</i>) ⁵	pET30a	reifes Protein ohne Start-Methionin
TatB _M (<i>P. sativum</i>) ⁴	pETSUMO	reifes Protein ohne Start-Methionin, mit C-term. Methionin
TatB _M (<i>P. sativum</i>) ⁴	pET30a	reifes Protein ohne Start-Methionin, mit C-term. Methionin
TatB (<i>A. thaliana</i>) ⁶	pET30a	reifes Protein ohne Start-Methionin
TatB,E10A (<i>P. sativum</i>) ⁴	pET30a	reifes Protein ohne Start-Methionin, Aminosäureaustausch in TMH
TatB,E10C (<i>P. sativum</i>) ⁴	pET30a	reifes Protein ohne Start-Methionin, Aminosäureaustausch in TMH
TatB-core (<i>P. sativum</i>) ⁶	pET30a	reifes Protein ohne Start-Methionin, C-term. verkürzt auf N103
TatB-core (<i>A. thaliana</i>) ⁶	pET30a	reifes Protein ohne Start-Methionin, C-term. verkürzt auf N106

Bezeichnung	Vektor	Eigenschaften des gereinigten Proteins
TatB-Antigen (<i>P. sativum</i>) ⁶	pET28a	reifes Protein mit Startmethionin ohne TMH, Beginn ab <i>hinge</i> -Glycinrest; über LysGlu- <i>linker</i> mit C-term. Hexahistidin- <i>tag</i> verbunden
TatA (<i>P. sativum</i>) ⁶	pET30a	reifes Protein ohne Start-Methionin
TatA (<i>A. thaliana</i>) ⁶	pET30a	reifes Protein ohne Start-Methionin
TatA,E10C (<i>A. thaliana</i>) ⁶	pET30a	reifes Protein ohne Start-Methionin, Aminosäureaustausch in TMH
TatAB (<i>P. sativum</i>) ⁶	pET30a	reifes Protein ohne Start-Methionin, chimäres Protein (TMH von TatA, APH und C-term. von TatB)
TatBA (<i>P. sativum</i>) ⁴	pET30a	reifes Protein ohne Start-Methionin, chimäres Protein (TMH von TatB, APH und C-term. von TatA)
TatB-His (<i>P. sativum</i>) ⁴	pET30a	reifes Protein ohne Start-Methionin, mit C-term. Hexahistidin- <i>tag</i>
Ulp1 (<i>S. cerevisiae</i>)	pET28a	His/ZZ-Ulp1 (SUMO-Protease mit N-terminaler His/ZZ <i>tag</i> -Region)

2.1.14 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Hersteller
Top10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 nupG recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galE15</i> <i>galk16 rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> λ ⁻	Invitrogen (Carlsbad, USA)
BL21 (DE3)	F – <i>ompT gal dcm lon hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1</i> <i>sam7 nin5</i>])	Novagen (Darmstadt)

2.1.15 Kulturmedien

Medium	Zusammensetzung	Konzentration
LB-Medium (<i>lysogeny broth</i>)	Pepton Hefeextrakt NaCl pH = 7,0 (NaOH)	1,0 % (w/v) 0,5 % (w/v) 0,5 % (w/v)
M9-Salze (5 x)	Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ NaCl NH ₄ Cl	239 mM 110 mM 42,8 mM 93,5 mM
M9-Minimalmedium	M9-Salze MgSO ₄ (ersetzt durch MgCl ₂ bei geplanter Überexpression unter Anwesenheit von ³⁵ S-Methionin) Glucose CaCl ₂	1 x 20,6 mM 0,41 % (w/v) 1 mM

Medium	Zusammensetzung	Konzentration
	LB-Medium	1 %
Festmedium	LB-Medium oder M9-Medium	
	Bacto-Agar	1,5 % (w/v)
SOC-Medium (<i>super optimal broth</i>)	Pepton	2,0 % (w/v)
	Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
	MgCl ₂	10 mM
	MgSO ₄	10 mM
	Glucose	20 mM
	pH = 7,0 (NaOH)	
Lagermedium für Stammkulturen	MgSO ₄	100 mM
	Tris	2,5 mM
	-> pH = 8,0 (HCl)	
	Glycerin	65 % (v/v)

2.1.16 Antibiotika

Bezeichnung	Arbeitskonzentration	Hersteller
Ampicilin (Amp)	100 µg/ml	Serva (Heidelberg)
Kanamycin (Kann)	50 µg/ml	Serva (Heidelberg)

2.1.17 Antikörper

Bezeichnung	Eigenschaften	Herkunft
anti-TatA (<i>A.th</i>)	polyklonaler Antikörper (gereinigt, aus Kaninchen), gerichtet gegen löslichen Teil von TatA aus <i>A. thaliana</i> , Kreuzreaktion mit TatA aus <i>P. sativum</i>	Innovagen (Lund), gereinigt von Dr. Mario Jakob
anti-TatB (<i>P.s</i>)	polyklonaler Antikörper (gereinigt, aus Kaninchen), gerichtet gegen löslichen Teil von TatB aus <i>P. sativum</i>	Innovagen (Lund), gereinigt von Dr. Mario Jakob
anti-rabbit-IgG-HRP	monoklonaler Antikörper (aus Ziege), gerichtet gegen alle in Kaninchen generierten Antikörper, konjugiert mit <i>horseraddish</i> -Peroxidase (HRP)	Sigma-Aldrich (München)
anti-His-HRP	monoklonaler Antikörper (aus Maus) gerichtet gegen Polyhistidin- <i>tags</i> , konjugiert mit <i>horseraddish</i> -Peroxidase (HRP)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)

2.1.18 Pflanzenmaterial

Zur Chloroplastenpräparation- und Thylakoidpräparation wurde das Kultivar *Pisum sativum* L, var. Feltham First herangezogen. Die Aussaat und Kultivierung erfolgte auf Tonsubstrat mit Kokosfaser (CL Ton Kokos; Einheitserde, Sinntal-Altengronau). Die Anzucht wurde unter Langtagbedingungen vorgenommen. Zum Erntezeitpunkt betrug das Alter der Keimlinge sieben Tage.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Standardmethoden

Standardmethoden der Molekularbiologie wie DNA- und RNA-Fällung oder Agarosegelelektrophoresen wurden auf der Grundlage der Protokolle von Sambrook & Russell (2001) durchgeführt. Kolonie-PCR-Reaktionen wurden mit NZYtaq DNA-Polymerase (siehe Kapitel 2.1.3) durchgeführt. Plasmidpräparationen erfolgten unter Verwendung der Kits *NucleoSpin® Plasmid* oder *Nucleobond® AX*. Die Reinigung von PCR-Produkten wurde mit *NucleoSpin® Extract* oder *Sure Clean Plus* durchgeführt. Sequenzierungsreaktionen wurden von Seqlab (Göttigen) übernommen.

2.2.1.2 Restriktionsfreie Klonierung

Die restriktionsfreie Klonierung erfolgte nach Angaben von van den Ent & Löwe (2006). Die Amplifikationen wurden mit der *Phusion®* DNA-Polymerase (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot) durchgeführt.

2.2.1.3 Zielgerichtete Mutagenese

Die vorgenommenen Mutagenesen erfolgten mittels des *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kits* (Stratagene, La Jolla, USA) unter Verwendung der *PfuTurbo* DNA-Polymerase nach den Angaben des Herstellers.

2.2.1.4 Transformation von *E. coli* Zellen

Elektroporation für elektrokompente Zellen

Zur Transformation wurden je 50 μ l *E. coli*-Zellen des Stammes BL21 (DE3) 10 min auf Eis aufgetaut und mit je 50-200 ng Plasmid-DNA versetzt, wobei maximal 2 μ l DNA (vorliegend in TE-Puffer) verwendet wurden. Der Ansatz wurde in Transformationsküvetten (Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf) überführt. Die Elektroporation erfolgte im *E. coli*-Pulser (Biorad, München) bei 1,8 kV. Nach Zugabe von 1 ml SOC-Medium wurde der Ansatz 15 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Ein geeignetes Volumen des Transformationsansatzes wurde auf LB-Platten, die mit entsprechendem Antibiotikum versetzt wurden, ausplattiert und ca. 16 h bei 37 °C inkubiert.

Hitzeschock für chemokompente Zellen

50 μ l *E. coli*-Zellen des Stammes Top10 wurden mit 50-100 ng Plasmid-DNA versetzt und 20 min auf Eis inkubiert, für 50 s bei 42 °C und anschließend nochmals für 2 min auf Eis inkubiert. Im Folgenden wurde der Transformationsansatz, versetzt mit 900 μ l SOC-Medium, 15 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Ein geeignetes Volumen des Transformationsansatzes wurde auf LB-Platten, die mit entsprechendem Antibiotikum versetzt wurden, ausplattiert und ca. 16 h bei 37 °C inkubiert.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 *In vitro*-Synthese von Proteinen

Die *in vitro*-Synthese von Proteinen mittels *Flexi[®] Rabbit Reticulocyte Lysate System* (Promega) und *Wheat Germ Extract* (Promega) erforderte die vorherige Linearisierung des pBAT- bzw. pBSc II KS-Vektors „downstream“ des 3'-Endes des Gens und die Transkription der codierenden DNA. Die zur Linearisierung verwendeten Restriktionsenzyme sind in Kapitel 2.1.3 angegeben. Die *in vitro*-Transkription wurde, wie in den Dissertationen von Stefan Frielingsdorf (2003) und Sabine Molik (2005) beschrieben, durchgeführt. 4 μ l des Transkriptionsansatzes wurden zur Kontrolle der Qualität auf ein 1,5 %iges Agarosegel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die *in vitro*-Translation erfolgte nach den Angaben der Hersteller. Des Weiteren wurde das *Rapid Translation System*, das die *in vitro*-

Synthese von Proteinen ausgehend von Plasmid-DNA ermöglicht, verwendet. Für die radioaktive Markierung jeglicher Translationsprodukte wurde ^{35}S -Methionin verwendet.

2.2.2.2 Polyacrylamid-Gelsysteme

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Trennung von Proteinen erfolgte u. a. über SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Aufzutragende Proben wurden mit Laemmli-Probenpuffer (1-2 x) versetzt. Nach Anlegen eines elektrischen Feldes (bis zu 30 mA/Gel) und unter Verwendung von Laemmli-Laufpuffer durchwandern die Proteine Sammel- und Trenngel. Die Zusammensetzungen der benötigten Puffer und der PAA-SDS-Gele sind in der folgenden Tabelle angegeben:

	Zusammensetzung	Konzentration
Puffer		
Laemmli-Probenpuffer (1 x)	Tris-HCl (pH 6,8)	62,5 mM
	Glycerin	10 % (w/v)
	SDS	2 % (w/v)
	Bromphenol Blau	0,04 % (w/v)
	β -Mercaptoethanol	5 % (v/v)
SDS-Laufpuffer	Tris-HCl (pH 8,45)	25 mM
	Glycin	192 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
PAA-Gel		
Sammelgel	Acrylamid/Bis-Acrylamid (37,5:1)	5 % (v/v)
	Tris-HCl (pH 6.8)	125 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	TEMED	0,05 % (v/v)
	APS	0,05 % (w/v)
Trenngel	Acrylamid/Bis-Acrylamid (1:37,5)	12,5, 15 % (v/v) oder 10 – 17,5 % als Gradientengel
	Tris-HCl (pH 8.8)	375 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	TEMED	0,05 % (v/v)
	APS	0,05 % (w/v)

Blue Native Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE)

Die native Auftrennung von Proteinen erfolgte über 5 – 13,5 %ige Gradientengele mittels BN-PAGE (Schägger & von Jagow, 1991; Schägger, et al., 1994). Die Elektrophorese wurde über Nacht bei 100 V durchgeführt, wobei Kathodenpuffer I verwendet wurde. Am nächsten Tag wurde dieser durch Kathodenpuffer II ersetzt und die Elektrophorese bei 400 V durchgeführt.

	Zusammensetzung	Konzentration
Puffer		
Kathodenpuffer I	Tricin	50 mM
	Bis-Tris	15 mM
	Coomassie Brilliant Blue G-250	0,0075 % (w/v)
Kathodenpuffer II	Tricin	50 mM
	Bis-Tris	15 mM
Anodenpuffer	Bis-Tris	50 mM
PAA-Gel		
Sammelgel	Acrylamid/Bis-Acrylamid (37,5:1)	4,5 % (v/v)
	Bis-Tris (pH 7)	50 mM
	ϵ -Aminocapronsäure	0,5 M (w/v)
	Digitonin	0,03 % (w/v)
	APS	0,09 % (v/v)
	TEMED	0,09 % (w/v)
Trenngel	Acrylamid/Bis-Acrylamid (1:37,5)	5 – 13,5 % als Gradientengel
	Bis-Tris (pH 7)	50 mM
	ϵ -Aminocapronsäure	0,3125 M
	Digitonin	0,03 % (w/v)
	Glycerin	5,18 % (v/v)
	APS	0,045 % (w/v)
	TEMED	0,045 % (v/v)

2.2.2.3 *Heterologe Synthese von Tat-Proteinen*

Von Einzelkolonien (bzw. einem Zellstock) transformierte *E. coli*-Zellen des Stammes BL21 (DE3) wurden 5 ml Kulturen in M9-Medium mit 50 μ g/ml Kanamycin angesetzt und für mindestens 16 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert (betrifft alle Konstrukte aus Kapitel 2.1.13.2: Tat-Komponenten, Konstrukte zur heterologen Synthese in *E. coli*). Nach Übernachtinkubation wurden Hauptkulturen (500 ml) inokuliert (1:100). Die Zellen wurden bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ schüttelnd bei 37 °C inkubiert, mit 1 mM IPTG versetzt und wiederholt über Nacht unter diesen Bedingungen inkubiert. Zur Ernte wurden die Kulturen 20 min bei 4.000 rpm bei 4°C im Ausschwingrotor TX-750 (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Roth)

sedimentiert, wobei der Überstand verworfen und das Pellet in 25 ml PBS gelöst wurde. Das Zellpellet wurde bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren oder direkt in drei Durchgängen mittels *French Press* (1000 psi) unter Zugabe von 1 mM PMSF aufgeschlossen. Die Reinigung der Proteine ist in Kapitel 2.2.2.5 beschrieben.

2.2.2.4 Heterologe Synthese von *TatB_M* in Anwesenheit von ^{35}S -Methionin

Zur Synthese des TatB-Proteins aus *Pisum sativum* in Anwesenheit von ^{35}S -Methionin wurden die Vektoren pETSUMO bzw. pET30a verwendet, die die codierende Sequenz von TatB_M beinhalten (TatB mit Methioninrest am C-Terminus; siehe Kapitel 2.1.13.2: Tat-Komponenten, Konstrukte zur heterologen Überexpression). Von Einzelkolonien (bzw. einem Zellstock) transformierte *E.coli*-Zellen (siehe Kapitel 2.2.1.4, S. 31) des Stammes BL21 (DE3) wurden 5 ml Kulturen in M9-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin angesetzt und für mindestens 16 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ schüttelnd (200 rpm) inkubiert. Dann wurden die Zellen im Verhältnis 1:100 in 20 ml M9-Medium (siehe Kapitel 2.1.15: ohne LB-Medium, anstelle von MgSO_4 wurde MgCl_2 eingesetzt) überführt. Die Hauptkulturen wurden bis zu einer $\text{OD}_{600} = 0,5$ schüttelnd bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert, mit 1 mM IPTG und $12,5\text{ }\mu\text{Ci }^{35}\text{S}$ -Methionin versetzt und wiederholt über Nacht unter diesen Bedingungen inkubiert. Die Zellen wurden bei 4.000 rpm im Ausschwingrotor TX-750 (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Roth) sedimentiert, in 20 ml Gua-HCl-Bindepuffer aufgenommen und nach Zugabe von 1 mM PMSF mittels Ultraschallsonde (6 x 5 s, je 15 s Pause auf Eis; Frequenz 20 kHz, siehe Kapitel 2.1.7) aufgeschlossen. Die Reinigung der radioaktiv markierten Proteine ist in Kapitel 2.2.2.6 angegeben.

2.2.2.5 Reinigung von His-tag-Fusionsproteinen mittels Ni^{2+} -Affinitätschromatographie

Für die Reinigung wurden folgende Puffer benötigt:

	Zusammensetzung	Konzentration
Gua-HCl-Bindepuffer	HEPES (pH 7,5)	20 mM
	NaCl	500 mM
	Imidazol	20 mM
	Guanidin HCl	6 M
Gua-HCl-Elutionspuffer	HEPES (pH 7,5)	20 mM
	NaCl	500 mM
	Imidazol	500 mM
	Guanidin HCl	6 M

Vor Beginn der Proteinreinigung wurden 25 ml der über *French Press* aufgeschlossenen Zellsuspension (Kapitel 2.1.13.2, Konstrukte zur heterologen Synthese) mit 75 ml Gua-HCl-Bindepuffer versetzt. Danach wurde diese Suspension für mindestens 1 h rührend bei 4 °C inkubiert und anschließend bei 28.700 rpm (SW32-Ti Ausschwingrotor (Beckmann Coulter, Krefeld)) ultrazentrifugiert. Der Überstand (IBvS) wurde im Anschluss mit einer Fließgeschwindigkeit von 150 µl/min bei 4 °C auf eine mit Gua-HCl-Bindepuffer vorinkubierte Schwerkraftsäule geladen. Das Matrixvolumen betrug 5 ml. Die Säulen wurden zweimal mit 25 ml Gua-HCl-Bindepuffer gewaschen. Die Waschfraktion wurde aufgefangen. Zur Elution der Proteine wurde die Säule nacheinander mit 3 ml (Fraktion E1), 6 ml (Fraktion E2) und nochmals 6 ml (Fraktion E3) Elutionsspuffer inkubiert. 50 µl jeder Reinigungsfraktion wurden in ein neues Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt und mit 950 µl 80 % Aceton versetzt. Die Proben wurden anschließend 30 min bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert (Heraeus Biofuge Fresco), die Pellets mit 80 % Aceton gewaschen, in 50 µl 2 x Laemmli-Probenpuffer resuspendiert und 5 min bei 95 °C denaturiert. Daraufhin wurden die Reinigungsfraktionen mittels SDS-PAGE analysiert (siehe Kapitel 2.2.2.2).

2.2.2.6 Reinigung von radioaktiv markierten His-Tat_{BM}-Fusionsproteinen mittels Ni²⁺ Affinitätschromatographie

Für die Reinigung wurden folgende Puffer zusätzlich benötigt:

	Zusammensetzung	Konzentration
Harnstoff-Bindepuffer	HEPES (pH 7,5)	20 mM
	NaCl	500 mM
	Imidazol	20 mM
	Harnstoff	6 M
Harnstoff-Elutionspuffer	HEPES (pH 7,5)	20 mM
	NaCl	500 mM
	Imidazol	500 mM
	Harnstoff	6 M

Die aufgeschlossenen, radioaktiv markierten Proteine (siehe Kapitel 2.2.2.4), wurden für mindestens 1 h rührend bei 4 °C inkubiert und anschließend bei 28.700 rpm (SW32-Ti Ausschwingrotor; Beckmann Coulter, Krefeld) ultrazentrifugiert. Die Proteinlösungen wurden mit einer Fließgeschwindigkeit von 150 µl/min bei 4 °C auf eine mit Gua-HCl-Bindepuffer vorinkubierte Schwerkraftsäule geladen. Das Matrixvolumen betrug 5 ml. Die Säule wurde einmal mit 25 ml Gua-HCl-Bindepuffer gewaschen. Die Waschfraktion wurde aufgefangen.

Wenn die Proteinsynthese ausgehend vom pETSUMO-Vektor erfolgte, wurde die Säule vor Elution auf Harnstoff-Bindepuffer umgepuffert (10 ml), da für die SUMO-Protease Ulp1 (*Ubl-specific protease*; aus *Saccharomyces cerevisiae*) unter Gua-HCl eine eingeschränkte Aktivität erwartet wurde. Zur Elution von TatB_M (pETSUMO) wurden 10 ml Harnstoff-Elutionspuffer verwendet. Die Reinigung und Elution von TatB_M (pET30a) erfolgte stets unter Verwendung von Gua-HCl-Binde- bzw. Elutionspuffer. 40 µl jeder Reinigungsfraktion wurden mit 10 µl 4 x Laemmli-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend mittels SDS-PAGE analysiert (siehe Kapitel 2.2.2.2, S. 32).

2.2.2.7 Abspaltung der N-terminalen tag-Region

Folgender Puffer wurde für die Abspaltung des His/SUMO-tags benötigt:

	Zusammensetzung	Konzentration
Ulp1-Puffer	Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM
	NaCl	150 mM
	DTT	1 mM

IMAC-Elutionsfraktionen nach Proteinsynthesen ausgehend vom pET30a-Vektor wurden in Dialyseschläuche (3,5 kDa "cut off") überführt und bei 4 °C mindestens 24 h gegen H₂O_{bidest} dialysiert, wobei H₂O_{bidest} mindestens zweimal ausgetauscht wurde (Verhältnis Protein: H₂O_{bidest} = 1:200). Die dialysierten Elutionsfraktionen wurden gefriergetrocknet (Alpha 1-2 LDplus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH). Die N-terminale His/S-tag-Region wurde mittels Bromcyan entfernt (siehe Kapitel 2.2.2.7 Bromcyanspaltung). Im Falle des TatB-Antigens erfolgte keine Abspaltung des C-terminalen His-tags.

Wenn die Proteinsynthese ausgehend vom pETSUMO-Vektor erfolgte, wurden die IMAC-Elutionsfraktionen zweimal für ca. 2 h gegen Ulp1-Puffer ohne DTT dialysiert (Verhältnis Protein: H₂O_{bidest} = 1:200). Zur Abspaltung der N-terminalen His/SUMO-tag-Region wurde die SUMO-Protease Ulp1, die die Tertiärstruktur des SUMO-Proteins (hier SUMO-tag) erkennt, verwendet (siehe Kapitel 2.2.2.7 Proteasespaltung (Ulp1)). Die dialysierten Reinigungsfraktionen wurden unter Verwendung von Sartorius™ Vivaspin™ 20 PES MWCO 3 kDa (Sartorius, Göttingen) bei 4.000 rpm im Ausschwingrotor TX-750 (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Roth) auf ein Volumen von 2 ml reduziert. Die SUMO-Protease wurde ausgehend vom Vektor pETZZ (erhalten von Prof. Dr. Irmgard Sinning) synthetisiert, anschließend mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie gereinigt und gegen Ulp1-Puffer

dialysiert. Die Konzentration der gereinigten Protease wurde bestimmt ($A_{280\text{nm}}$), die Lösung aliquotiert (Endkonzentration von $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) und bei -80°C gelagert.

Bromcyanspaltung

Gefriergetrocknete Pellets der His/*S-tag*-Fusionsproteine (Proteinsynthese ausgehend von pET30a) wurden mit Bromcyan (vorliegend in Acetonitril, Lagerung bei -20°C , 30 min zuvor auftauen und lösen) und 85% Ameisensäure im Verhältnis 1:5 versetzt. Die Spaltansätze wurden für 5 h (für TatB-Proteine) oder über Nacht (für TatA-Proteine) bei 700 rpm und RT schüttelnd inkubiert. Danach wurden 10 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ hinzugefügt. Die Ansätze wurden dann für mindestens 3 Stunden bei -80°C eingefroren und anschließend lyophilisiert.

Proteasespaltung (Ulp1)

Dialysierte Reinigungsfractionen (siehe „Abspaltung der N-terminalen *tag*-Region“ in diesem Kapitel) von His/SUMO-TatB_M (Proteinsynthese ausgehend von pET30a) wurden bei 4°C mindestens 2 h gegen Ulp1-Puffer mit $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ SUMO-Protease dialysiert.

2.2.2.8 Präparative SDS-PAGE

Zur Reinigung der Tat-Proteine nach Abspaltung der N-terminalen *tag*-Regionen (siehe Kapitel 2.2.2.7) wurden die gefriergetrockneten Proteine mit Laemmli-Puffer (Endkonzentration 1 x) versetzt. Zur Auftrennung ($15 - 30 \text{ mA}/\text{Gel}$) wurden 15 %ige SDS-PAA-Gele mit einer Stärke von 1,5 mm verwendet. Das Sammelgel wurde ohne Probentaschen vorbereitet. Ca. $1 \times 0,5 \text{ cm}$ große Blotting-Papiere wurden mit $4 \mu\text{l}$ Proteinmarker (siehe Kapitel 2.1.2) versetzt. Die Zusammensetzung des SDS-PAA-Gels (12,5 oder 15 % AA) sowie des Laemmli-Probenpuffers und des Laemmli-Laufpuffers entspricht den Angaben in Kapitel 2.2.2.2 SDS-PAGE.

2.2.2.9 Elektroelution

Folgender Puffer wurde benötigt:

	Zusammensetzung	Konzentration
Elektroelutionspuffer	Tris-HCl (pH 8,0)	25 mM
	Glycin	192 mM
	SDS	2 % (w/v)

Das Herauslösen der Proteine aus Polyacrylamidgelen nach präparativer SDS-PAGE (siehe 2.2.2.8) wurde in einer Elektroelutionsapparatur (Spezialanfertigung) bei 70 V über Nacht durchgeführt. Hierbei wurden klein geschnittenen Gelfragmente in die Kathodenöffnung der Elektroelutionskammern, die mit 1 x SDS-Laufpuffer befüllt wurden, überführt und mit Elektroelutionspuffer überschichtet. Die Anodenöffnung der Kammer wurde mit SDS-Laufpuffer (siehe Kapitel 2.2.2.2 SDS-PAGE, S. 32) befüllt. Die Elektrophorese und der vorliegende Konzentrationsgradient führen zur Elution und Wanderung der Proteine auf die Anodenseite der Kammer, wobei diese an einer Membran (3,5 kDa „cut-off“) angesammelt werden. Die Proteine wurden mit SDS-Laufpuffer (2 ml) von der Membran gelöst.

2.2.2.10 RP-HPLC

Die Reinigung der aus Elektroelution gewonnenen TatA- und TatB-Proteine erfolgte über ein Reversphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographiesystem (RP-HPLC; siehe Kapitel 2.1.9) mittels Acetonitril-Wasser Gradient bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min. Vor Beginn der Reinigung wurden Schläuche und Pumpe gespült. Die Reversphasen-Säule EC 125/4 Nucleosil 500-5 C3-PPN wurde auf die entsprechenden Startbedingungen equilibriert. Das Silica-basierte Säulenmaterial ist hier an Propylreste gebunden, sodass eine apolare feste Phase vorliegt. Die Lösungsmittel A (10 % Acetonitril in H₂O_{bidest}; 0,05 % Trifluoressigsäure) und B (100 % Acetonitril; 0,05 % Trifluoressigsäure) wurden im zeitlichen Verlauf folgendermaßen eingespült: 0-2 min: 0% B; 2-3 min: 0 – 22,5 % B; 16-16,2 min: 36,6 – 67 % B; 16,2 – 21 min: 67 % B; 21 – 23 min: 89 % B; 23 – 26 min: 89 % B; 26 – 28 min: 0 % B; 28 – 40 min: 0 % B.

2.2.2.11 Massenspektrometrie

Eluate (ca. 10 µl) der RP-HPLC wurden von Dr. Angelika Schierhorn am Gerätezentrum für Massenspektrometrie der MLU Halle-Wittenberg via Matrixassisterter Laserdesorption/Ionisations- (MALDI-) und ggf. auch mittels ESI-Massenspektrometrie (MS) analysiert. Ab Januar 2018 wurden diese Arbeiten von Dr. Matt Fuszard durchgeführt.

2.2.2.12 Dialyse gereinigter Tat-Proteine

Tat-Proteine, die nach RP-HPLC-Reinigung in Acetonitril/Wasser vorlagen, wurden vor Durchführung eines *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuchs (siehe Kapitel 2.2.3.7) mittels Dialyse in physiologischen HM-Puffer (siehe Kapitel 2.2.3.3, S. 44) überführt. Hierbei wurden mindestens 400 µl einer Elutionsfraktion in einen Dialyseschlauch überführt (ZelluTrans 1,0 V (Roth, Karlsruhe), 1 kDa „cut-off“). Damit die Proteine nach der Dialyse einer Konzentrationsbestimmung nach Bradford (1976) unterzogen werden konnten, wurden vornehmlich Elutionsfraktionen mit hoher Proteinmenge verwendet ($A_{220} \geq 500$ mAU bei Detektion im RP-HPLC-Programm). Um eine Erhöhung des Proteinvolumens und folglich eine Verdünnung im Rahmen der Dialyse zu vermeiden, wurde der Dialyseschlauch stets unter Spannung mit Klemmen verschlossen. Der mit Proteinlösung befüllte Dialyseschlauch wurde in ein Becherglas mit HM-Puffer (1 l) überführt und für mindestens 16 h bei 4 °C rührend inkubiert.

Für RP-HPLC-Elutionsfraktionen von TatB-Varianten, die nach Gefriertrocknung erneut in Acetonitril (60 % (v/v)) aufgenommen wurden, wurde eine erhöhte Aggregatbildung nach der Dialyse beobachtet. Eine Gefriertrocknung zur Aufkonzentrierung von RP-HPLC-Elutionsfraktionen von TatB-Varianten sollte vermieden werden.

2.2.2.13 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der dialysierten Tat-Proteine beruhte auf der Bradford-Methode (Bradford, 1976). Zur Entfernung von Aggregaten aus Proteinlösungen wurden die dialysierten RP-HPLC-Elutionsfraktionen 20 min bei 65.000 rpm (Rotor: MLA 80; Beckmann Coulter, Krefeld) zentrifugiert und die jeweiligen Überstände anschließend vorsichtig in neue Reaktionsgefäße (1,5 ml) überführt. Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurde eine

doppelte Dreifachbestimmung mit Bradfordlösung (ROTI®Quant; Roth, Karlsruhe) bei $A_{595\text{nm}}$ durchgeführt (3 x 30 μl , 3 x 60 μl).

2.2.2.14 Visualisierung von Proteinen im Polyacrylamidgel

Coomassie-Colloidal-Färbung

Folgende Lösungen wurden benötigt:

	Zusammensetzung	Konzentration
Fixierlösung	Methanol	40 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
Lösung A	Phosphorsäure	2 % (w/v)
	Ammoniumsulfat	10 % (w/v)
Lösung B	<i>Coomassie Brilliant Blue G-250</i>	5 % (w/v)
Färbelösung	Methanol	20 % (v/v)
	Lösung A	78,4 % (v/v)
	Lösung B	1,6 % (v/v)

Für eine Färbung mit colloidalem Coomassie nach Neuhoff et al. (1985) wurde das Gel 30 min in Fixierlösung schüttelnd inkubiert, die Inkubation in Färbelösung erfolgte mindestens 3 h. Zur Entfärbung wurde $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ verwendet.

Zink-Imidazol-Färbung

Folgende Lösungen wurden benötigt:

	Zusammensetzung	Konzentration
Imidazol-Lösung	Imidazol	200 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
Zinksulfat-Lösung	$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	200 mM

Vorbereitend zur Elektroelution von Proteinen aus Polyacrylamidgelen wurde eine reversible Zink-Imidazol-Färbung durchgeführt (Ferrerias et al., 1993). Das Gel wurde 30 min in Imidazol-Lösung und anschließend bis zur gewünschten Färbung in Zinksulfat-Lösung und inkubiert. Die Reaktion wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ abgestoppt.

2.2.2.15 Autoradiographie

Folgende Lösung wurde benötigt:

	Zusammensetzung	Konzentration
Fixierlösung II	Methanol	50 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)

Um die Visualisierung ^{35}S -markierter Proteine zu ermöglichen, wurden die entsprechenden PAA-Gele je nach Größe für 30 – 60 min in Fixierlösung inkubiert und anschließend bis zu 2:45 h im Vakuum bei 80 °C getrocknet. Die getrockneten Gele wurden auf *Phosphoimager Screens* exponiert. Die radioaktiv markierten Proteine wurden mittels Fujifilm FLA-3000 (Fujifilm, Düsseldorf) unter Anwendung der Programme *BASReader* (Version 3.14) und *AIDA Image Analyzer* (Version 3.25 bzw. 5.0, Raytest, Straubenhardt) analysiert. Die Quantifizierung von Signalintensitäten wurde mit *AIDA Image Analyzer* durchgeführt.

2.2.2.16 Ni^{2+} -Affinitätschromatographie zur Reinigung von Antikörpern

Die Affinitätsreinigung der polyklonalen Antikörper anti-TatA (*A. thaliana*) anti-TatB (*P. sativum*; siehe 2.1.17, S. 29) erfolgte nach Narhi et al. (1997) und Zinecker et al. (2020).

2.2.2.17 Western Blot

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine, die einer Immundetektion unterzogen werden sollten, wurden über das Elektrobrotverfahren durch einen senkrecht zum Proteingel laufenden Strom auf eine PVDF-Membran mit einem Porendurchmesser von 0,2 μm übertragen (Towbin et al. 1979). Für die Übertragungen wurde eine Halb-Trocken-Transfereinheit (Semi-Dry Transfer Unit, Owl Separation Systems; Thermo Fisher Scientific) und ein 3-Puffer-System verwendet (*semi-dry Transfer* aus dem *Protein Blotting Handbook* (2012) von Millipore (Merck, Darmstadt):

	Zusammensetzung	Konzentration
Anodenpuffer I	Tris (pH 10,4)	300 mM
	Methanol	10 % (v/v)
Anodenpuffer II	Tris (pH 10,4)	25 mM
	Methanol	10 % (v/v)
Kathodenpuffer	Tris (pH 10,4)	25 mM
	6-Aminocaprinsäure	40 mM
	Methanol	10 % (v/v)

Das PAA-Gel wurde 15 min schüttelnd in Kathodenpuffer inkubiert. Die PVDF-Membran wurde mit Methanol befeuchtet und anschließend 5 min schüttelnd in Anodenpuffer inkubiert. Filter-Papiere wurden vor Aufbau des Blots ca. 30 s im entsprechenden Puffer equilibriert. Der Transfer erfolgte 50 min bei 1,2 mA/cm². Folgend ist der Aufbau des Blots dargestellt:



Abbildung 2.1: Aufbau eines Western-Blots

Die Detektion der Zielproteine erfolgte über die *horseradish*-Peroxidase via Chemilumineszenz. Nach erfolgtem Elektrotransfer wurden die Membranen 1 h bei RT schüttelnd in Blockierlösung inkubiert. Dann wurde der jeweilige polyklonale, aus Kaninchen gewonnene, primäre Antikörper (siehe Kapitel 2.1.17, S. 29) zugesetzt (Verhältnis 1:1000) und 2 h bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Zur Entfernung überschüssigen Antikörpers wurde die Membran 4 x 10 min in frisch zugegebener Blockierlösung gewaschen. Dann wurde der sekundäre Antikörper (anti-rabbit IgG Antikörper, konjugiert mit *horseradish*-Peroxidase) zu frischer Blockierlösung hinzugegeben (Verhältnis 1:10.000) und 1 h mit der Membran inkubiert. Nach 4 x 10 min Inkubation der Membran in Waschlösung wurde die Membran 1 min mit ECL-Lösung versetzt und danach auf den Filmen Amersham Hyperfilm-ECL (GE Healthcare, München) exponiert. Die Entwicklung erfolgte unter Verwendung von Entwickler- und Fixierlösung (Sigma-Aldrich, München). Alternativ wurde eine digitale Entwicklung mit FUSION FX (Vilber Lourmat, Eberhardzell) durchgeführt.

2.2.3 Methoden zur Aufarbeitung von Pflanzenmaterial

2.2.3.1 Isolierung von Chloroplasten aus Erbsenkeimlingen

Folgende Puffer wurden benötigt:

	Zusammensetzung	Konzentration
SIM-Puffer	Saccharose	350 mM
	HEPES/KOH (pH 8,0)	25 mM
	EDTA	2 mM
5 x SRM-Puffer	Sorbitol	1650 mM
	HEPES/KOH (pH 8,0)	250 mM
1 x SRM-Puffer	5 x SRM-Puffer	20 % (v/v)
35 % Percoll	Percoll	35 % (v/v)
	H ₂ O _{bidest}	45 % (v/v)

Für die Isolierung intakter Chloroplasten wurden sämtliche Schritte im Kühlraum bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt. Verwendete Geräte und Zubehör wurde bei 4 °C vorgekühlt. Pipettierarbeiten wurden mit abgeschnittenen Pipettenspitzen durchgeführt. Zu Beginn wurden 7 Tage alte Erbsenkeimlinge (70-80 g) geerntet und in 400 ml SIM-Puffer im *Waring Blender* aufgeschlossen (5 x 2 s, 1 x 7 s). Das Pflanzenmaterial wurde anschließend über zwei Lagen *Millipore Miracloth* (Merck, Darmstadt) in 250 ml Zentrifugenbecher filtriert. Das Filtrat wurde 2 min bei 4.000 rpm zentrifugiert. Dabei wurden sämtliche Zentrifugationsschritte mit der Zentrifuge Heraeus Multifuge X3R (Rotoren: F14-6x250LE, F15-6x100y; Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot) durchgeführt. Das pelletierte Filtrat wurde unter Zugabe von 1 x SRM-Puffer vorsichtig mit einem Pinsel resuspendiert. Die Resuspension wurde auf ein 35 %iges Percollkissen (4 ml) geschichtet. Die intakten Chloroplasten, die nach 7-minütiger Zentrifugation bei 4.200 rpm als Pellet am Boden vorliegen, wurden zweimal mit 1 x SRM-Puffer bei 3.000 rpm für 2 min gewaschen. Die sedimentierten Chloroplasten wurden final in 1 ml 1 x SRM-Puffer aufgenommen und stets bei 4 °C auf Eis gelagert. Um die Chloroplasten vor Lichteinstrahlung zu schützen, wurden die Reaktionsgefäße (1,5 ml) mit Aluminiumfolie umwickelt.

2.2.3.2 Bestimmung der Chlorophyllkonzentration

Zur Bestimmung der Chlorophyllkonzentration wurden drei Ansätze mit 995 µl 80 %igen Aceton und 5 µl Chloroplastensuspension vorbereitet, gründlich gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze 5 min bei 13.000 rpm bei RT zentrifugiert (Heraeus Biofuge Fresco, Thermo Fisher Scientific, St. Leon Roth). Der Überstand aller Ansätze wurde in Polystyrol-Küvetten (Serva, Heidelberg) überführt und jeweils die Absorption bei 663 nm bzw. bei 645 nm gemessen (Photometer: SHIMADZU UV-1602). Für jede Wellenlänge wurden Mittelwerte der Messdaten bestimmt und zur Berechnung der Chlorophyllkonzentration in die Gleichung von Arnon (1949) eingesetzt: $c_{\text{Chl}} [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = (20,2 \times A_{645} + 8,02 \times A_{663}) / 5$

2.2.3.3 In organello-Transportversuche

Folgende Puffer/Lösungen wurden zusätzlich benötigt:

	Zusammensetzung	Mengenangabe
HM-Puffer	HEPES/KOH (pH 8,0)	10 mM
	MgCl ₂	5 mM
HME-Puffer	1 x HM-Puffer	
	EDTA	10 mM
SRME-Puffer	5 x SRM-Puffer	20 % (v/v)
	EDTA	10 mM
Thermolysin-Lösung	Thermolysin	2 mg/ml
	CaCl ₂	25 mM
Transportansatz	Chloroplasten in 1 x SRM-Puffer	100 µg
	5 x SRM-Puffer	x µl
	H ₂ O _{bidest}	y µl
	Mg ²⁺ -ATP (100 mM)	12,0 µl
	Methionin (250 mM)	24,0 µl
	MgCl ₂ (1 M)	3,0 µl
	<i>in vitro</i> -Translation	25,0 µl
	gesamt	300 µl

Für den Standardansatz wurden die Volumina für x und y so gewählt, dass insgesamt eine Konzentration von 1 x SRM-Puffer eingestellt war. Dabei wurden die Chloroplasten als letzte

Komponente hinzugegeben. Das Pipettieren intakter Chloroplasten wurde mit abgeschnittenen Spitzen durchgeführt.

Die Ansätze wurden für 20 min bei 25 °C im belichteten Wasserbad mit einer Lichtintensität von 20 μ E inkubiert. Danach wurden die Ansätze zum Abstoppen der Transportreaktion mit 500 μ l eiskaltem 1 x SRM-Puffer versetzt und 3 min bei 4 °C und 6.000 rpm (Heraeus Biofuge Fresco; Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Roth) zentrifugiert. Die Chloroplasten wurden in 600 μ l 1 x SRM-Puffer resuspendiert, wobei 75 μ l als Chl (-)-Fraktion abgenommen, sedimentiert und in 50 μ l 2 x Laemmli-Probenpuffer resuspendiert wurden. Die verbleibenden 525 μ l wurden mit 52,5 μ l Thermolysin-Lösung versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 600 μ l 1 x SRME-Puffer abgestoppt. Die Chloroplasten wurden sedimentiert (3 min bei 4 °C und 6.000 rpm), in 600 μ l 1 x SRME-Puffer resuspendiert und über 1 ml eines 35 %igen Percollkissens geschichtet. Die Proben wurden 8 min bei 4 °C und 8.000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand sorgfältig abpipettiert (Trümmer) und verworfen. Es wurde ausschließlich mit den im Pellet befindlichen intakten Chloroplasten weitergearbeitet. Diese wurden erneut in 600 μ l 1 x SRME-Puffer resuspendiert, wovon 86 μ l als Chl (+)-Fraktion abgenommen, sedimentiert (3 min, 4 °C, 6.000 rpm) und in 50 μ l 2 x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen wurden. Die verbleibenden 514 μ l wurden zentrifugiert (3 min, 4 °C, 6.000 rpm), zur osmotischen Lyse der Chloroplasten in 150 μ l HME-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Die lysierten Chloroplasten wurden 4 min bei 4 °C und 10.000 rpm zentrifugiert. Das im Überstand befindlichen Stomas wurde ultrazentrifugiert (20 min, 4 °C, 55.000 rpm, Rotor: MLA 80, Beckmann Coulter, Krefeld). Anschließend wurden 25 μ l des Überstands mit 7 μ l 4 x Laemmli-Probenpuffer versetzt. Die im Pellet enthaltenen Thylakoide wurden mit 600 μ l HM-Puffer gewaschen (4 min bei 4 °C und 10.000 rpm) und anschließend in 600 μ l HM-Puffer resuspendiert. Davon wurden 100 μ l als Thy (-)-Fraktion abgenommen, sedimentiert (4 min bei 4 °C und 10.000 rpm) und in 50 μ l 2 x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen. Ebenfalls 100 μ l (Thy (+)-Fraktion) wurden mit 10 μ l Thermolysin-Lösung versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 100 μ l HME-Puffer wurden die Thylakoide sedimentiert (4 min bei 4 °C und 10.000 rpm) und in 50 μ l 2 x SDS-Laemmli-Probenpuffer resuspendiert. Die verbleibenden 400 μ l der Thylakoidsuspension wurden für die *Blue Native-PAGE*-Analyse aufgearbeitet (siehe Kapitel 2.2.3.8). Schließlich wurden alle Proben für SDS-PAGE-Analysen 5 min bei 95 °C denaturiert und stöchiometrische Mengen entsprechend 6 μ g Chlorophyll aufgetrennt.

2.2.3.4 Präparation von Thylakoiden

Zur Isolierung von Thylakoiden wurden frisch präparierte Chloroplasten entsprechend einer Chlorophyllkonzentration von 0,75 µg/µl in HM-Puffer aufgenommen, so dass die finale Chlorophyllkonzentration bei 0,75 µg/µl lag. Die osmotische Lyse der Chloroplasten wurde 10 min auf Eis durchgeführt. Die lysierten Chloroplasten wurden zweimal mit HM-Puffer gewaschen. Die Zentrifugationen erfolgte 5 min bei 10.000 rpm (Heraeus Biofuge Fresco; Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Roth). Die Thylakoide, die in *in thylakoido*-Transportversuchen eingesetzt wurden, wurden final auf eine Chlorophyllkonzentration von 0,75 µg/µl eingestellt.

2.2.3.5 Inhibierung des Tat-Transports durch Antikörperbehandlung der Thylakoide

Ein benötigtes Volumen der Thylakoidsuspension wurde für die Blockierung der TatA- oder TatB-Funktion mit dem jeweiligen Antikörper versetzt (anti-TatA-Antikörper (*A. thaliana*): 0,25 Volumen; anti-TatB-Antikörper (*P. sativum*): 0,5 Volumen). Der Ansatz wurde 45 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Thylakoide 4 min bei 4 °C und 10.000 rpm sedimentiert (Heraeus Biofuge Fresco, Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Roth), zweimal mit HM-Puffer gewaschen (Aufnahme des Pellets in HM-Puffer und anschließende Zentrifugation bei 4°C, 4 min und 10.000 rpm) und schließlich in HM-Puffer zu einer Ausgangskonzentration von 0,75 µg Chlorophyll/µl resuspendiert.

2.2.3.6 *In thylakoido*-Transportversuche

In thylakoido-Transportansätze wurden jeweils in einem Volumen von 50 µl angesetzt. Hierzu wurden 40 µl Thylakoidsuspension (Konzentration: 0,75 µg Chlorophyll/µl) bei 10.000 rpm (Heraeus Biofuge Fresco; Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Roth) 5 min sedimentiert, in 45 µl HM-Puffer aufgenommen und mit 5 µl *in vitro*-Translation eines Tat-Substrats versetzt. Die Transportansätze wurden für eine bestimmte Zeit im temperierten Wasserbad (25 °C) bei einer Lichtintensität von 20 µE inkubiert. Unmittelbar nach der Transportreaktion wurden die Proben mit 50 µl HM-Puffer versetzt und 4 min bei 4 °C und 10.000 rpm zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 170 µl HM-Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend in 200 µl HM-Puffer resuspendiert. Dann wurden 100 µl mit 10 µl Thermolysin-Lösung (+)

versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Proteasebehandlung wurde durch die Zugabe von 100 μ l HME-Puffer gestoppt. Die proteasebehandelte (+) und die verbleibende unbehandelte Fraktion (-) wurden 4 min bei 4 °C und 10.000 rpm sedimentiert und in jeweils 50 μ l 2 x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen. Abschließend wurden sämtliche Proben 5 min bei 95 °C denaturiert und je 25 μ l (entsprechend einer Chlorophyllkonzentration von 7,5 μ g) auf ein SDS-PAA-Gradientengel geladen.

2.2.3.7 Rekonstitution des Tat-Transports durch Zugabe von TatA- oder TatB-Varianten.

Für einen Rekonstitutionsansatz wurden 40 μ l einer Thylakoidsuspension (entsprechend 30 μ g Chlorophyll) verwendet, die mit TatA- oder TatB-spezifischem Antikörper behandelt wurde (siehe Kapitel 2.1.17). Die Thylakoidsuspension wurde 4 min bei 10.000 rpm und 4 °C sedimentiert (Heraeus Biofuge Fresco; Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Roth) und anschließend in HM-Puffer oder einer Tat-Proteinlösung resuspendiert. Tat-Proteinvarianten wurden entweder nach heterologer Synthese und Reinigung oder nach Synthese mittels RTS eingesetzt. Gereinigte Proteine wurden vor Verwendung dialysiert (siehe Kapitel 2.2.2.12).

2.2.3.8 Solubilisierung von Proteinkomplexen aus Thylakoidmembranen

Folgende Puffer/Lösungen wurden zusätzlich benötigt:

	Zusammensetzung	Mengenangabe
Lysepuffer	ϵ -Aminocapronsäure	1 M
	Bis-Tris	50 mM
	EDTA	5 mM
	DTT	1 mM
	MgCl ₂	0,5 mM
Digitonin-Lösung	Digitonin in H ₂ O _{bidest}	5 % (w/v)
Blue Native-Probenpuffer	Coomassie G250 in ϵ -Aminocapronsäure	5 % (w/v)

Nach erfolgtem *in thylakoido*- bzw. *in organello*-Transportversuch wurden unbehandelte Thylakoide (entsprechend 30 oder 50 μ g Chlorophyll) 4 min bei 10.000 rpm zentrifugiert (Heraeus Biofuge Fresco; Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Roth) und in 170 μ l (bzw. 400 μ l bei 50 μ g Chlorophyll) HM-Puffer aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Thylakoide in 200 μ l (bzw. 400 μ l bei 50 μ g Chlorophyll) HM-Puffer aufgenommen. Diese

Suspensionen wurde erneut sedimentiert und danach in 15 µl Lysepuffer (bzw. 25 µl bei 50 µg Chlorophyll) und 7,5 µl (bzw. 12,5 µl bei 50 µg Chlorophyll) einer 5 %igen Digitonin-Lösung (finale Konzentration: 1,66 %) versetzt. Die Thylakoidmembranen wurden anschließend 1 h bei 4 °C auf einem Rotator solubilisiert. Im Folgenden wurden die Proben 30 min bei 55.000 rpm ultrazentrifugiert (4 °C; Rotor: MLA-80, Beckman Coulter, Krefeld). Die Überstände wurde mit 1,5 µl *Blue Native*-Probenpuffer (5 % Coomassie G-250 (gelöst in ε-Aminocapronsäure) versetzt und erneut 5 min bei 55.000 rpm ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde auf ein 5 – 3,5 % PAA-Gradientengel aufgetragen und mittels *Blue Native*-PAGE aufgetrennt (Schägger und von Jagow, 1991; Schägger et al.,1994).

2.2.3.9 Extraktion von Proteinen aus Thylakoidmembranen

Zur Durchführung eines Extraktionsversuchs wurden je 200 µl einer Thylakoidsuspension (entsprechend 150 µg Chlorophyll) mit 25 µl *in vitro* Translation der Tat-Proteine TatA, TatBA (synthetisiert mit *Wheat Germ Extract*) und TatAB oder TatB (synthetisiert mit *Rabbit Reticulocyte Lysate System*) versetzt und 5 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden anschließend 4 min bei 4 °C und 10.000 rpm zentrifugiert (Heraeus Biofuge Fresco; Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Roth) und in 200 µl HM-Puffer aufgenommen. Nach Wiederholung dieses Waschschriffs wurden 40 µl Thylakoidsuspensionen (entsprechend 30 µg Chlorophyll) einer Probe aliquotiert und erneut sedimentiert. Die Sedimente der Aliquots jeder Probe wurden in 50 µl HM-Puffer oder HM-Puffer mit 0,2 bzw. 0,6 M Natriumbromid, 1 M Harnstoff oder 0,1 M Na₂CO₃ aufgenommen. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Thylakoide 4 min bei 4 °C und 10.000 rpm zentrifugiert, wobei die abgenommenen Überstände zur Entfernung kontaminierender Thylakoide erneut 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert wurden. Danach wurden die Thylakoid- und Überstandfraktionen in Laemmli-Probenpuffer (Endkonzentration: 1 x) aufgenommen und entsprechend 15 µg Chlorophyll auf 10 – 17,5 %ige SDS-PAA Gele aufgetragen und via Autoradiographie visualisiert.

3 Ergebnisse

3.1 Funktionelle Rekonstitution von TatB in Erbsenthylakoiden

3.1.1 *Heterologe Synthese und Reinigung des TatB-Antigens*

In dieser Arbeit wurde TatB mit Hilfe von sogenannten *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuchen untersucht. Voraussetzung für diese geplanten Rekonstitutionsexperimente war die Verfügbarkeit spezifischer Antikörper. Zur Gewinnung TatB-spezifischer Antikörper wurde das DNA-Fragment, das für den löslichen Teil des TatB-Proteins aus *Pisum sativum* codiert, in einen Expressionsvektor kloniert. Der lösliche Teil des Proteins entspricht TatB abzüglich der Transmembranhelix. Nach Synthese in *E. coli* wurde der lösliche Teil des TatB-Proteins, das im Folgenden als TatB-Antigen bezeichnet wird, gereinigt (siehe Abbildung 3.1 A).

Die Klonierung, Überexpression und Reinigung des TatB-Antigens wurde von Norbert Ruthenberg im Rahmen einer wissenschaftlichen Hausarbeit (2014) durchgeführt. Der Reinigungsablauf ist in Abbildung 3.1 B dargestellt. Die Masse des TatB-Antigens wurde mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) mit 17989,7 Da bestimmt, was der theoretischen Masse von 17993,6 Da entspricht. Das Protein weist ein apparentes Laufverhalten von 26 kDa auf (Abbildung 3.1 C SDS-PAGE). Das gefriergetrocknete TatB-Antigen wurde zur Produktion eines polyklonalen Antiserums verwendet (Innovagen, Lund). Die im Serum enthaltenen polyklonalen Antikörper wurden von Dr. Mario Jakob gereinigt und kamen in *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuchen zum Einsatz (siehe Kapitel 2.2.2.16).

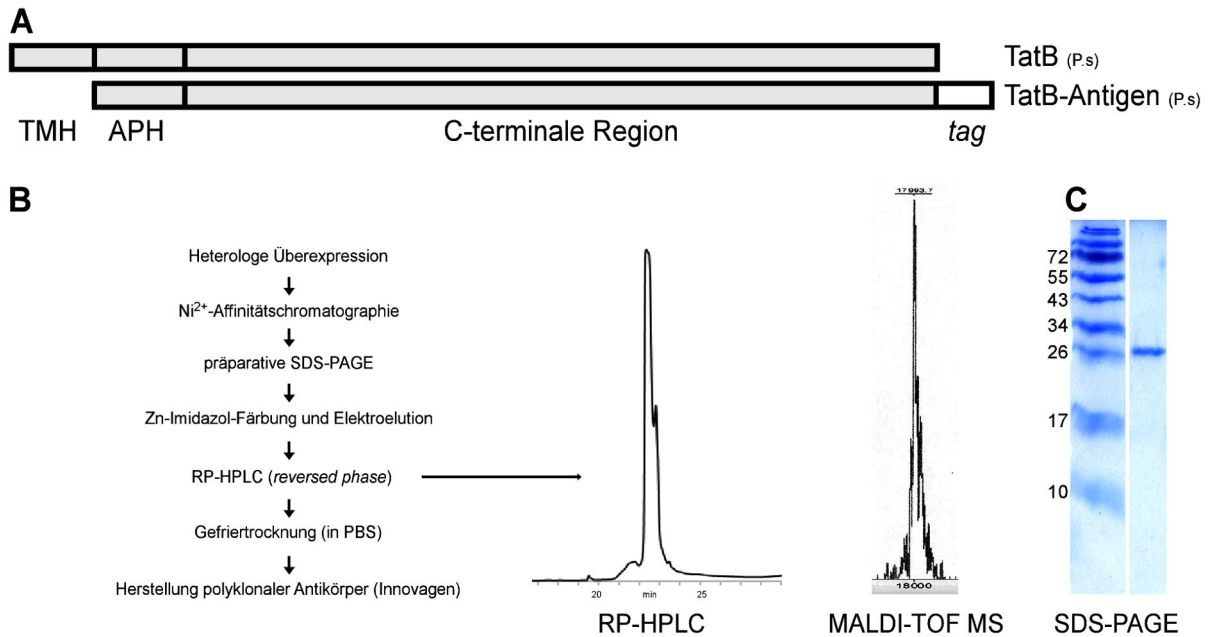


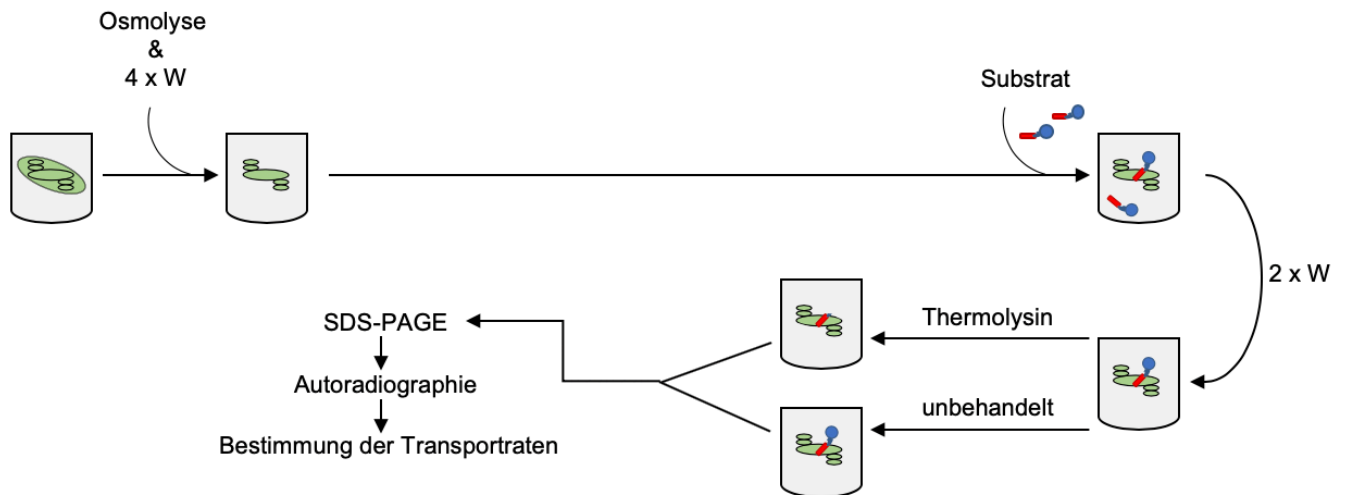
Abbildung 3.1: Heterologe Synthese und Reinigung des TatB-Antigens. (A) Schematische Darstellung des TatB-Antigens im Vergleich zu TatB. Nach heterologer Proteinsynthese in *E. coli* liegt ein Fusionsprotein ohne Transmembranhelix (TMH) vor, welches die amphipathische Helix (APH) und die C-terminale Region von TatB beinhaltet und über einen LysGlu-linker mit einem C-terminalen Hexahistidin-tag (*tag*) verknüpft ist. (B) Die Reinigung des Proteins erfolgt wie im Fließschema angegeben: Nach Aufschluss der Zellen via *French Press* wurde das Protein mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie gereinigt. Das Eluat wurde einer Aceton-Fällung unterzogen und das resultierende Proteinpellet über eine präparative SDS-PAGE aufgetrennt. Mit Hilfe der nicht-fixierenden Zink-Imidazol-Färbung konnte das TatB-Antigen sichtbar gemacht, aus dem präparativen Gel ausgeschnitten und in einer anschließenden Elektroelution aus dem Gel extrahiert werden. Danach wurde das TatB-Antigen über RP-HPLC (*reversed phase*-Hochdruckflüssigkeitschromatografie) gereinigt, nach Zugabe von PBS (*phosphate buffered saline*) gefriergetrocknet und der Firma Innovagen (Lund) zur Produktion polyklonaler Antikörper zugesandt. Das über RP-HPLC gereinigte TatB-Antigen wurde mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) analysiert (theoretische Masse: 17993,6 Da; ermittelte Masse: 17993,7 Da). (C) Das gereinigte Protein wurde auf ein 15 % iges SDS-PAA-Gel aufgetragen, mittels Coomassie-Colloidal-Färbung visualisiert und weist ein apparentes Laufverhalten von 26 kDa auf. Weitere Informationen zur Proteinsynthese und Reinigung sind in Kapitel 2.2.2.3 f. angegeben.

3.1.2 Rekonstitution des Tat-Transports mit *in vitro* synthetisiertem TatB

Die Analyse des Tat-Transports basiert auf einem etabliertem *in vitro*-Transportversuch, in welchem Thylakoide mit *in vitro* synthetisiertem und ³⁵S-Methionin-markiertem Tat-Substrat inkubiert werden. Thylakoide, die für Rekonstitutionsreaktionen eingesetzt werden, werden nach Osmolyse der Chloroplasten zweimal gewaschen und danach mit TatB-spezifischen Antikörpern behandelt. Nach erneuter Durchführung von zwei Waschschrritten werden die anti-TatB-behandelten Thylakoide mit TatB versetzt. So wird die Aktivität des intrinsischen Proteins innerhalb des Translokasekomplexes zunächst ausgeschaltet und durch Zugabe von TatB wiederhergestellt (siehe Abbildung 3.2 B).

Unbehandelte Thylakoide werden für Kontrollreaktionen eingesetzt und nach Lyse der Chloroplasten viermal gewaschen, um eine Vergleichbarkeit zu anti-TatB-behandelten Thylakoiden im Transportversuch zu gewährleisten (siehe Abbildung 3.2 A).

A *in thylakoido*-Versuch



B *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuch

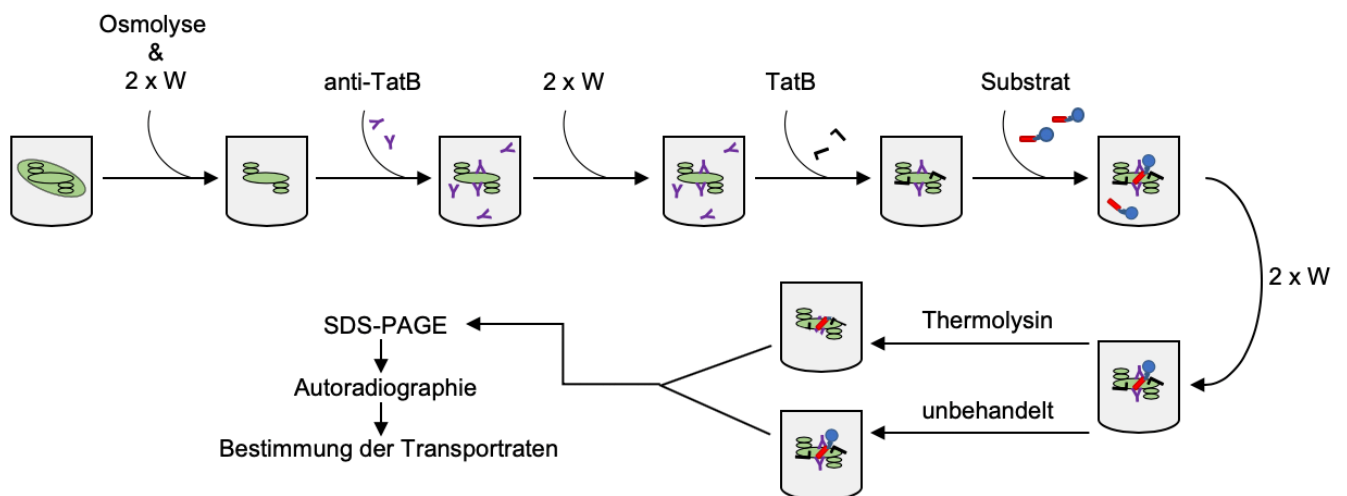


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung von *in thylakoido*-Transportversuchen. (A) Frisch präparierte Chloroplasten werden lysiert (Osmolyse) und vor Durchführung des Transportversuchs vierfach mit HM-Puffer gewaschen (4 x W). (B) Nach Osmolyse der Chloroplasten werden die Thylakoidvesikel zweifach mit HM-Puffer gewaschen (2 x W) und im Anschluss mit TatB-spezifischem Antikörper (anti-TatB) 45 min auf Eis inkubiert. Danach werden die Thylakoide erneut zweifach gewaschen und mit TatB inkubiert. Zur Durchführung der Transportreaktion werden unbehandelte (A) und rekonstituierte Thylakoide (B) mit radioaktiv-markiertem Tat-Substrat versetzt. Nach erfolgter Transportreaktion werden die Thylakoide erneut zweifach gewaschen und der halbe Reaktionsansatz mit Thermolysin behandelt. Die Proben werden auf SDS-PAA-Gele aufgetragen. Die Transportreaktionen werden mittels Autoradiographie visualisiert. Die Signalintensitäten des maturen Proteins in thermolysin-behandelten Proben werden mit Hilfe des Programms AIDA ermittelt und im Anschluss auf die unbehandelte Kontrollreaktion bezogen (Bestimmung der Transportraten). Weitere Details zum Versuchsablauf sind in Kapitel 2.2.3.6 f. angegeben.

Nach Zugabe von *in vitro* synthetisiertem und radioaktiv markiertem Tat-Substrat zu unbehandelten (Abbildung 3.2 A) bzw. behandelten Thylakoiden (Abbildung 3.2 B) werden die Transportansätze im belichteten Wasserbad bei 25 °C inkubiert. Durch die Belichtung wird der Protonengradient über die Thylakoidmembran, welcher für den Tat-Transport essentiell ist, aufrechterhalten. Der Transportprozess beinhaltet die durch die Tat-Translokase vermittelte Translokation eines Vorläuferproteins und dessen Prozessierung durch die thylakoidäre Prozessierungspeptidase (TPP) auf der *trans*-Seite der Thylakoidmembran. Um die erfolgreiche Translokation des Substrates zu verifizieren, werden Thylakoidproben nach erfolgter Transportreaktion geteilt, wobei eine Fraktion unbehandelt belassen wird, während die andere Fraktion mit Thermolysin behandelt wird. Die Proteasebehandlung führt zur Degradation des nicht translozierten Vorläuferproteins, lediglich das prozessierte (mature) Protein liegt proteasegeschützt im Lumen vor. Die unbehandelten bzw. mit Thermolysin behandelten Transportproben werden mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

Der Nachweis des radioaktiv-markierten Tat-Substrats erfolgt via Autoradiographie. Zur Quantifizierung des Transports wird die Signalintensität des muren Proteins thermolysinbehandelter Proben eines Transportansatzes geldensitometrisch ermittelt.

Die in Abbildung 3.3 A und B dargestellten Autoradiogramme zeigen *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuche mit dem Tat-Substrat pOEC16.

Hierbei handelt es sich um die 16 kDa-Untereinheit des Wasserspaltungsapparats, wobei das eingesetzte Vorläuferprotein pOEC16 (p) ein Laufverhalten von 26 kDa aufweist, was auf die Anwesenheit der stroma- und thylakoiddirigierenden Domäne (10 kDa) zurückzuführen ist (Abbildung 3.3 A und B, t Spuren). Wird pOEC16 unter Transportbedingungen 5 (Abbildung 3.3 A) bzw. 10 min (Abbildung 3.3 B) mit unbehandelten Thylakoiden inkubiert (con), so entsteht ein Prozessierungsprodukt mit einer Größe von 16 kDa (- Spuren). Nach Proteasebehandlung zeigt sich, dass das Prozessierungsprodukt proteaseresistent ist, während das Vorläuferprotein degradiert wird (+ Spuren). Bei dem entstandenen Prozessierungsprodukt handelt es sich um matures OEC16 (m), das in das Thylakoidlumen transportiert wurde. Wenn Thylakoide vor der Transportreaktion mit TatB-spezifischen Antikörpern behandelt wurden, ist keine Akkumulation von mOEC16 erkennbar, pOEC16 wird also nicht transportiert (Abbildung 3.3 A und B, HM Spuren). Werden anti-TatB-behandelte Thylakoide mit einer Leerkontrolle des RTS-Translationssystems (RTS) versetzt, bleibt der Tat-

Transport vollständig inhibiert. Wenn das mittels RTS-Translationssystem synthetisierte TatB zu anti-TatB-behandelten Thylakoiden hinzugegeben wird, wird pOEC16 transportiert, was sich am Auftreten des murenen Proteins zeigt (Abbildung 3.3 A und B, TatB Spuren).

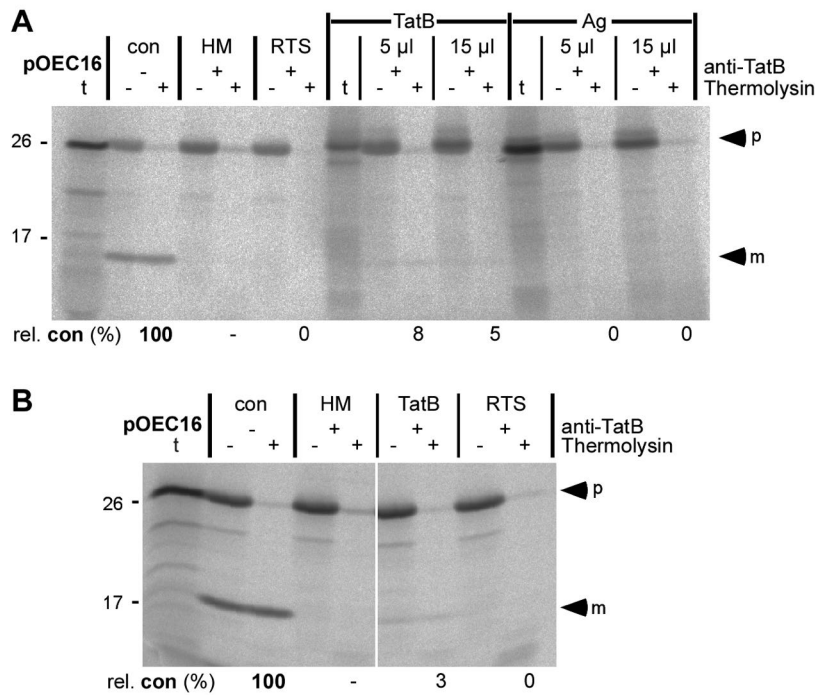


Abbildung 3.3: Rekonstitution des Tat-Transports mit *in vitro* synthetisiertem TatB. 5 μ l des mittels *Rabbit Reticulocyte Lysate System in vitro* synthetisierten und mit 35 S-Met radioaktiv markierten Tat-Substrates pOEC16 wurden zu unbehandelten (con) oder mit TatB-spezifischem Antikörper behandelten (HM) Thylakoiden (30 μ g Chlorophyll) gegeben. Für die Rekonstitution wurden antikörperbehandelte Thylakoide zuvor 15 min mit *in vitro* synthetisiertem TatB, Antigen oder einer Leervektorkontrolle des zur Synthese genutzten RT-Systems (RTS; *Rapid Translation System*) behandelt (Volumina in (A) oberhalb angegeben, in (B) jeweils 5 μ l). Für (A) waren TatB- und Antigen mit 35 S-Met markiert

(möglich durch Aminosäure-austausch V245M, siehe Kapitel 2.1.13.2). Nach 5- (A) bzw. 10-minütiger (B) Transportreaktion bei 25 °C und 20 μ E Licht wurden die Thylakoide mit eiskaltem HM-Puffer (10 mM HEPES/KOH pH 8, 5 mM MgCl₂) versetzt und noch zweimal damit gewaschen. Die Hälfte des Probenvolumens wurde 30 min auf Eis mit Thermolysin (200 μ g/ml, + Spuren) inkubiert (unbehandelter Rest: - Spuren). Von jeder Probe wurde eine Menge entsprechend 7,5 μ g Chlorophyll für SDS-Gelelektrophorese eingesetzt (10 – 17,5 % Vernetzung) und mittels Autoradiographie visualisiert. In den Spuren t wurde je 1 μ l der *in vitro*-Syntheseansätze aufgetragen. Die Positionen des pOEC16-Vorläuferproteins (p) und der murenen Form OEC16 (m) sind markiert. Die Massen (kDa) der Größenstandards sind links angegeben. Die Lücke im Autoradiogramm zeigt an, dass bestimmte Bereiche desselben Autoradiogramms zusammengeschnitten wurden. Die Signalintensitäten für mures OEC16 (m) wurden auf die Kontrollreaktion bezogen (rel. con (%)). Die m-Intensitäten für nur anti-TatB-behandelte Proben (HM) wurden als Hintergrundniveau von allen Proben abgezogen. Die Quantifizierung erfolgte mit AIDA Image Analyzer 5.0 (Raytest, Straubenhardt). Weitere Informationen zu *in thylakoido*-Transportversuchen sind in Kapitel 2.2.3.6 angegeben.

Allerdings ist die Menge des akkumulierten Proteins deutlich geringer als in den Kontrollreaktionen unbehaltener Thylakoide (Abbildung 3.3 A und B, siehe Spuren con und TatB). Um die Transportraten der Rekonstitutionsreaktionen in Abbildung 3.3 A und B zu vergleichen, wurden jeweils die Signale des murenen Proteins in jeder Thermolysin-behandelten Fraktion quantifiziert und der für die unbehaltene Kontrollreaktion gemessene Wert als Referenz gesetzt (rel. con). Die Quantifizierungen ergeben, dass weder eine Erhöhung der TatB-Probenmenge von 5 μ l auf 15 μ l (Abbildung 3.3 A) noch eine Verdopplung der Transportzeit (Abbildung 3.3 B) zu einer Steigerung des Transportrekonstitution führen.

Um zu analysieren, ob extern zugegebenes TatB eine funktionelle Rekonstitution des Tat-Transports bewirkt, wird das TatB-Antigen als Negativkontrolle eingesetzt (Abbildung 3.3 A). Da das TatB-Antigen aufgrund des fehlenden Membranankers nicht in membranständige TatBC-Komplexe integrieren kann, wird keine Funktion im Translokationsprozess erwartet. Nach Zugabe des TatB-Antigens zu anti-TatB-behandelten Thylakoiden ist tatsächlich keine Akkumulation von mOEC16 erkennbar, der Transport bleibt inhibiert. So legen die gezeigten Transportversuche nahe, dass der Tat-Transport mit löslichem TatB funktionell rekonstituiert wird.

3.1.3 Heterologe Synthese und Reinigung von TatA- und TatB-Varianten

Nach der erfolgreich nachgewiesenen TatB-vermittelten Rekonstitution des Tat-Transportes sollte u. a. der für die Rekonstitution notwendige TatB-Bedarf ermittelt werden. Da die Proteinausbeute *in vitro* synthetisierter Proteine mittels *Rapid Translation System* variiert und außerdem nicht quantifizierbar ist, wurde TatB aus *P. sativum* in *E. coli* synthetisiert und gereinigt (Abbildung 3.4 A, C und D).

In diesem Kapitel werden außerdem weitere Proteine vorgestellt, die im Rahmen der Arbeit in *E. coli* synthetisiert, gereinigt und charakterisiert wurden (siehe Abbildung 3.4 A, B, C und D). Hierbei handelt es sich um TatA- und TatB-Varianten aus *Pisum sativum* (P.s) und *Arabidopsis thaliana* (A.th). Zusätzlich zu den authentischen TatA- und TatB-Proteinen beider Spezies wurden Proteine mit Aminosäureaustausch in der TMH (TatB,E10C; TatB,E10A; TatA,E10C) und mit C-terminaler Verkürzung (TatB-core) erstellt. Basierend auf den Proteinsequenzen aus *P. sativum* wurden außerdem chimäre TatAB-Konstrukte (TatAB, TatBA) generiert: Bei TatAB handelt es sich um TatB, welches die TMH von TatA aufweist. TatA, das anstelle der authentischen TMH jene von TatB beinhaltet, wird als TatBA bezeichnet.

Alle Proteine, mit Ausnahme des TatB-Antigens (siehe Abbildung 3.1), wurden als Fusionsproteine mit einem N-terminalen His/S-tag (*tag 1*) synthetisiert (Abbildung 3.4 A und B). Diese *tag*-Region wurde nach durchgeführter Ni²⁺-Affinitätschromatographie mittels Bromcyanspaltung entfernt. Die Spaltprodukte wurden gefriergetrocknet und analog zu Abbildung 3.1 einer präparativen SDS-PAGE unterzogen, nach Zink-Imidazol-Färbung elektroeluiert und über RP-HPLC final gereinigt. Die Massen aller Proteine wurden mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF) überprüft und entsprechen den theoretischen Berechnungen. Vergleichbare Mengen aller gereinigten Proteine wurden via SDS-PAGE

aufgetrennt und einer Coomassie-Colloidal-Färbung unterzogen. Alle Proteine zeigen im Vergleich zu den ermittelten Massen ein erhöhtes apparentes Laufverhalten. Dieses Phänomen wurde bereits für TatA und TatB beschrieben (Mori und Cline, 2001; Jakob et al., 2009). Des Weiteren auffällig ist, dass für TatB-core aus *A. thaliana* Aggregate beobachtet werden können (Abbildung 3.4 D, Spur 6, *).

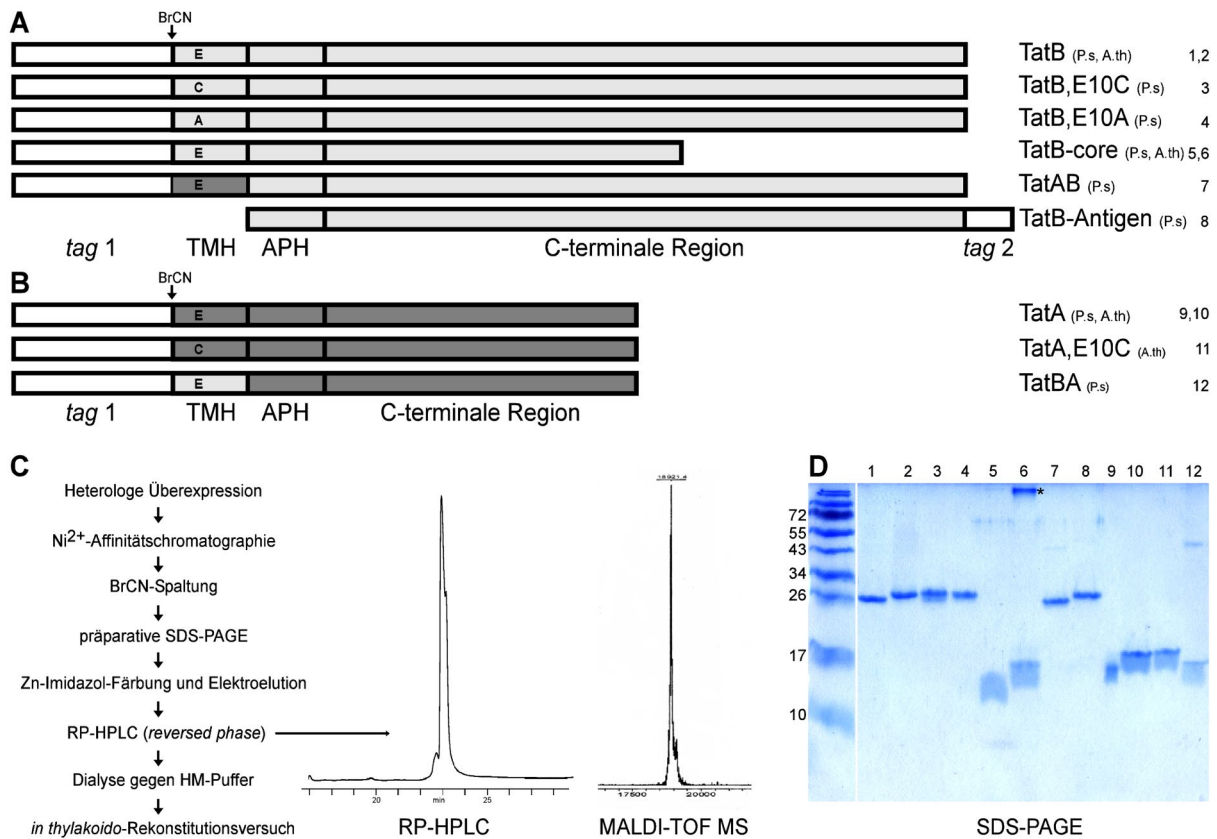


Abbildung 3.4: Heterologe Synthese und Reinigung verschiedener TatA- und TatB-Varianten. (A und B) Schematische Darstellung aller in der Arbeit verwendeten Konstrukte. **(A)** Nach Synthese in *E. coli* liegen - mit Ausnahme des Antigens - Fusionsproteine aus *P. sativum* (P.s) oder *A. thaliana* (A.th) vor, die mit einem N-terminalen His/S-tag (*tag 1*) versehen sind. Bei TatB,E10C bzw. E10A handelt es sich um TatB-Varianten mit Aminosäureaustausch in der TMH. Wie authentisches TatB beinhalten die Proteine Transmembranhelix (TMH), amphipathische Helix (APH) und C-terminale Region (C-terminale Region) von TatB. Bei TatB-core handelt es sich um C-terminal verkürztes TatB. TatAB weist die TMH von TatA auf. Das in Abbildung 3.1 vorgestellte TatB-Antigen weist keine TMH auf und liegt mit C-terminalem Hexahistidin-tag (*tag 2*) vor. **(B)** TatA und TatA,E10C weisen die Transmembranhelix (TMH), amphipathische Helix (APH) und C-terminale Region (C-terminale Region) von TatA auf. TatBA beinhaltet die TMH von TatB. In Anhang 19 sind Aminosäuresequenzen ausgewählter Tat-Proteine dargestellt. **(C)** Nach Synthese erfolgte die Reinigung der Proteine wie im Fließschema angegeben. Im Unterschied zur Reinigung des TatB-Antigens wurde die N-terminale *tag*-Region des Fusionsproteins mittels Bromcyan abgespalten. Die über RP-HPLC (*reversed phase*) gereinigten Proteine wurden via Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) analysiert. Zur Anwendung im *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuch wurden die Proteine mittels Dialyse in HM-Puffer (pH 8) überführt. Das HPLC-Elutionsprofil und Massenspektrum sind hier exemplarisch für TatB aus *P. sativum* dargestellt (theoretische Masse: 18921,91 Da; ermittelte Masse: 18921,4 Da). **(D)** 0,25 µg der gereinigten Proteine wurden auf ein 15%iges SDS-PAA-Gel aufgetragen und mit Coomassie-Colloidal-Färbelösung angefärbt. Die Auftragsreihenfolge der Proben (1-12) ist in A und B angegeben (1: TatB aus *P. sativum*, 2: TatB aus *A. thaliana* usw.) Für TatB-core aus *A. thaliana* sind Aggregate erkennbar (*). Weitere Informationen zur Proteinsynthese und Reinigung sind in Kapitel 2.2.2.3 f. angegeben.

Bevor die nach RP-HPLC in einem Acetonitril-Wasser-Gemisch (+ 0,01 % TFA, pH 3) vorliegenden Proteine in *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuchen eingesetzt werden konnten, war es erforderlich diese mittels Dialyse in physiologischen HM-Puffer (pH 8) zu überführen.

3.1.4 Rekonstitution des Tat-Transports mit gereinigtem TatB

In den folgenden *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuchen wurde erstmals heterolog synthetisiertes und gereinigtes TatB eingesetzt. Neben pOEC16 wurden außerdem pOEC23 (Vorläuferprotein der 23 kDa-Untereinheit des Wasserspaltungsapparats) sowie das chimäre Substrat 16/23, bestehend aus dem zusammengesetzten Transitpeptid von pOEC16 und dem murenen Teil von pOEC23, verwendet.

Wenn pOEC16 unter mit unbehandelten Thylakoiden inkubiert wird, ist die Akkumulation des proteaseresistenten Prozessierungsprodukts mOEC16 erkennbar, das Substrat wird also transportiert (Abbildung 3.5 A, con +).

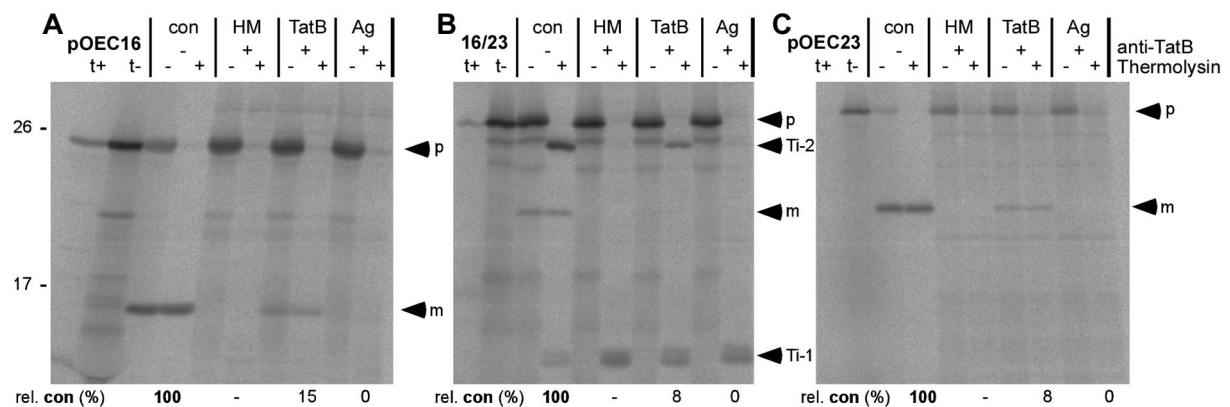


Abbildung 3.5: Rekonstitution des Tat-Transports mit gereinigtem TatB. Unbehandelte (con) oder mit TatB-spezifischem Antikörper behandelte Thylakoide (HM), entsprechend 30 µg Chlorophyll, wurden mit 5 µl (A) pOEC16, (B) 16/23 oder (C) pOEC23 versetzt. Im Rekonstitutionsversuch wurden anti-TatB behandelte Thylakoide vor Zugabe des jeweiligen Vorläuferproteins 15 min mit 1 µM TatB oder 1 µM TatB-Antigen (Ag) auf Eis vorinkubiert. Die Transportzeit betrug 10 min. Die Signalintensitäten für (A) mOEC16, (B) Ti-2 + mOEC23 und (C) mOEC23 wurden auf die unbehandelten Kontrollreaktionen bezogen (rel. con (%)) und sind unterhalb des unterteilten Autoradiogramms angegeben. Die für die HM-Kontrolle gemessenen Signalintensitäten (-) wurden als Hintergrundlevel angenommen und von allen Rekonstitutionsproben abgezogen. Weitere Details zum *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuch sind Abbildung 3.3 zu entnehmen.

Bei Verwendung von anti-TatB-behandelten Thylakoiden ist mOEC16 nicht sichtbar, der Transport ist inhibiert (HM). Wird TatB hinzugegeben, tritt das Prozessierungsprodukt mOEC16 auf, der Transport ist wiederhergestellt. Allerdings ist die Signalintensität des murenen Proteins geringer als jene der Kontrollreaktion unbehandelter Thylakoide (siehe TatB und con). Die Quantifizierung des reifen Proteins (TatB +) ergibt, dass der Tat-Transport von

pOEC16 durch TatB-Zugabe zu 15 % rekonstituiert werden kann. Wenn das TatB-Antigen mit anti-TatB-behandelten Thylakoiden inkubiert wird, erfolgt wiederum analog zu Abbildung 3.3 A keine Rekonstitution des Tat-Transports (Ag).

Da 16/23 im Vergleich zu den authentischen Tat-Substraten ein retardiertes Transportverhalten aufzeigt, lassen sich Translokationsintermediate nachweisen (siehe Abbildung 3.5 B, con +). Während in der proteaseunbehandelten Fraktion (con -) das Vorläuferprotein (p; 27 kDa) und das mature Protein (m; 23 kDa) detektiert werden können, können nach Proteasebehandlung (con +) zwei zusätzliche Banden identifiziert werden. Diese Banden repräsentieren Abbauprodukte der Translokationsintermediate 1 und 2 (Ti-1; Ti-2). Beim Ti-1 liegen der N- und C-Terminus noch stromal exponiert vor, das resultierende Degradationsprodukt weist eine Größe von 14 kDa auf. Für Ti-2 liegt der N-Terminus stromal vor, der C-terminale Teil wurde bereits ins Lumen transloziert, aber das Protein wurde noch nicht prozessiert (Hou et al., 2006). Das proteasegeschützte Intermediat migriert auf Höhe von 26 kDa.

Wird 16/23 zu anti-TatB-behandelten Thylakoiden hinzugegeben, können Ti-2 und mOEC23 nicht detektiert werden, lediglich das nicht translozierte Ti-1 akkumuliert (con +). Der Tat-Transport von 16/23 ist inhibiert. Wenn TatB mit anti-TatB-behandelten Thylakoiden inkubiert wird, lässt sich eine Rekonstitution des Tat-Transports von 16/23 nachweisen (TatB +). Obwohl das mature Protein kaum sichtbar ist, kann Ti-2 zuverlässig quantifiziert werden. Die Rekonstitution des Transports liegt im Vergleich zur unbehandelten Kontrollreaktion (con) bei 8 % (Abbildung 3.5 B; con + und TatB +; rel. Transportrate = Ti-2 + m). Wird anstelle von TatB das TatB-Antigen eingesetzt, erfolgt hingegen keine Transportrekonstitution.

Wird pOEC23 mit unbehandelten Thylakoiden versetzt, kann neben dem Vorläuferprotein (p, 30 kDa) das proteasestabile Prozessierungsprodukt mOEC23, das ein Laufverhalten von 23 kDa aufzeigt, nachgewiesen werden. Bei Verwendung von antikörperbehandelten Thylakoiden ist das mature Protein wiederum nicht nachweisbar, es findet kein Transport statt. Nach TatB-vermittelter Transportrekonstitution wird eine relative Transportrate von 8 % erreicht (Abbildung 3.5 C, con +), welche mit der Rekonstitution des Tat-Transports von 16/23 vergleichbar ist (Abbildung 3.5 B, con +). Die Anwendung des TatB-Antigens führt wiederum nicht zur Akkumulation des reifen Proteins (Ag).

Zusammenfassend lässt sich formulieren, dass gereinigtes TatB zur Rekonstitution des Tat-Transports befähigt ist, während nach Zugabe des TatB-Antigens kein Tat-Transport

nachgewiesen werden kann. Die Transportrate, die nach TatB-vermittelter Rekonstitution erreicht wird, ist stets geringer als jene der unbehandelten Kontrollreaktionen. Um einen zeitabhängigen Assemblierungsschritt des TatB-Proteins als Ursache auszuschließen, wurde analysiert, ob die Dauer der Vorinkubation der Thylakoide mit TatB einen Einfluss auf die Rekonstitution des Transports hat (Anhang 10). Im Zeitraum von 0 - 20 min konnten keine signifikanten Unterschiede der Transportraten nach TatB-Rekonstitution festgestellt werden. Dennoch wurden die zu untersuchenden Proteine vor jedem Transportversuch 5 min mit Thylakoiden vorinkubiert.

Da mit pOEC16 in Abbildung 3.5 A generell die höchste Transportrate nach TatB-vermittelter Rekonstitution beobachtet wurde, wurde dieses Substrat in allen weiteren in *thylakoido*-Rekonstitutionsversuchen verwendet.

3.1.5 Stabilität der Antikörperbindung im in thylakoido-Rekonstitutionsversuch

Mit Hilfe einer Western Blot-Analyse konnte bestätigt werden, dass extern zugegebenes TatB eine funktionelle Rolle in der Transportrekonstitution spielt. Zugegebenes TatB verursacht keine quantitative Ablösung des TatB-spezifischen Antikörpers vom intrinsischen Protein, die ebenfalls zu einer Wiederherstellung des Tat-Transports führen würde. Die zu untersuchenden möglichen Mechanismen der TatB-Rekonstitution sind in Abbildung 3.6 dargestellt.

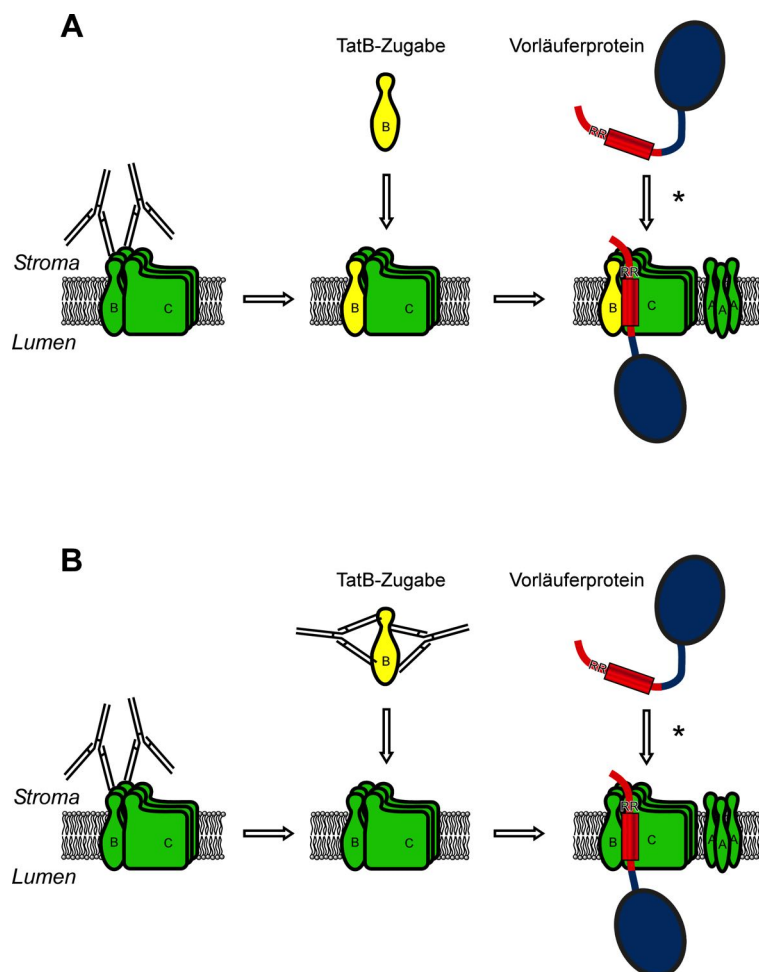


Abbildung 3.6: Mögliche Mechanismen der TatB-vermittelten Rekonstitution des Tat-Transports. Könnte neben der funktionellen Rekonstitution von TatB (A), auch die Ablösung des Antikörpers vom intrinsischen Protein (B) zu einer Wiederherstellung des Tat-Transports führen? Möglichkeit (B) wurde mit Hilfe des in Abbildung 3.7 dargestellten Versuchs analysiert. Zugegebenes TatB ist in gelb dargestellt. * Die vollständige modellhafte Darstellung des Translokationsprozesses ist in Abbildung 1.4 dargestellt. Die in (A) gezeigte funktionelle Rekonstitution des Tat-Transports basiert auf der Annahme, dass TatB in partiell assemblierte bzw. in *de novo* assemblierte TatBC-Rezeptorkomplexe mit freiem TatC integriert. Des Weiteren ist denkbar, dass ein Austausch zwischen zugegebenem TatB und antikörpergebundenem intrinsischem TatB erfolgt. Für weitere Details, siehe Kapitel 4.1.

Um die potentielle Freisetzung der TatB-spezifischen Antikörper zu analysieren, wurde ein zu Abbildung 3.14 analoger *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuch durchgeführt.

Unbehandelte und anti-TatB-behandelte Thylakoide, die jeweils mit HM-Puffer oder mit gereinigtem TatB bzw. TatB-Antigen inkubiert und einer Transportreaktion mit pOEC16 unterzogen wurden, wurden sedimentiert. Stöchiometrische Mengen der Thylakoide (Pellets) und Überstände wurden nach SDS-PAGE und Western Blotting mittels *enhanced*

chemiluminescence auf die Präsenz des TatB-spezifischen Antikörpers analysiert (siehe Abbildung 3.7).

Dazu wurde ausschließlich der sekundäre, *horseradish*-Peroxidase-konjugierte Antikörper verwendet. Dieser Antikörper detektiert die schwere Kette des TatB-spezifischen Antikörpers, welche bei ca. 55 kDa migriert. In Abbildung 3.7 A ist zu erkennen, dass das Thylakoidmaterial aller Proben, die mit TatB-spezifischem Antikörper behandelt wurden, auch nach Transportreaktion noch mit diesem beladen ist. Bei Betrachtung der Überstände wird deutlich, dass die Freisetzung des Antikörpers für Thylakoide, die mit HM-Puffer bzw. mit TatB inkubiert wurden, in ähnlichem Maße mit bis zu 30 % erfolgte (Abbildung 3.7 B). Interessanterweise führte das TatB-Antigen aber zu einer 50 %igen Freisetzung des Antikörpers.

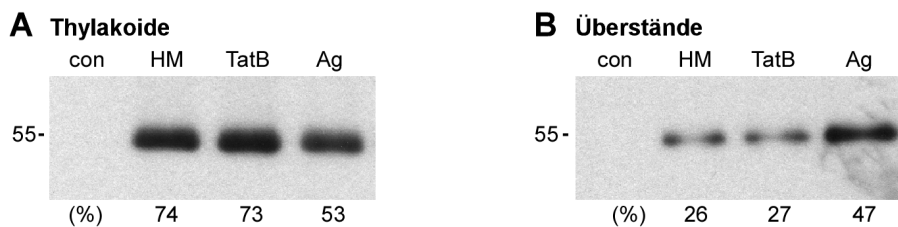


Abbildung 3.7: Stabilität der TatB-Antikörperbindung an thylakoidäres TatB. Nach Durchführung eines zu Abbildung 3.14 vergleichbaren *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuchs wurden bestimmte Proben nach Transportreaktion auf die Anwesenheit des TatB-spezifischen Antikörpers untersucht. So wurden Transportansätze unbehandelter Thylakoide (con) bzw. anti-TatB-behandelter Thylakoide, die mit HM-Puffer (HM), 0,5 μ M TatB (TatB) oder TatB-Antigen (Ag) behandelt wurden, 4 min bei 10.000 rpm (Heraeus Biofuge Fresco) zentrifugiert. Die pelletierten Thylakoide (**A**) und Überstände (**B**) wurden entsprechend 7,5 μ g Chlorophyll über ein 15 %iges SDS-Gel aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Um den TatB-spezifischen Antikörper in beiden Fraktionen zu visualisieren, wurden die Membranen 1 h mit *horseradish*-Peroxidase-konjugiertem anti-rabbit IgG inkubiert und über ECL (*enhanced chemiluminescence*) detektiert (A und B). Der Anteil der Thylakoid- und Pelletfraktionen an der Antikörpergesamtmenge jeder Probe ist in % angegeben. Weitere Informationen zur Western Blot-Analyse sind in Kapitel 2.2.2.17 angegeben.

So kann formuliert werden, dass das TatB-Antigen zur höchsten Freisetzung des Antikörpers führt und dennoch nicht zur Wiederherstellung des Tat-Transports befähigt ist (siehe Abbildung 3.14). Folglich ist ausgeschlossen, dass die durch TatB-vermittelte Rekonstitution des Tat-Transports auf einer Reaktivierung des intrinsischen TatB-Proteins beruht.

3.2 Assemblierung von TatB in TatBC-Komplexe

3.2.1 Assemblierung von radioaktiv-markiertem TatB

Da TatB Bestandteil des integralen TatBC-Rezeptorkomplexes ist (Berghöfer und Klösgen, 1999; Jakob et al., 2009), ist anzunehmen, dass die TatB-vermittelte Transportrekonstitution auf einer funktionellen Assemblierung des Proteins in den heterooligomeren Komplex basiert. Fincher et al. (2003) zeigten, dass extern zugegebenes TatB spontan in die Thylakoidmembran integriert und in TatBC-Komplexe assembliert.

Zur Visualisierung von TatBC-Komplexen, wurden Thylakoide mit *in vitro* synthetisiertem und radioaktiv-markiertem pOEC16 bzw. TatB inkubiert, wobei das TatB-Antigen als Negativkontrolle eingesetzt wurde. Anschließend wurden die Thylakoidmembranen der einzelnen Proben mit Hilfe des milden Detergens Digitonin solubilisiert und mittels *Blue Native*-PAGE analysiert (Schägger und von Jagow, 1991; Abbildung 3.8).

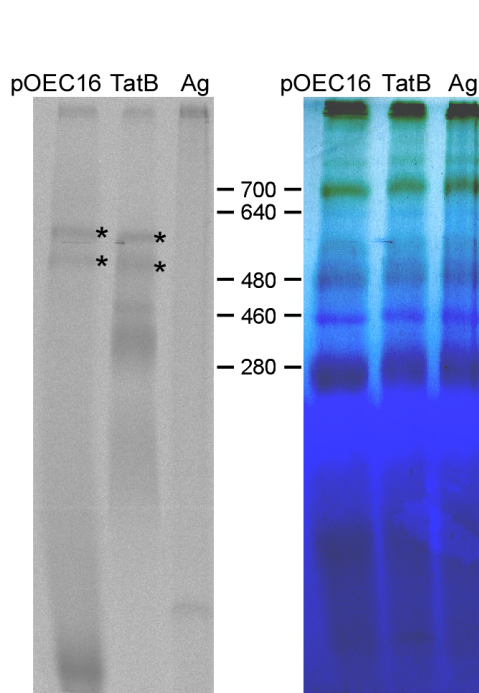


Abbildung 3.8: *Blue Native*-PAGE-Analyse von radioaktiv markierten TatBC-Rezeptorkomplexen. Isolierte Erbsenthylakoide wurden 5 min auf Eis mit je 5 μ l pOEC16, TatB oder Antigen (*in vitro*-Synthese mittels *Rabbit Reticulocyte Lysate System*, 35 S Methionin) inkubiert. Um eine radioaktive Markierung von TatB und TatB-Antigen zu ermöglichen, wurde zuvor Valin an Position 245 durch Methionin ersetzt (siehe Abbildung 3.3 A). Die Thylakoide wurden zweifach mit HM-Puffer gewaschen, die pelletierten Thylakoide wurden mit 1,7 % (w/v) Digitonin in Lysepuffer 45 min bei 4 °C auf einem Rotator solubilisiert und anschließend 20 min bei 160.000 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden über 5 – 13,5 %ige *Blue Native*-PAA-Gradientengele (5 – 13,5 %) aufgetrennt und mittels Autoradiographie visualisiert. Im Gel (rechts, ungefärbt) sind die hochabundanten Proteinkomplexe der Thylakoidmembran, die als Größenstandard dienen, ersichtlich: Photosystem I (~700 kDa), ATP-Synthase (~640 kDa), Photosystem II (~480 kDa), Cytochrom b_6f (~430 kDa) und Lichtsammelkomplexe (~280 kDa). Links ist das Autoradiogramm des Gels dargestellt. Die Positionen der TatBC-Komplexe, die entweder durch 16/23 oder durch TatB visualisiert werden, sind mit * markiert. Weitere Details zur *Blue Native*-PAGE sind in Kapitel 2.2.2.2 und 2.2.3.8 angegeben.

Rechts im Bild ist das *Blue Native*-PAA-Gel, welches die hochabundanten Proteinkomplexe der Thylakoidmembran zeigt, abgebildet. Im Autoradiogramm des Gels können durch das Substrat markierte TatBC-Rezeptorkomplexe (pOEC16, *) visualisiert werden. Substratmarkierte TatBC-Komplexe wurden bereits durch Berghöfer und Klösgen (1999) bei Verwendung des Tat-Substrats 16/23 mit einer apparenten Masse von 560 und 620 kDa nachgewiesen. Bei TatB-

Zugabe sind ebenfalls zwei Komplexe von geringerer Größe im Vergleich zur Zugabe von pOEC16 ersichtlich. Der Größenunterschied lässt sich dadurch erklären, dass die Markierung der TatBC-Komplexe direkt durch TatB erfolgt. Die TatB-Signale (TatB, *) stellen also TatBC-Rezeptorkomplexe ohne gebundenes Substrat dar und weisen somit ein geringeres Molekulargewicht auf (siehe auch Jakob et al., 2009). Zusätzlich können weitere hochmolekulare Komplexe zwischen 280 und 460 kDa und unterhalb von 280 kDa beobachtet werden. Bei ersteren könnte es sich um TatB handeln, welches aufgrund seiner spontanen Membraninsertion unspezifisch an den Cytochrom b_6f -Komplex bzw. an Lichtsammelkomplexe assoziiert vorliegt. Der Komplex niedrigster Größe könnte oligomeres TatB darstellen (Ma et al., 2018). Wenn Thylakoidmembranen analysiert werden, die mit TatB-Antigen (Ag) vesetzt wurden, ist keine Komplexbildung ersichtlich.

So kann angenommen werden, dass die TatB-vermittelte Rekonstitution des Tat-Transports in Zusammenhang mit einer funktionellen Assemblierung von TatB in TatBC-Rezeptorkomplexe steht.

3.2.2 *Assemblierung von gereinigtem TatB*

Für *in vitro* synthetisiertes TatB, das erfolgreich in *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuchen eingesetzt wurde, konnte bereits die Assemblierung in TatBC-Komplexe gezeigt werden (Fincher et al., 2003; siehe Abbildung 3.8).

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob auch gereinigtes TatB in TatBC-Komplexen nachgewiesen werden kann. Ein spezifischer Nachweis des zugegebenen Proteins ist jedoch nicht mittels Immundetektion möglich: Wenn TatB-behandelte Thylakoide nach Solubilisierung der Thylakoidmembranen über *Blue Native*-PAGE aufgetrennt und nach Western Blot einer Immundetektion mit TatB-spezifischem Antikörper unterzogen werden, können intrinsisches und extern zugegebenes TatB nicht voneinander unterschieden werden (Anhang 6). Auch gereinigtes TatB, das einen C-terminalem Hexahistidin-*tag* aufweist, kann nicht mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung His-spezifischer Antikörper in TatBC-Rezeptorkomplexen frisch präparierter Thylakoide immundetektiert werden (Anhang 7). Dies könnte mit einer generell geringen Menge des markierten TatB-Proteins in TatBC-Komplexen zusammenhängen. Um die Assemblierung von heterolog synthetisiertem und gereinigtem TatB in TatBC-Komplexe schlussendlich nachzuweisen, wurde die heterologe Synthese des Proteins in Anwesenheit von ^{35}S -Methionin durchgeführt.

Um die Synthese von TatB mit radioaktiver Markierung zu ermöglichen, wurde die Aminosäuresequenz am C-Terminus um einen Methioninrest erweitert (Tat_M). Die im pET30a-Vektor vorliegende Sequenz, die für *tag*-Tat_M (*tag* = His/S-TatB) kodiert, wurde mittels Transformation in *E. coli*-Zellen des Stammes BL21(DE3) eingebracht. Die heterologe Synthese und Reinigung erfolgte wie in Kapitel 2.2.2.4 und 2.2.2.6 angegeben. Nach Bromcyan-Spaltreaktion, die der Abtrennung der *tag*-Region diente, war die Proteinausbeute aber deutlich verringert (Anhang 8). Trotz Durchführung von Versuchen zur Optimierung der Spaltbedingungen konnte der Proteinverlust nicht verhindert bzw. verringert werden. Nach Inkubation von Thylakoiden mit Tat_M konnte das radioaktiv markierte Protein nicht in TatBC-Komplexen einer *Blue Native*-PAGE detektiert werden (Anhang 9). Möglicherweise reichte die nach der Reinigung verbleibende Menge des Tat_M-Proteins nicht für eine Markierung der TatBC-Komplexe aus.

3.2.3 Vergleich verschiedener Expressionssysteme zur Synthese von TatB

Um die chemische Spaltung mittels Bromcyan zu umgehen, wurde das für Tat_M kodierende DNA-Fragment in den pETSUMO-Vektor überführt (siehe Kapitel 2.1.13.2 und Anhang 5). Die N-terminal fusionierte *tag*-Region beinhaltet für einen Hexahistidin-*tag* und das SUMO-Protein (*small ubiquitin-related modifier*) kodierende DNA-Fragmente. Die His/SUMO-*tag*-Region kann mit Hilfe der hochspezifischen SUMO-Protease Ulp1 (*Ubl-specific protease* aus *Saccharomyces cerevisiae*), die die Tertiärstruktur des SUMO-Proteins erkennt, abgespalten werden.

Vorerst wurde SUMO-Tat_M (SUMO = His/SUMO-*tag*) in Abwesenheit von ³⁵S-Methionin in *E. coli* synthetisiert. So sollte zu Beginn überprüft werden, ob SUMO-Tat_M effizient synthetisiert wird und ob die His/SUMO-*tag*-Region mit Hilfe der Ulp1-Protease quantitativ entfernt werden kann. Die heterologe Synthese und Reinigung von SUMO-Tat_M wird in Abbildung 3.9 mit jener von *tag*-TatB verglichen.

Nach Proteinsynthese wurde SUMO-Tat_M, welches ein apparentes Laufverhalten von ca. 43 kDa aufweist (Abbildung 3.9 A: „heterologe Überexpression“, n.l.*; theoretisches Molekulargewicht: 33,4 kDa), unter denaturierenden Bedingungen aufgearbeitet und über Ni²⁺-Affinitätschromatographie gereinigt (vergleichbar zur Reinigung von *tag*-TatB). Vor Abspaltung der His/SUMO-*tag*-Region wurde das Eluat mittels Dialyse in Ulp1-Puffer (ohne DTT) überführt. Da eine hohe Salzkonzentration, Imidazol (> 300 mM) und

Guanidinhydrochlorid (> 100 mM) die Aktivität der Protease beeinträchtigen können, wurde die Protease Ulp1 erst nach ausreichender Dialysezeit in den Dialyseschlauch pipettiert (Malakhov et al., 2004). Nach Inkubation mit der Protease wurde der überwiegende Teil des Proteins gespalten (siehe Abbildung 3.9 A „Spaltung nach IMAC“, B_M). Des Weiteren ist eine Proteinbande sichtbar, die bei 43 kDa migriert. Hierbei handelt es sich um ungespaltenes SUMO-Tat_{B_M} und um Ulp1, welche ein vergleichbares apparentes Laufverhalten aufweist (siehe Abbildung 3.9 A „Spaltung nach IMAC“, SB_M, U).

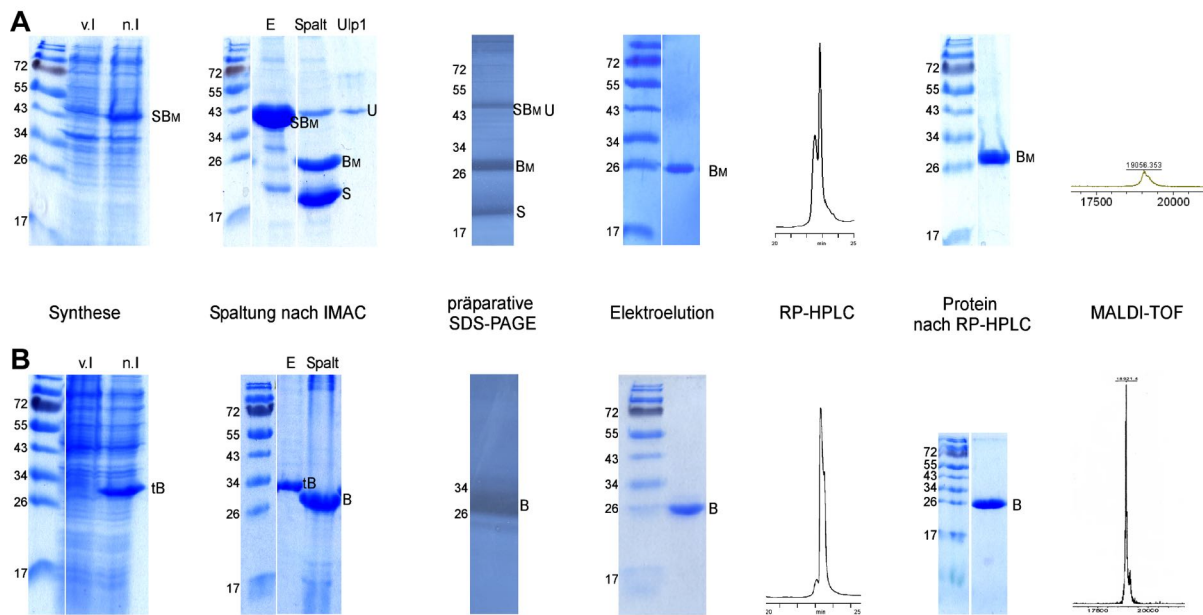


Abbildung 3.9: Vergleich der heterologen Synthese von SUMO-Tat_{B_M} und tag-TatB unter Nutzung des pETSUMO- und des pET30a-Systems mit anschließender Reinigung. (A) Das für Tat_{B_M} kodierende DNA-Fragment (TatB mit C-terminalem Methioninrest) wurde in pETSUMO überführt. Das nach Synthese vorliegende Fusionsprotein („Synthese“, v.l. = vor Induktion, n.l. = nach Induktion) beinhaltet einen N-terminalen His/SUMO-tag und wird im Folgenden als SUMO-Tat_{B_M} (SB_M) bezeichnet. Im ersten Reinigungsschritt wird SUMO-Tat_{B_M} mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie gereinigt. Elutionsfraktionen (E) der Reinigung werden im Dialyseverfahren einer Spaltreaktion mit der SUMO-Protease Ulp1 unterzogen („Spaltung nach IMAC“, IMAC: Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie), wobei SUMO-Tat_{B_M} (SB_M), Tat_{B_M} (B_M) und die abgespaltene tag-Region (S) im Gel sichtbar sind. Die SUMO-Protease Ulp1 (U) weist ein zu SUMO-Tat_{B_M} vergleichbares Laufverhalten auf. Der Spaltansatz wurde präparativ aufgetrennt („präparative SDS-PAGE“), wobei Tat_{B_M} mittels Elektroelution aus dem Gel herausgelöst wurde („Elektroelution“) und über RP-HPLC gereinigt wurde („RP-HPLC“, beispielhafte Darstellung eines Elutionsprofils). Nach Elution wurde Tat_{B_M} einer Massenbestimmung mittels MALDI-TOF MS unterzogen (ermittelt: 19056,353 Da; theoretisch: 19053,10 Da). Zum Vergleich ist in (B) die Synthese von tag-TatB mittels des pET30a-Systems und anschließender Reinigung dargestellt (siehe auch Abbildung 3.4). Die N-terminale Region des nach Synthese vorliegenden Fusionsproteins beinhaltet einen His/S-tag. Das Fusionsprotein wird als tag-TatB (tB) bezeichnet. Im Gegensatz zu (A) erfolgte die Spaltung von tag-TatB mittels Bromcyan, welches C-terminal zu Methioninresten spaltet. Das Spaltprodukt TatB (bezeichnet als B) konnte ebenfalls mit Hilfe von MALDI-TOF MS nachgewiesen werden (ermittelt: 18921,4 Da; theoretisch: 18921,91 Da). Bei allen in (A) und (B) dargestellten Gelen handelt es sich um 15 %ige SDS-PAA-Gele. Die Färbung erfolgte mittels Coomassie-Colloidal-Färbelösung. Die präparativen Gele wurden einer Zink-Imidazol-Färbung unterzogen. Die MALDI-TOF-MS-Analysen der Proteine wurden von verschiedenen Anbietern durchgeführt.

Um SUMO-Tat_{B_M}, die entfernte His/SUMO-*tag*-Region, Ulp1 und andere kontaminierende Proteine zu entfernen, wurde der Spaltansatz anschließend via präparativer SDS-PAGE aufgetrennt, Tat_{B_M} wurde folglich elektroeluiert und über RP-HPLC gereinigt.

SUMO-Tat_{B_M} hat im Vergleich zu *tag*-TatB eine höhere Molekülmasse, was die Trennung von Fusionsprotein und Tat_{B_M} und somit das Ausschneiden von Tat_{B_M} nach präparativer SDS-PAGE vereinfacht (siehe Abbildung 3.9 A und B, „Spaltung nach IMAC“, Spur „Spalt“: B_M und B). Insgesamt betrachtet führen beide Expressions- und Reinigungsstrategien zur Anreicherung des reinen Zielproteins, wobei die Molekulargewichte von Tat_{B_M} und TatB mittels MALDI-TOF MS bestätigt wurden.

3.2.4 Rekonstitution des Tat-Transports mit gereinigtem Tat_{B_M}

Im Folgenden wurde untersucht, ob Tat_{B_M}, welches ausgehend vom pETSUMO-Vektor synthetisiert wurde, den Tat-Transport rekonstituieren kann. Dementsprechend wurde dieses Protein im *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuch mit anti-TatB-behandelten Thylakoiden eingesetzt (Abbildung 3.10, Tat_{B_M} (Ulp1)). Zum Vergleich wurde außerdem TatB verwendet, das nach Synthese über den pET30a-Vektor und nach Bromcyanspaltung vorlag (siehe Abbildung 3.10, TatB (BrCN)) und bereits in Rekonstitutionsversuchen eingesetzt wurde (siehe Abbildung 3.5).

So wurden die Proteine TatB und Tat_{B_M} in den Stoffmengenkonzentrationen 0,5 µM; 1,0 µM und 1,5 µM mit anti-TatB-behandelten Thylakoiden vorinkubiert. Die Transportreaktion von pOEC16 wurde 5 min durchgeführt (Abbildung 3.10). Dabei wurde nach Zugabe von TatB und Tat_{B_M} eine vergleichbare Rekonstitution des Tat-Transports beobachtet, was sich aus den vergleichbaren Signalintensitäten von mOEC16 ableiten lässt. Die Quantifizierung der Signale ergab, dass die relativen Transportraten nach Rekonstitution bezogen auf die Transportkontrolle (con) bei 6 - 10 % lagen. Die Proteasespaltung von SUMO-Tat_{B_M} sowie der zusätzliche Methioninrest haben somit keinen negativen Einfluss auf die Rekonstitution des Tat-Transports.

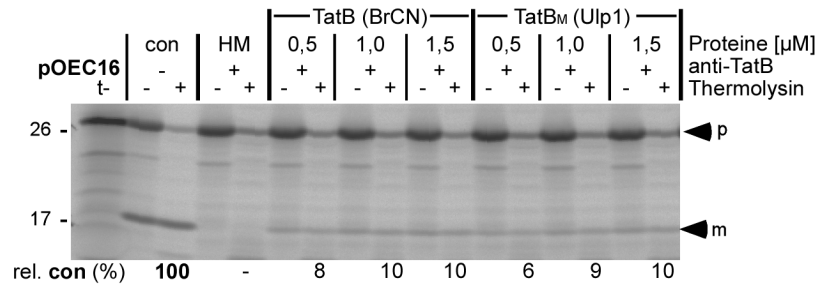


Abbildung 3.10: Rekonstitution des Tat-Transports anti-TatB-behandelter Thylakoide mit gereinigtem TatB und TatB_M. Unbehandelte (con) oder mit TatB-spezifischem Antikörper behandelte Thylakoide (HM), entsprechend 30 μg Chlorophyll, wurden mit 5 μl pOEC16 versetzt. Anti-TatB behandelte Thylakoide wurden vor Zugabe von pOEC16 5 min mit 0,5; 1,0 und 1,5 μM TatB (BrCN) bzw. TatB_M (Ulp1) auf Eis vorinkubiert. Die Transportreaktion wurde 5 min durchgeführt. TatB (BrCN) wurde mit Hilfe des pET30a-Systems (BrCN, His/S-tag abspaltbar mit Bromcyan), TatB_M (Ulp1) unter Nutzung des pETSUMO-Systems (Ulp1, His/SUMO-tag abspaltbar durch SUMO-Protease Ulp1; Vergleich der Überexpression und Reinigung in Abbildung 3.9) synthetisiert und gereinigt. Weitere Details zum *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuch sind Abbildung 3.3 zu entnehmen.

3.2.5 Heterologe Synthese von radioaktiv markiertem TatB_M

TatB_M, das unter Nutzung des pETSUMO-Vektors synthetisiert wurde, ist zur Rekonstitution des Tat-Transports befähigt (Abbildung 3.10). Um nun festzustellen, ob TatB_M in TatBC-Komplexe assembliert, wurde SUMO-TatB_M ausgehend vom pETSUMO-Vektor in Anwesenheit von ³⁵S-Methionin synthetisiert. Da die Überexpression in einem kleineren Ansatz durchgeführt wurde, wurden die *E. coli*-Zellen aufgrund der einfacheren Handhabung mittels Ultraschall und nicht mittels *French Press* aufgeschlossen. Danach wurde das Lysat mit Guanidinhydrochlorid-Bindepuffer versetzt. Das radioaktiv synthetisierte Fusionsprotein SUMO-TatB_M (Abbildung 3.11 A, n.l., 43 kDa), wurde über Ni²⁺-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Elutionsfraktion (Abbildung 3.11 A, E) wurde einer Protease-Spaltung mit Ulp1 unterzogen (siehe zum Vergleich auch Abbildung 3.9 A). Der Spaltansatz wurde aufkonzentriert und um potentiellen Proteinverlust zu minimieren, ohne Durchführung einer präparativen SDS-PAGE via RP-HLC aufgereinigt (siehe Kapitel 2.2.2.4 und 2.2.2.6).

Aus dem Chromatogramm wird ersichtlich, dass der Spaltansatz in *peaks* eluiert, die Absorptionen im Bereich von 300 - 600 mAU (*mili absorption units*) aufweisen (siehe Abbildung 3.11 B, links). Es ist anzunehmen, dass die Proteinausbeute für eine *Blue Native*-PAGE-Analyse proteinbehandelter Thylakoidmembranen ausreichend ist. Eine Überprüfung der Reinigungsfractionen über SDS-PAGE und Autoradiographie zeigt, dass von 22 – 22,5 min hauptsächlich ungespaltenes SUMO-TatB_M eluierte (siehe Abbildung 3.11 B, rechts, SB_M).

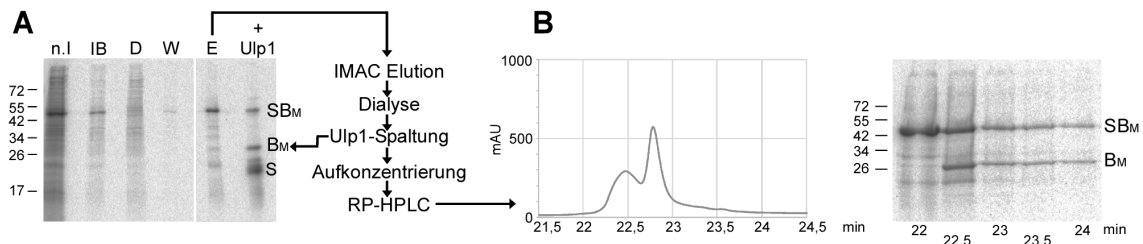


Abbildung 3.11: Heterologe Synthese und Reinigung von radioaktiv markiertem SUMO-Tat_{B_M}. (A) Nach heterologer Synthese in *E. coli* liegt Tat_{B_M} als Fusionsprotein mit N-terminalem His/SUMO-tag vor, welches über IMAC gereinigt wird. Die Reinigungsfractionen wurden über ein 15 %iges SDS-PAA-Gel aufgetrennt und via Autoradiographie visualisiert („n.l.“: nach Induktion der Expression; „IB“: *inclusion bodies* vor Säule; „D“: Durchfluss; „W“: Waschung; „E“: Elution). Das Eluat (SB_M: SUMO-Tat_{B_M}; B_M: Tat_{B_M}; S: SUMO-tag) wird im Rahmen einer Dialyse einer Protease-Spaltung (+ Ulp1) unterzogen, aufkonzentriert und ohne vorherige präparative SDS-PAGE über RP-HPLC gereinigt. In (B) ist ein Ausschnitt des Chromatogramms der RP-HPLC Reinigung dargestellt (mAU: *mili absorption units*, Detektionswellenlänge 220 nm). Die Fraktionierung der Proteinproben erfolgte in 0,5 min-Schritten. 30 µl der einzelnen Reinigungsfractionen wurden über 15 %ige SDS-PAA-Gele aufgetrennt und via Autoradiographie visualisiert. Weitere Informationen zur Synthese und Reinigung sind in Kapitel 2.2.2.4 und 2.2.2.6 angegeben.

Protein dieser Fraktion wird folgend als „SUMO-Tat_{B_M}“ bezeichnet. In Fraktionen ab 22,5 min eluierten SUMO-Tat_{B_M} (SB_M) und gespaltenes Tat_{B_M} (B_M), diese Fraktionen werden dennoch „Tat_{B_M}“ benannt. Die Elutionsfraktionen 22 und 22,5 min wurden zur Untersuchung der Assemblierung des Proteins in TatBC-Komplexe verwendet (siehe Abbildung 3.12).

3.2.6 Assemblierung von gereinigtem, radioaktiv markiertem Tat_{B_M}

Die im Autoradiogramm der Abbildung 3.11 B dargestellten RP-HPLC Fraktionen „SUMO-Tat_{B_M}“ und „Tat_{B_M}“ wurden nach Gefriertrocknung in HM-Puffer gelöst und ultrazentrifugiert. Die im Überstand befindlichen Proteinfractionen wurden mit Thylakoiden auf Eis inkubiert. Da Tat_B spontan in die Thylakoidmembran inseriert, ist keine Inkubation im belichteten Wasserbad notwendig. Des Weiteren kann durch eine Inkubation auf Eis eine verstärkte Signalintensität im Autoradiogramm für TatBC-Substrat-Komplexe erreicht werden, da das eingesetzte pOEC16 mit verminderter Effizienz transportiert wird (Abbildung 3.12 A, pOEC16, con).

Nach SDS-PAGE-Analyse der Thylakoidmembranen, die mit „Tat_{B_M}“ und „SUMO-Tat_{B_M}“ versetzt wurden, kann beobachtet werden, dass das enthaltene Tat_{B_M} an die Thylakoidmembran bindet (siehe jeweils Spur T). Wie bereits aus Abbildung 3.11 B entnehmbar ist, enthält die Probe „SUMO-Tat_{B_M}“ jedoch kaum gespaltenes Tat_{B_M} ohne SUMO-tag. Für beide Proben ist erkennbar, dass auch SUMO-Tat_{B_M} an die Thylakoidmembran bindet.

unspezifisch an Lichtsammelkomplexe assoziiertes TatB hinweisen könnte. Unterhalb dieser Laufhöhe migriert vermutlich oligomeres TatB (siehe auch Abbildung 3.8). Für „SUMO-TatB_M“ sind keine charakteristischen Komplexbanden im Bereich von ca. 600 kDa erkennbar. SUMO-TatB_M assembliert also nicht in TatBC-Komplexe.

Es ist anzunehmen, dass die N-terminale His/SUMO-*tag*-Region die Insertion der Transmembranhelix in die Thylakoidmembran stört und folglich die Assemblierung in TatBC-Komplexe verhindert. Der geringe Anteil an TatB_M in der Probe „SUMO-TatB_M“ reicht wahrscheinlich nicht für eine sichtbare Markierung der TatBC-Komplexe aus.

Die *Blue Native*-PAGE-Analyse beweist, dass gereinigtes TatB_M, welches nachweislich im *in thylakoido*-Versuch zur Rekonstitution des Tat-Transports befähigt ist (siehe Abbildung 3.10), in TatBC-Komplexe assemblieren kann. Nach allen bisherigen Daten kann also angenommen werden, dass die Assemblierung von TatB in TatBC-Komplexe mit der Funktion der Translokation zusammenhängt.

3.3 Untersuchung der TatB-Funktion und Analyse von TatB-Varianten

Nachdem in Kapitel 3.1 die generelle Eignung des *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuchs für TatB festgestellt wurde, wurde dieser Versuch nun zur Analyse von TatB-Varianten sowie zur detaillierten Untersuchung der TatB-Funktion verwendet.

3.3.1 *Der konservierte Glutamatrest in der TMH von TatB ist nicht essentiell für die Transportrekonstitution*

In Ma et al. (2018) wurde gezeigt, dass *in vitro* synthetisiertes TatB,E10C aus *P. sativum* nicht in TatBC-Komplexe assembliert (wird in Ma et al., 2018 als E11C bezeichnet). Wenn dieser hochkonservierte Glutamatrest in *E. coli*-TatB durch einen Alaninrest ersetzt wurde, konnten Alcock et al. (2016) für TatB,E8A keine Transportaktivität nachweisen. Da Proteinvarianten mit Substitution des Glutamatrests nach Alcock et al. (2016) potentiell inaktiv sind und nicht TatBC-Komplexe assemblieren, ist anzunehmen, dass die Assemblierung eine Voraussetzung für die Proteinaktivität ist.

So wurden im Rahmen dieser Arbeit die Proteinvarianten TatB,E10C und TatB,E10A aus Erbse analysiert. Vor Durchführung eines Rekonstitutionsversuchs wurden TatB,E10C, TatB,E10A sowie TatB und TatB-Antigen in Anwesenheit von ³⁵S-Methionin *in vitro* synthetisiert, mit Thylakoiden inkubiert und anschließend die Bindung an die Thylakoidmembran bzw. die Assemblierung in TatBC-Rezeptorkomplexe analysiert. Aus Abbildung 3.13 A ist entnehmbar, dass die Proteinausbeute von TatB und TatB-Antigen im Vergleich zu den Proteinvarianten TatB,E10A und TatB,E10C deutlich erhöht ist (Spuren: t). Die Translationsprodukte (t) wurden im stöchiometrischen Verhältnis zum Protein aufgetragen, das mit Thylakoiden inkubiert wurde (T). So zeigt sich, dass TatB und die Proteinvarianten TatB,E10A und TatB,E10C ähnlich effizient an die Thylakoidmembranen binden, TatB-Antigen hingegen nur marginal. Nach Durchführung einer *Blue Native*-PAGE ist ausschließlich die bereits in Abbildung 3.8 gezeigte Assemblierung von TatB in TatBC-Komplexe erkennbar. TatB-Antigen, TatB,E10A und TatB,E10C assemblieren nicht in TatBC-Komplexe (für TatB,E10C siehe auch Ma et al., 2018).

Anschließend wurden die Proteinvarianten TatB,E10C und TatB,E10A in *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuchen untersucht. Die eingesetzten TatB-Varianten sowie authentisches TatB wurden in diesem Versuch und auch in alle weiteren Folgeversuchen ausgehend vom pET30a-Vektor synthetisiert (siehe Abbildung 3.5).

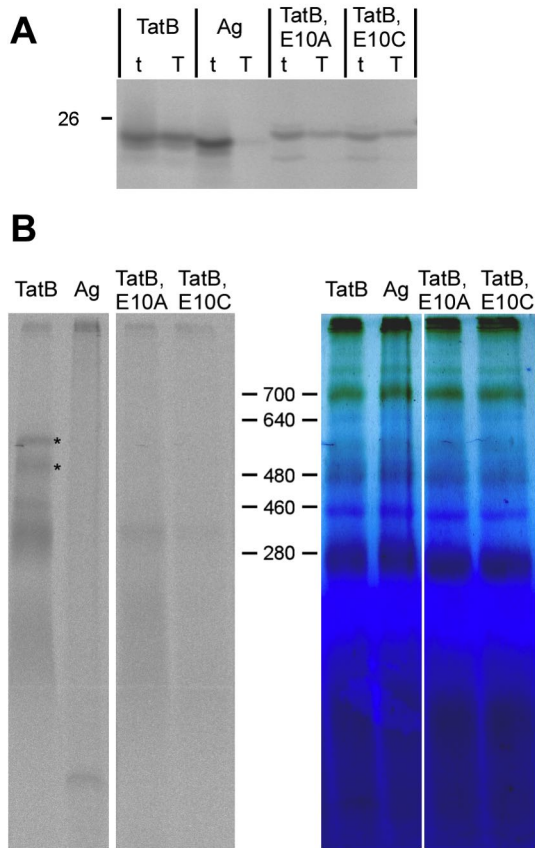


Abbildung 3.13: Membranbindung und -integration von *in vitro* synthetisiertem und radioaktiv markiertem TatB,E10A bzw. TatB,E10C. TatB, TatB-Antigen (Ag), TatB,E10A und TatB,E10C wurden mittels *Rabbit Reticulocyte Lysate* System in Anwesenheit von ^{35}S -Methionin *in vitro* synthetisiert, wobei alle Proteine mit Aminosäureaustausch V245M vorlagen. Frisch präparierte Thylakoide, entsprechend 60 μg Chlorophyll, wurden mit je 10 μl TatB, TatB-Antigen (Ag), TatB,E10A und TatB,E10C versetzt und 5 min auf Eis inkubiert. Die Thylakoide wurden analog zu Abbildung 3.3 mit HM-Puffer gewaschen, jedoch nicht mit Thermolysin behandelt. (A) Thylakoidfraktionen (T), entsprechend 15 μg Chlorophyll, wurden via SDS-PAGE (15 % PAA) aufgetrennt und mittels Autoradiographie visualisiert. In den Spuren t wurden TatB, Ag, TatB,E10A bzw. E10C im stöchiometrischen Verhältnis zu den Proben T aufgetragen. (B) Detektion radioaktiv markierter TatBC-Rezeptorkomplexe. 45 μg des Thylakoidmaterials wurden mit Digiton solubilisiert und über *Blue Native*-PAGE aufgetrennt. Links ist das Autoradiogramm, rechts das *Blue Native*-Gel dargestellt. Weitere Details zur *Blue Native*-PAGE sind Abbildung 3.8 zu entnehmen.

Die gereinigten Proteine TatB, TatB-Antigen, TatB,E10C und TatB,E10A wurden in den Konzentrationen 0,5 μM ; 1,0 μM und 1,5 μM mit anti-TatB-behandelten Thylakoiden vorinkubiert und mit dem radioaktiv markiertem Tat-Substrat pOEC16 versetzt, wobei die Transportreaktion 10 min durchgeführt wurde (Abbildung 3.14). Während für anti-TatB behandelte Thylakoide, die mit HM-Puffer (HM) bzw. TatB-Antigen (Ag) versetzt wurden, keine Akkumulation von mOEC16 erkennbar ist und somit kein Tat-Transport nachgewiesen werden kann, zeigt sich nach Zugabe von TatB eine Wiederherstellung des Transports um bis zu 40 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (rel. con). Interessanterweise ist dieser Wert im Vergleich zu den *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuchen aus Abbildung 3.5 und Abbildung 3.10 deutlich erhöht. Die Varianz der Transportraten nach Rekonstitution wird in Kapitel 4.5 diskutiert.

Im Gegensatz zu Alcock et al. (2016) sind die Proteinvarianten TatB,E10C und TatB,E10A zur Rekonstitution des Tat-Transports befähigt, was sich am Auftreten des reifen Proteins zeigt. Die relativen Transportraten liegen bezogen auf die Kontrolle für TatB,E10C bei 5 - 6 % und für TatB,E10A bei 7 - 10 % (rel. con). Die Proteine weisen dabei 15 - 30 % der Aktivität des

Wildtyp-Proteins auf (rel. TatB). TatB,E10C und TatB,E10A rekonstituieren also den Tat-Transport, obwohl sie nicht in TatBC-Komplexe assemblieren.

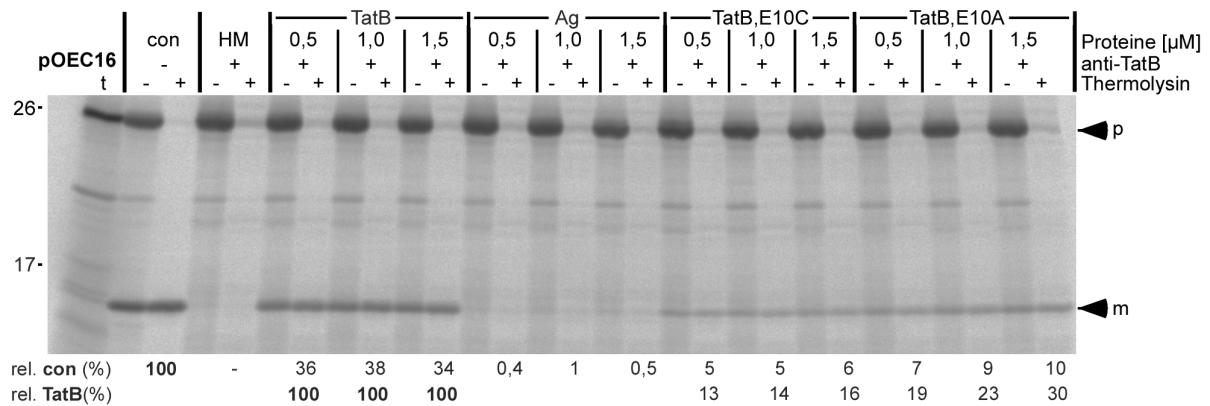


Abbildung 3.14: Rekonstitution des Tat-Transports anti-TatB-behandelter Thylakoide mit gereinigten TatB-Varianten. Unbehandelte (con) oder mit TatB-spezifischem Antikörper behandelte Thylakoide (HM), entsprechend 30 μg Chlorophyll, wurden mit 5 μl pOEC16. Im Rekonstitutionsversuch wurden anti-TatB behandelte Thylakoide vor Zugabe des jeweiligen Vorläuferproteins 5 min mit 0,5 μM; 1 μM bzw. 1,5 μM TatB, Antigen (Ag), TatB,E10C oder TatB,E10A Eis vorinkubiert. Die Proteine wurden unter Nutzung des pET30a-Systems heterolog synthetisiert und analog zum in Kapitel 3.1.3 beschriebenen Vorgang gereinigt. Die Transportzeit betrug 10 min. Unterhalb des Autoradiogramms sind die relative Transportraten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (rel. con (%)) bzw. im Vergleich zu TatB (rel. TatB (%)) in entsprechender Proteinkonzentration angegeben. Weitere Details zum *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuch sind Abbildung 3.3 zu entnehmen.

Dass die ursprünglich als inaktiv angenommenen TatB-Varianten eine Wiederherstellung des Transportes zeigten, wurde nicht erwartet. Mit Hilfe der bereits in Abbildung 3.7 vorgestellten Western Blot-Analyse zur Stabilität der Antikörperbindung in Thylakoiden wurde gezeigt, dass weder durch die Zugabe von TatB,E10C noch von TatB,E10A eine erhöhte Freisetzung der TatB-spezifischen Antikörper hervorgerufen wird (siehe Anhang 11). Bei beiden durchgeführten Versuchen konnte nach Zugabe des TatB-Antigens die höchste Menge der TatB-spezifischen Antikörper in Überstandsfractionen nachgewiesen werden, wobei das TatB-Antigen nicht zur Wiederherstellung des Tat-Transports befähigt ist (siehe Abbildung 3.14 und Anhang 11).

Somit ist nachgewiesen, dass die Restaktivität der Proteinvarianten TatB,E10C und TatB,E10A tatsächlich auf einer geringen Fähigkeit zur Rekonstitution des Transportes beruht. Die Funktion von TatB ist, laut aktuellem Forschungsstand, an die Assemblierung in den TatBC-Rezeptorkomplexe gekoppelt. Für die Proteinvarianten TatB,E10C und TatB,E10A ist denkbar, dass deren Assemblierung in TatBC-Komplexe nicht vollständig gestört, sondern nur nicht

detektierbar ist (siehe Diskussion in Kapitel 4.2).

3.3.2 Kinetik des Tat-Transports nach TatB-vermittelter Rekonstitution

Da gezeigt wurde, dass TatB eine funktionelle Rekonstitution des Tat-Transportes anti-TatB-behandelter Thylakoide vermittelt, sollte nun im nächsten Schritt der TatB-Bedarf in der Rekonstitutionsreaktion bestimmt werden. Bevor mit den Experimenten zur Analyse der Konzentrationsabhängigkeit von TatB begonnen werden konnte, war ein Vorversuch notwendig, der die geeignete Transportdauer für diesen festlegte. Ziel hierbei war es, eine Zeit festzulegen, bei der die Transportreaktion nicht durch die abnehmende Konzentration des zur Verfügung stehenden Substrats limitiert ist. So wurde pOEC16 in drei unabhängigen Experimenten für 2,5; 5; 10 und 20 min in unbehandelte (con) und mit TatB (TatB) rekonstituierte anti-TatB-behandelte Thylakoide transportiert (Abbildung 3.15).

Die Signalintensität des maturen Proteins wurde für jeden Zeitpunkt quantifiziert. Die in Kontroll- (con) und Rekonstitutionsproben (TatB) erreichte Transportrate wurde jeweils auf die 20-minütige Kontrollreaktion (con) relativiert und in Abbildung 3.15 B graphisch dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass der Membrantransport der Kontrollreaktion deutlich schneller erfolgt, da bereits nach 2,5 min 40 % des insgesamt transportierten Substrates umgesetzt wurden. Zu späteren Zeitpunkten nimmt der Anstieg der Akkumulation von mOEC16 wiederum ab, was auf eine Limitierung der Substratmenge im Transportansatz hindeutet (Abbildung 3.15 B, con).

Im zeitlichen Verlauf des Rekonstitutionsversuch zeigt sich im Gegensatz dazu ein langsamer, aber steter Umsatz des Vorläuferproteins zum maturen Protein. Eine Limitierung der Substratmenge konnte hier nicht beobachtet werden, d.h. der Anstieg der Akkumulation von mOEC16 ist im gesamten Versuchszeitraum gleichbleibend (siehe Abbildung 3.15 B, TatB; siehe auch Anhang 18)

Zur Bestimmung des TatB-Bedarfs in der Rekonstitution und auch für folgende Versuche wurde somit eine Transportzeit von 10 min gewählt, da ab diesem Zeitpunkt ausreichend matures Protein für eine zuverlässige Quantifizierung vorliegt, in Kontrollreaktionen aber noch keine erhebliche Substratlimitierung vorliegt.

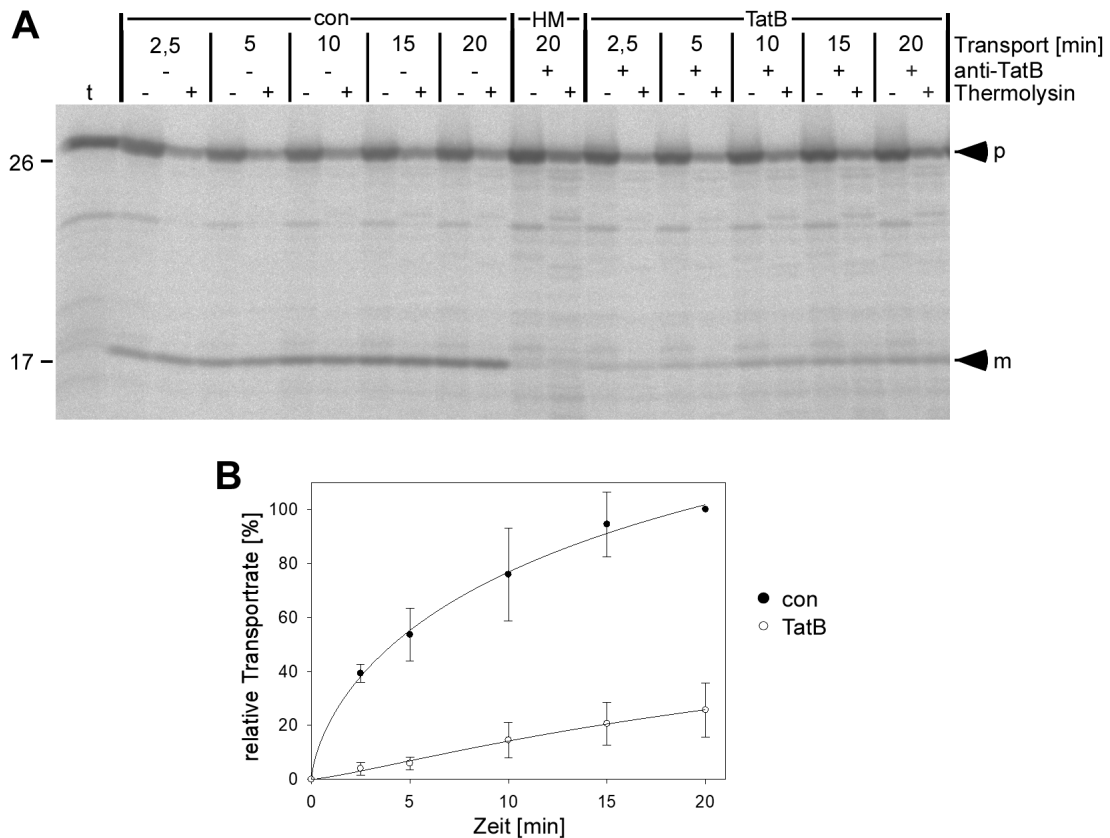


Abbildung 3.15: Kinetik des Tat-Transports unbehandelter und rekonstituierter Thylakoide. (A) Unbehandelte Thylakoide (con) oder anti-TatB-behandelte Thylakoide, entsprechend 30 µg Chlorophyll, wurden entweder mit HM-Puffer (con) oder mit 0,5 µM gereinigtem TatB (TatB) versetzt und 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurden je 5 µl pOEC16 hinzugefügt. Die Transportreaktion erfolgte für die über den Spalten angegebenen Transportzeiten. Alle weiteren Schritte wurden analog zu Abbildung 3.3 durchgeführt. (B) Der Transport des Substrats wurde nach Wiederholung des in (A) dargestellten Experiments (n = 3) quantifiziert. Für jeden Zeitpunkt wurde die relative Menge des muren OEC16 (m) im Vergleich zur 20-minütigen Kontrollreaktion unbehandelter Thylakoide (con) bestimmt. Schwarze Kreise: Kontrolltransport unbehandelter Thylakoide (con), weiße Kreise: TatB-Rekonstitution (TatB).

3.3.3 Konzentrationsabhängigkeit der TatB-Rekonstitution und Vergleich zu TatB,E10C

Um nun den TatB-Bedarf in der Rekonstitution des Tat-Transports zu bestimmen, wurden anti-TatB-behandelte Thylakoide mit TatB in Konzentrationen von 0,025 - 1,5 µM inkubiert. Im Anschluss wurde pOEC16 transportiert (Abbildung 3.16 A). Damit eine verlässliche Aussage über die Konzentrationsabhängigkeit der TatB-Rekonstitution getroffen werden kann, wurden die Transportraten von drei unabhängigen Versuchen quantifiziert und in Abbildung 3.16 C graphisch dargestellt. Außerdem wurde ein Einzelversuch unter Verwendung der Proteinvariante TatB,E10C durchgeführt (Abbildung 3.16 B). Die erhaltenen Transportraten sind in Abbildung 3.16 D dargestellt. Die Daten können mit der Hill-Funktion ($V_{max} \cdot [TatB]^n / (K_m^n + [TatB]^n)$) beschrieben werden (Hill, 1913; Weiss, 1997). Die Hill-Gleichung stellt dabei den Zusammenhang zwischen der Transportrate (V) eines Tat-Substrats und der TatB-

Konzentration dar [TatB]. Der Parameter V_{max} beschreibt die maximale Transportrate. Der K_m -Wert ermöglicht Aussagen über die Affinität von TatB zum TatBC-Rezeptorkomplex, wobei der Zahlenwert die Substratkonzentration angibt, bei der 50 % des rekonstituierten Transports erreicht werden. Das Tat-Substrat liegt zur gewählten Transportdauer im Überschuss vor und wird somit als konstant festgelegt. Auch die Menge des als Enzymkomplex betrachteten intrinsischen TatBC-Rezeptorkomplexes ist dabei konstant. Der aus der Regression resultierende Kurvenverlauf ist sigmoidal und lässt auf eine positive Kooperativität schließen, was bedeutet, dass die Transportrate bei niedrigen TatB-Konzentrationen exponentiell ansteigt.

Ein positiv kooperativer Effekt wurde bereits in Hauer et al. (2013) für TatA ermittelt. Hier wurden analoge *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuche mit TatA und anti-TatA-behandelten Thylakoiden durchgeführt. TatA wird in Hauer et al. (2013) als Coenzym, welches sich am TatBC-Rezeptorkomplex anlagert, beschrieben. Die aktive Translokase kann den Tat-Transport an der Thylakoidmembran anti-TatA behandelte Thylakoide katalysieren. Dahingegen assembliert TatB in TatBC-Rezeptorkomplexe und überführt den inhibierten Rezeptor in den aktiven Zustand. Der Substrattransport ist wieder möglich. Ob TatB dabei *de novo* gebildete und/oder bereits vorhandene TatBC-Komplexe assembliert, ist noch unbekannt (Diskussion in Kapitel 4.1).

Während mOEC16 nach Rekonstitution mit TatB im Konzentrationsbereich von $0,025 - 0,075 \mu\text{M}$ kaum detektierbar ist, ist das mature Protein für alle weiteren verwendeten Konzentrationen deutlich sichtbar. Ab einer Konzentration von $0,5 \mu\text{M}$ wird das Transportmaximum der TatB-vermittelten Rekonstitution erreicht. Nach Erhöhung der TatB-Konzentration über $0,5 \mu\text{M}$ lässt sich die maximale Transportrate, die bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (con) bei ca. 20 % liegt, nicht weiter steigern. Die relativen Transportraten, die in Abbildung 3.16 B für die Variante TatB,E10C dargestellt sind, zeigen einen zur TatB-Rekonstitution vergleichbaren Verlauf. Lediglich V_{max} liegt mit 9 % deutlich niedriger. Die Proteinkonzentration, die zu 50 % Transportrekonstitution (im Vergleich zur maximalen Transportrate nach Rekonstitution) führt (K_m), liegt für TatB,E10C bei $0,19 \mu\text{M} \pm 0,022$ und für TatB bei $0,15 \mu\text{M} \pm 0,015$. Für TatB,E10C muss jedoch beachtet werden, dass der K_m -Wert aus einem Einzelversuch ermittelt wurde. Dennoch ist für TatB und TatB,E10C eine Vergleichbarkeit erkennbar. Interessanterweise befindet sich auch der für TatA ermittelte K_m -Wert von $0,12 \mu\text{M}$ in der gleichen Größenordnung (Hauer et al., 2013). Die

Daten legen nahe, dass TatA und TatB eine ähnliche Affinität zum TatBC-Komplex aufweisen und werden in Kapitel 4.6.1 diskutiert.

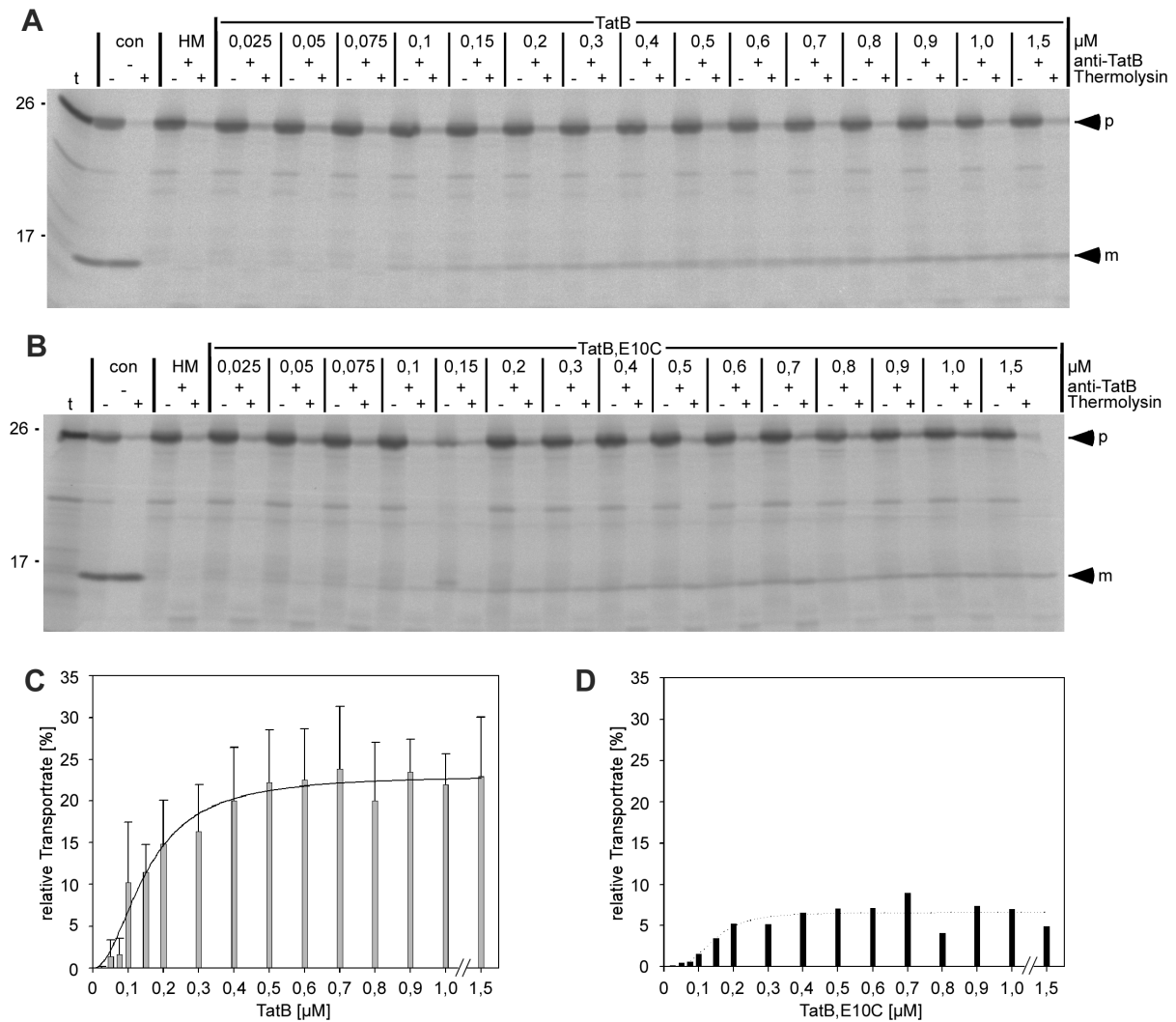


Abbildung 3.16: Quantifizierung des TatB-Bedarfs. Anti-TatB-behandelte Thylakoide wurden mit gereinigtem TatB (A) bzw. TatB,E10C (B) in Konzentrationen von 0,025 - 1,5 µM versetzt und einer 10-minütigen Transportreaktion mit pOEC16 unterzogen. (C) Der Transport des Substrats wurde nach Wiederholung des in (A) dargestellten Experiments (n = 3) quantifiziert, für (B) wurde die relative Transportrate des Einzelversuchs in (D) dargestellt. Die relative Menge des transportierten Substrats (m) jeder Probe wurde auf die Transportreaktion unbehandelter Thylakoide bezogen (con). Die Transportraten und zugehörige Standardabweichungen sind graphisch dargestellt. Die Regression in (C) und (D) basiert auf einer sigmoidalen Funktion nach der Hill-Gleichung $v = (V_{max} * [TatB]^n) / (K_m^n + [TatB]^n)$. Weitere Informationen zum *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuch sind Abbildung 3.3 zu entnehmen.

3.3.4 *TatB* aus *A. thaliana* rekonstituiert den *Tat*-Transport in Erbsenthylakoiden

In bisherigen Untersuchungen zur Rekonstitution des *Tat*-Transports wurde stets *TatB* aus *P. sativum* verwendet. So sollte nun untersucht werden, ob *TatB* einer anderen Spezies, in diesem Fall aus *A. thaliana*, auch zur Rekonstitution des *Tat*-Transports in isolierten Erbsenthylakoiden befähigt ist. Im resultierenden *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuch wurden nun anti-*TatB*-behandelte Thylakoide vor der 10-minütigen Transportreaktion mit 0,75 μM und 1,5 μM *TatB* aus *P. sativum* und *A. thaliana* versetzt (Abbildung 3.17). Aus dem dargestellten Versuch geht hervor, dass *TatB* aus *A. thaliana* ebenfalls die Rekonstitution des *Tat*-Transports vermittelt, wenn auch mit verminderter Transportrate.

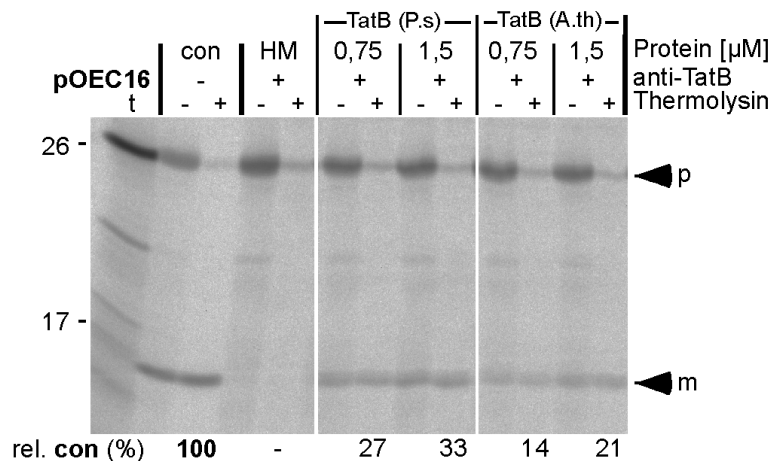


Abbildung 3.17: Vergleich der Rekonstitution des *Tat*-Transports anti-*TatB*-behandelter Thylakoide mit gereinigtem *TatB* aus *P. sativum* und *A. thaliana*. Anti-*TatB*-behandelte Thylakoide wurden mit gereinigtem *TatB* aus Erbse (P.s) bzw. aus *A. thaliana* (A.th) in Konzentrationen von 0,75 und 1,5 versetzt und einer 10-minütigen Transportreaktion mit pOEC16 (5 μl) unterzogen. Die relative Menge des transportierten Substrats (m) wurde auf die Transportreaktion unbehandelter Thylakoide bezogen und ist unter dem Autoradiogramm angegeben (rel. con (%)). Weitere Informationen zum *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuch sind Abbildung 3.3 zu entnehmen.

Während die Rekonstitution durch *TatB* aus Erbse zu Transportraten von 27% (0,75 μM) und 33 % (1,5 μM) führt, liegen diese für das Pendant aus *Arabidopsis thaliana* bei 13 % und 21 %. Zusätzlich wurde mit *in vitro* synthetisierten und radioaktiv markierten Vorläuferproteinen der *TatB*-Proteine beider Spezies ein Versuch zur Assemblierung in *TatBC*-Komplexe mit intakten Chloroplasten durchgeführt. In diesem sog. *in organello*-Versuch (siehe Kapitel 2.2.3.3) wurde festgestellt, dass beide *TatB*-Proteine mit vergleichbarer Effizienz in *TatBC*-Rezeptorkomplexe assemblieren (siehe Abbildung 3.18)

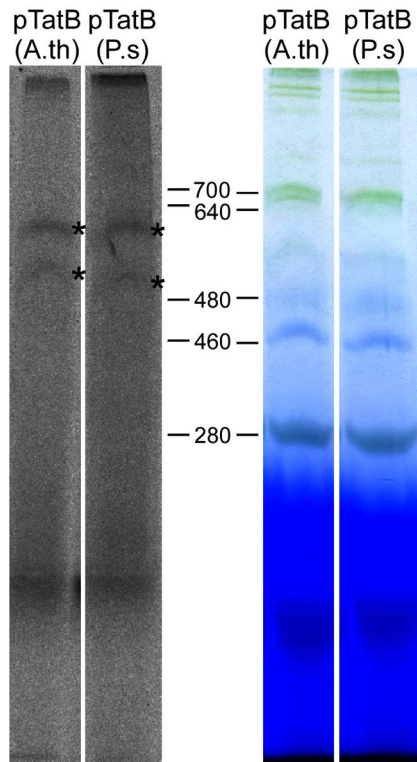


Abbildung 3.18: Blue Native-PAGE-Analyse von Thylakoiden nach *in organello*-Transport von TatB und TatC aus *P. sativum* und *A. thaliana*. Erbsenchloroplasten, entsprechend 50 µg Chlorophyll, wurden mit 25 µl *in vitro* synthetisiertem und radioaktiv markiertem pTatB (*Rabbit Reticulocyte Lysate System*) aus *P. sativum* (P.s) und *A. thaliana* (A.th) versetzt. Die Transportreaktion erfolgte 20 min. Die solubilisierten Proteine der Thylakoidmembran wurden über *Blue Native*-PAGE aufgetrennt. Links ist das Autoradiogramm des Gels dargestellt. Rechts abgebildet ist das ungefärbte *Blue Native*-Gel. Weitere Details zur *Blue Native*-PAGE sind Abbildung 3.8 zu entnehmen.

3.3.5 Die unstrukturierte C-terminale Region von TatB aus *P. sativum* ist nicht essentiell für die Rekonstitution des Tat-Transports

Eine weitere interessante Fragestellung ist, ob die unstrukturierte C-terminale Region von TatB für die Funktionalität des Proteins essentiell ist.

Für TatA wurde bereits gezeigt, dass das Fehlen dieses Bereichs die Funktion des Proteins aus *E. coli* und *A. thaliana* nicht beeinträchtigt (Lee et al., 2002: TatA₁₋₄₉ aus *E. coli*, in Fig. 2 a bezeichnet als „-40“; Dabney-Smith et al., 2003: TatA₁₋₅₃ aus *P. sativum*, in Fig. 3 bezeichnet als Tha4Δ29; Petterson et al., 2018: TatA₁₋₅₂ aus *A. thaliana*).

Im Falle von *E. coli*-TatB schließen an die amphipathische Helix zwei lösliche Helices an (Positionen der löslichen Helices: L56-L71 und Q77-T96), für welche eine funktionelle Bedeutung vermutet wird (Zhang et al., 2014a; Fröbel et al., 2020; Ulfing und Freudel, 2018).

Für TatB aus *E. coli* wurde gezeigt, dass C-terminal um 70 Aminosäuren verkürztes TatB₁₋₁₀₁ weiterhin den Tat-Transport vermittelt, wobei dieser jedoch vermindert ist (Lee et al., 2002: TatB₁₋₁₀₁ aus *E. coli*, in Fig. 2 b bezeichnet als „-70“; Maldonado et al., 2011: TatB_{M1-P101} in Fig. 3 A bezeichnet als 1-101HA). Die Entfernung der C-terminalen Region hat dabei keinen Einfluss auf die Komplexbildung mit TatC (Maldonado et al., 2011). Auch für TatB₁₋₁₀₇ aus

3.4 TatA als kritischer Faktor im *in thylakoido*-System

3.4.1 Die TatA-Menge ist im Tat-Transport limitiert

Thylakoide, die in Rekonstitutionsversuchen eingesetzt werden, werden mehrfach gewaschen. Nach osmotischer Lyse der Chloroplasten erfolgt eine zweifache Waschung der Thylakoide. Im Anschluss an die Inkubation des TatB-spezifischen Antikörpers werden die mit Antikörper behandelten Thylakoide sowie auch unbehandelte Thylakoide, die für Kontrollreaktionen eingesetzt werden, erneut zweifach gewaschen (siehe Abbildung 3.2).

Diese Waschschritte könnten jedoch zu einem Verlust von Komponenten führen, die die Transportfähigkeit von Thylakoiden beeinflussen. Um diesen Effekt zu untersuchen, wurden Chloroplasten lysiert, 0- bis 4-mal gewaschen, stets in frischem HM-Puffer aufgenommen und einer Transportreaktion mit pOEC16 unterzogen. Es wurde eine Transportzeit von 2,5 min gewählt. Die Analyse des Tat-Transports von pOEC16 im kinetischen Verlauf zeigte, dass bei 2,5-minütigem Transport die Transportgeschwindigkeit, also der Anstieg der Akkumulation von mOEC16, maximal ist und das Signal des reifen Proteins deutlich erkennbar ist (siehe Abbildung 3.15).

Aus dem in Abbildung 3.20 A dargestellten Autoradiogramm ist ersichtlich, dass die relative Transportrate von Thylakoiden, die 0- bis 4-mal gewaschen wurden, sukzessiv abnimmt (0 – 4 x HM).

Nach vier Waschschritten (4 x HM) im Vergleich zu nicht gewaschenen Thylakoiden (0 x HM) wurde eine relative Transportrate von 43 % ermittelt (rel. 0 x HM). Bei der Auftragung der Proben wurde jedoch nicht berücksichtigt, dass durch die nacheinander folgenden Zentrifugations- und Resuspensionsvorgänge Thylakoidmaterial verloren geht. Somit wurden alle Proben nachträglich einer Chlorophyllnachbestimmung unterzogen und die Transportraten auf gleiche Chlorophyllgehalte nachberechnet (rel. 0 x HM chl.). Die Berechnung zeigt, dass sich trotz des eingerechneten Materialverlusts mit jedem Waschschritt eine Verminderung des Transports ableiten lässt. Der Transport liegt dabei nach vier Waschschritten (4 x HM) im Vergleich zu nicht gewaschenen Thylakoiden (0 x HM) bei 50 % (rel. 0 x HM chl.). Auch Dr. Mandy Waclawek zeigte in ihrer Dissertation mit Hilfe eines *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuchs, dass die Transportrate des chimären Tat-Substrats 16/23 im Rahmen von Waschschritten abnimmt (Dissertation von Mandy Waclawek, 2016: siehe Abbildung 24).

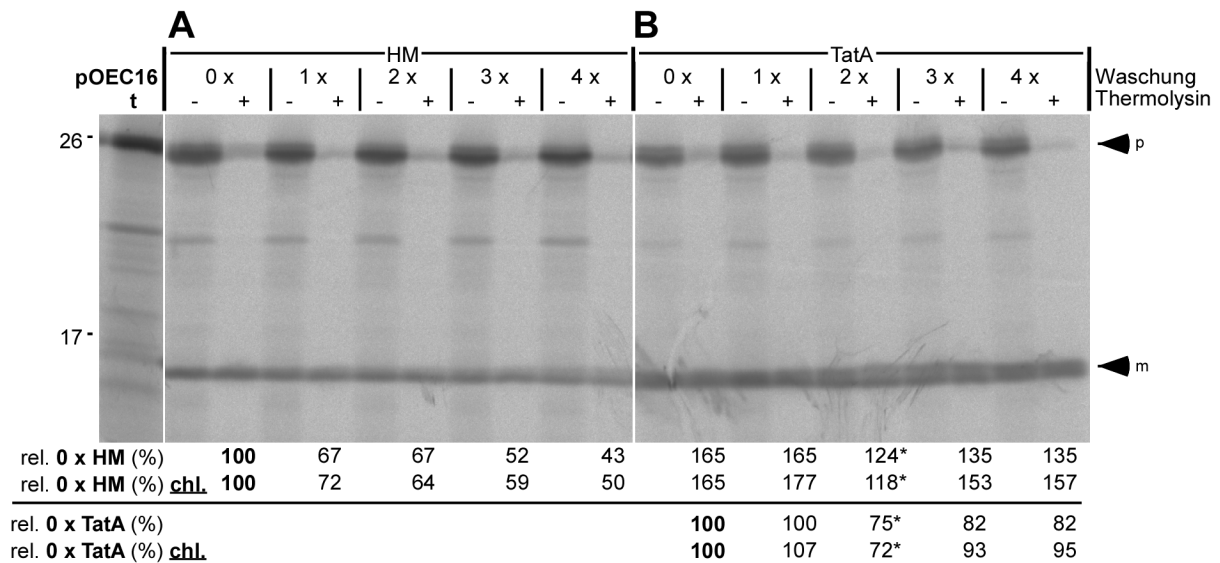


Abbildung 3.20: Transport von pOEC16 in Thylakoide nach Durchführung verschiedener Waschstritte. Chloroplasten wurden lysiert, die resultierenden Thylakoide wurden 0- bis 4-mal gewaschen und folgend entweder mit HM-Puffer (A) oder mit TatA (B) aus *A. thaliana* behandelt. Nach 5-minütiger Vorinkubation wurden die Thylakoide mit je 5 µl pOEC16 versetzt und einer 2,5-minütigen Transportreaktion unterzogen. Weitere Details zum in *thylakoido*-Rekonstitutionsversuch sind Abbildung 3.3 zu entnehmen. Die Signale des reifen Proteins (m) in der (+) Fraktion wurden quantifiziert, die erhaltenen Werte sind unterhalb des Autoradiogramms angegeben. In Zeile 1 und 2 wurde die relative Menge des transportierten Substrats (m) ausschließlich auf die Transportreaktion 0 x HM bezogen (rel. 0 x HM). In Zeile 3 und 4 wurde die relative Menge des transportierten Substrats (m) der entsprechenden Behandlung mit TatA auf die Probe 0 x TatA bezogen (rel. 0 x TatA). Der Chlorophyllgehalt der Thylakoide wurde nach Durchführung des Versuchs nachbestimmt. Die in Zeile 2 und 4 dargestellten Transportraten sind auf den Chlorophyllgehalt normiert (chl). Die mit * markierte Probe 2 x TatA wird als abweichend betrachtet.

In einer Publikation von Frielingsdorf et al. (2008) wurde bereits gezeigt, dass TatA, im Gegensatz zu TatB und TatC, durch Natriumbromidbehandlung partiell aus der Membran extrahiert werden kann. Es ist also denkbar, dass TatA auch durch wiederholte Waschungen der Thylakoide aus der Membran herausgelöst werden könnte. Um diese potentielle Limitierung der TatA-Menge in der Transportreaktion zu überprüfen, wurden die Thylakoide verschiedener Waschstadien mit 0,5 µM gereinigtem TatA versetzt (Abbildung 3.20 B). Weil TatA aus *A. thaliana* bereits in Hauer et al. (2013) in Rekonstitutionsversuchen charakterisiert wurde, wurde hier das *Arabidopsis*-Protein anstelle von TatB aus Erbse verwendet.

Wenn nun Thylakoide jedes Waschstadiums (0–4 x) vor der Transportreaktion mit TatA inkubiert werden, geht aus dem Autoradiogramm hervor, dass die erreichten Transportraten im Vergleich zu mit HM-Puffer behandelten Thylakoiden deutlich erhöht sind. Bezogen auf nicht gewaschene Thylakoide (rel. 0 x HM) werden für TatA-behandelte Thylakoide (0–4 x TatA) Transportraten von 135–165 % bzw. nach Normierung auf die Chlorophyllmenge von 153–177 % erreicht. Auffällig ist, dass die relative Transportrate von

pOEC16 nach TatA-Zugabe zu Thylakoiden aller Waschstadien (1 x - 4 x TatA) stets höher ist als nach Zugabe von HM-Puffer (0 – 4 x HM). Außerdem kann auch eine Steigerung des Tat-Transport beobachtet werden, wenn TatA mit nicht gewaschenen Thylakoiden vorinkubiert wurde (rel 0 x HM: Vergleich von 0 x HM und 0 x TatA). Es ist denkbar, dass die TatA-Ausgangsmenge in Thylakoiden gering ist und so durch TatA-Zugabe gesteigert werden kann (siehe Diskussion in Kapitel 4.4).

Wenn nicht gewaschene und mit TatA versetzte Thylakoide als Referenz gewählt werden (rel. 0 x A), sinkt die Transportrate nach vier Waschungen (4 x TatA) auf 82 %. Bei Nachberechnung des Chlorophyllgehalts ergibt sich eine Transportrate von 95 %, die Verminderung des Transports liegt also lediglich bei 5 % (rel. 0 x A chl.). Ohne TatA-Zugabe liegt die Transportrate nach vier Waschungen (4 x HM) hingegen bei 43 % bzw. bei Nachberechnung des Chlorophyllgehalte bei 50 % (rel. 0 x HM und rel. 0 x HM chl.). Die Ergebnisse des Versuchs legen nahe, dass die TatA-Menge nach Durchführung von Waschungen im *in thylakoido*-Versuch limitiert ist.

Um den potentiellen TatA-Verlust zu überprüfen, wurden die Thylakoid- und Überstandsfraktionen nach sukzessiven Waschungen einer Immundetektion mit TatA-spezifischen Antikörpern unterzogen (Abbildung 3.21).

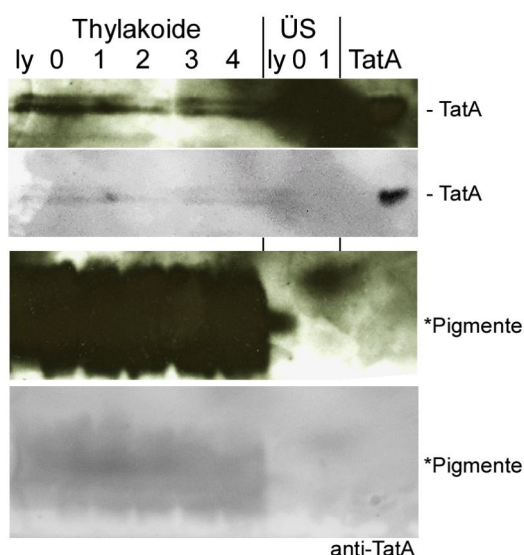


Abbildung 3.21: Detektion von TatA in Thylakoiden nach Durchführung verschiedener Waschschrte. Chloroplasten wurden lysiert (ly), die Thylakoide wurden 0- bis 4-mal gewaschen, wobei jeweils Pellet- (Thylakoide) und Überstandsfraktionen (ÜS) aufbewahrt wurden. Die Chlorophyllkonzentrationen der einzelnen Waschstadien wurde nachbestimmt. Thylakoide entsprechend 15 µg Chlorophyll wurden über ein 10 – 17,5 %iges SDS-PAA Gel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Zur Immundetektion von TatA (oben) mittels ECL (*enhanced chemiluminescence*) wurde die Membran 2 h mit anti-TatA-Antikörper (*A. thaliana*) und anschließend für 1 h mit *horseradish*-Peroxidase-konjugiertem anti-rabbit IGG inkubiert. Dargestellt sind Ausschnitte der Röntgenfilme zweier Expositionszeiten. Die Kreuzreaktion des TatA-spezifischen Antikörpers im Bereich der Pigmente dient als Ladekontrolle und ermöglicht die Zuordnung der TatA-Signale zu den einzelnen Thylakoid- und Überstandsfraktionen.

Überraschenderweise wurde keine deutliche Abnahme des TatA-Gehalts im Rahmen der Waschungen beobachtet. So kann vermutet werden, dass TatA lediglich im geringen Maße aus der Membran extrahiert wird und dass der potentielle Proteinverlust nicht mittels Western Blot-Analyse aufgelöst werden kann.

Für einen sensitiveren Proteinnachweis wurde *in vitro* synthetisiertes und radioaktiv markiertes TatA mit Thylakoiden inkubiert und in Folge von Waschungen in Thylakoid- und Überstandsfractionen quantifiziert. Um überschüssige Proteine, die nicht an die Thylakoidmembran gebunden haben, zu entfernen, wurden zwei Waschschrte durchgeführt. Im Anschluss wurden die Thylakoide bis zu viermal gewaschen (Abbildung 3.22). Aus dem in Abbildung 3.22 dargestellten Autoradiogramm lässt sich ableiten, dass mit jeder Waschung 3 – 5 % des zugegebenen TatA-Proteins extrahiert werden. Insgesamt liegt der im Überstand gemessene TatA-Anteil bei 18 %. Für das zum Vergleich eingesetzte TatB hingegen liegt der in Überstandsfractionen errechnete Proteinanteil bei 7 %. Auch, wenn die Ergebnisse dieses Versuchs die in den Transportexperimenten beobachteten Phänomene scheinbar nicht vollständig erklären können, zeigt sich, dass TatA im Vergleich zu TatB effizienter aus der Thylakoidmembran extrahiert wird.

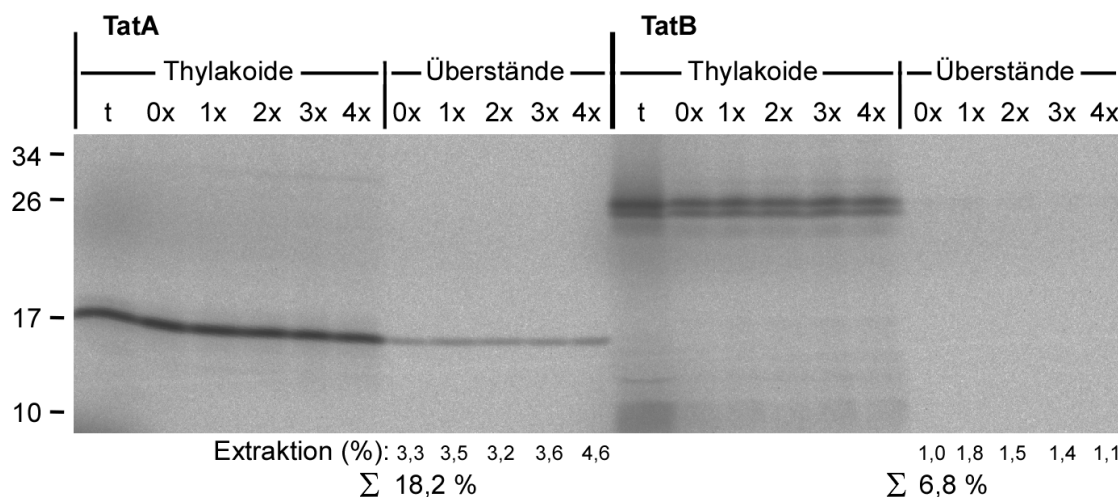


Abbildung 3.22: Untersuchungen zur Extraktion von TatA und TatB aus Thylakoidmembranen in Folge von Waschungen. Chloroplasten, entsprechend 525 µg Chlorophyll, wurden lysiert und pelletiert. Die in 550 µl HM-Puffer resuspendierten Thylakoide wurden 5 min mit 50 µl TatA (*Wheat germ extract*) bzw. TatB (*Rabbit Reticulocyte Lysate System*) aus *P. sativum* inkubiert und zur Entfernung überschüssiger Proteine zweifach bei 10.000 rpm (Heraeus Biofuge Fresco) 10 min zentrifugiert und in HM-Puffer aufgenommen. Im Anschluss wurden die Thylakoide 0- bis 4-mal gewaschen. Von jeder Waschung wurden Thylakoide und Überstände aufbewahrt, wobei letztere zur Abtrennung kontaminierender Thylakoide bei 13.000 rpm 10 min zentrifugiert wurden. Die Proben wurden entsprechend einer Chlorophyllmenge von 6 µg via SDS-PAGE (10 – 17,5%ige PAA-Gele) aufgetrennt. Um die Auftragung stöchiometrischer Mengen zu gewährleisten wurde vorerst der Chlorophyllgehalt der Thylakoidfraktionen einzelner Waschstadien nachbestimmt. Die relativen Proteinmengen von TatA und TatB (in Thylakoide und Überständen) wurden quantifiziert. Die in den Überständen vorliegende relative Proteinmenge ist unter dem Autoradiogramm angegeben (Extraktion (%)).

3.4.2 Die TatA-Menge ist in der TatB-vermittelten Rekonstitution des Tat-Transports limitiert

Da die aus Abbildung 3.20 und Abbildung 3.22 gewonnenen Ergebnisse nahelegen, dass intrinsisches TatA durch Waschungen im *in thylakoido*-Versuch partiell aus der Thylakoidmembran extrahiert wird und somit im Tat-Transport limitiert ist, wurden TatB-Rekonstitutionen unter Zugabe von TatA durchgeführt.

In drei unabhängigen Versuchen wurden unbehandelte Thylakoide mit HM-Puffer (con) und je 0,5 μM TatB, TatA oder der als inaktiv beschriebenen Proteinvariante TatA,E10C (Hauer et al., 2013) versetzt. Die mit TatB-spezifischem Antikörper behandelten Thylakoide wurden zum einen einzeln mit 0,5 μM TatB, TatA und TatA,E10C oder in Doppelansätzen mit TatB und TatA bzw. mit TatB und TatA,E10C versetzt. Die Endkonzentration der Einzelproteine lag bei 0,5 μM . Der anschließende Transport von pOEC16 wurde 10 min durchgeführt. Das Autoradiogramm eines Versuchs ist in Abbildung 3.23 A exemplarisch dargestellt. Die Mittelwerte der relativen Transportraten aller durchgeführten Versuche sind in Abbildung 3.23 B dargestellt.

Die Signalintensitäten des maturen Proteins aller proteasebehandelten Reaktionen wurden hier stets auf die unbehandelte Kontrollreaktion (con) bezogen. Für jede Transportprobe der unbehandelten Thylakoide zeigt sich im Vergleich zur Kontrollreaktion eine erhöhte Transportrate. Bei Betrachtung der Standardabweichungen wird jedoch deutlich, dass nur für TatA-behandelte Thylakoide (TatA) eine Steigerung der Transportrate, die bei Beachtung der Fehlergrenzen oberhalb der Kontrollreaktion liegt, beobachtet werden kann (siehe Abbildung 3.23 B).

Nach TatB-Zugabe zu anti-TatB-behandelten Thylakoiden liegt die Rekonstitution des Transports bei 35 %. Werden TatA bzw. TatA,E10C in Einzelansätzen zu anti-TatB-behandelten Thylakoiden hinzugegeben, ist die gemessene Akkumulation von mOEC16 marginal.

Wenn TatA und TatB gemeinsam im Reaktionsansatz vorliegen (TatB + TatA), wird im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (con) eine Transportrate von 115 % erreicht. Bei der gemeinsamen Inkubation von TatA,E10C und TatB (TatB + A,E10C), liegt die relative Transportrate mit 17 % eher in einer zur TatB-Rekonstitution vergleichbaren Größenordnung.

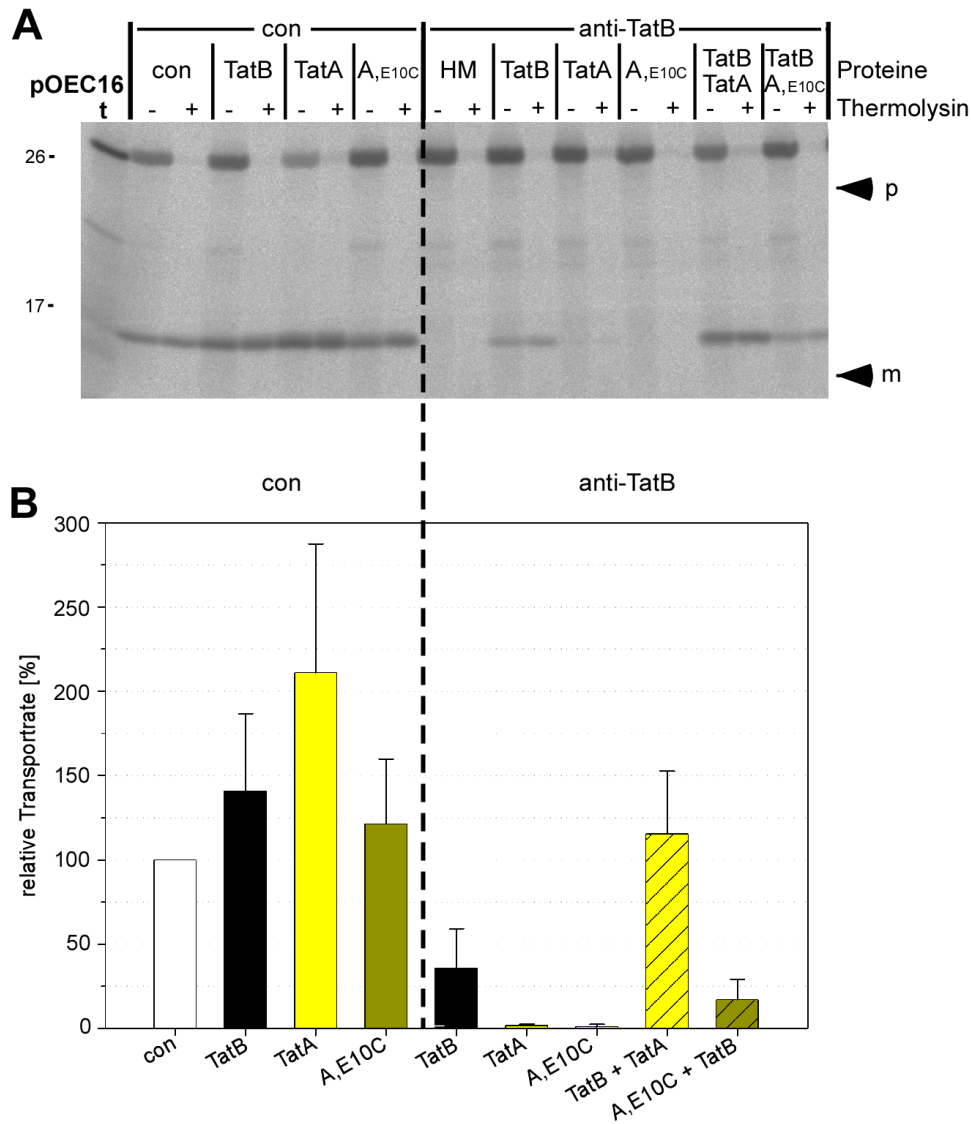


Abbildung 3.23: Rekonstitution des Tat-Transports anti-TatB-behandelter Thylakoide mit TatB unter Zugabe von TatA und TatA,E10C. (A) Unbehandelte Thylakoide wurden mit je 0,5 μM TatB (*P. sativum*), TatA (*A. thaliana*) und TatA,E10C (*A. thaliana*) vorinkubiert. Die Rekonstitutionsproben wurden vor Transportreaktion mit je 0,5 μM TatB, TatA und TatA,E10C und in Doppelsätzen mit TatB und TatA (TatB + TatA) sowie mit TatB und TatA,E10C (TatB + A,E10C) versetzt, wobei die Endkonzentration der Einzelproteine bei 0,5 μM lag. Der anschließende Transport von pOEC16 (5 μl) erfolgte 10 min. (B) Die relative Menge des transportierten Substrats (m) wurde auf die Transportreaktion unbehandelter Thylakoide (con) bezogen (n = 3). Weitere Details zum in thylakoido-Rekonstitutionsversuch sind Abbildung 3.3 zu entnehmen.

Die erzielten Ergebnisse verdeutlichen, dass durch Zugabe von TatA die Transportrate der TatB-vermittelten Rekonstitution gesteigert werden kann. Es liegt ein Steigerungsfaktor von 3,3 vor: Mit der TatB-vermittelten Rekonstitution wird eine Transportrate von 35 % erreicht, die nach Zugabe von TatA auf 115 % gesteigert wird. Die Transportrate unbehandelter Thylakoide (con: 100 %) hingegen wird durch TatA-Zugabe (TatA, rel. con: 210 %) lediglich 2,1-fach gesteigert. Die Unterschiede in der TatA-vermittelten Steigerung der Transportrate hängen wahrscheinlich mit der gewählten Transportzeit zusammen. Während der Tat-

Transport von pOEC16 bei TatB-rekonstituierten Thylakoiden im Zeitraum von 0 – 20 min linear verläuft (TatB) und im gesamten zeitlichen Verlauf keine Verlangsamung der Akkumulation des maturen Proteins ersichtlich ist, ist für den 10-minütigen Transport unbehandelter Thylakoide (con) bereits eine Verringerung der Transportrate erkennbar (siehe Abbildung 3.15).

Aus den in Abbildung 3.23 B dargestellten Transportraten lässt sich ableiten, dass die TatB-vermittelte Rekonstitution durch TatA-Zugabe erhöht wird und dabei mit dem Transport der unbehandelten Kontrollreaktionen (con) vergleichbar ist. Die Daten legen nahe, dass die Steigerung der Transportrate dabei auf einen Ausgleich des TatA-Defizits, das durch Waschungen der Thylakoide hervorgerufen wird, zurückzuführen ist.

3.5 TatB kann im *in thylakoido*-Transport die Funktion von TatA übernehmen

3.5.1 Rekonstitution des Tat-Transports anti-TatA-behandelter Thylakoide mit TatB

Wie bereits aus Abbildung 3.23 hervorgeht, ist TatA nicht befähigt den Tat-Transport anti-TatB-behandelter Thylakoide zu rekonstituieren. Der reverse Versuch zur Analyse der TatB-vermittelten Rekonstitution des Tat-Transports TatA-blockierter Thylakoide wird in diesem Kapitel erstmalig betrachtet. Zur Analyse der Rekonstitutionsfähigkeit von TatA und TatB wurden beide Proteine in drei unabhängigen *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuchen mit anti-TatA- und anti-TatB-behandelten Thylakoiden untersucht (Abbildung 3.24).

Die Mittelwerte der in Abbildung 3.24 B dargestellten Transportraten unbehandelter Thylakoide (con) und anti-TatB-behandelter Thylakoide (anti-TatB) sind identisch zu Abbildung 3.23 B und wurden bereits in Kapitel 3.4.2 beschrieben.

Wenn intrinsisches TatA blockiert ist, zeigt sich, dass TatB interessanterweise zu einer Transportrekonstitution befähigt ist. Dass TatB die TatA-Funktion teilweise ersetzen kann, wurde in allen Versuchen beobachtet, wobei sich eine durchschnittliche Transportrate von 60 % im Vergleich zur Kontrollreaktion (con) ergab (Abbildung 3.24 B). Dieser Wert übersteigt sogar den Mittelwert der TatB-vermittelten Rekonstitution: Bei Verwendung von Thylakoiden, die mit TatB-spezifischem Antikörper inkubiert wurden, liegt die Transportrate nach TatB-Rekonstitution in den durchgeführten Versuchsreihen der Abbildung 3.24 B bei durchschnittlich 35 %.

Die Transportraten nach TatA-vermittelter Rekonstitution anti-TatA-behandelter Thylakoide liegen im Vergleich zu Kontrollreaktionen (con) bei ca. 155 %. Werden TatA und TatB in Doppelansätzen eingesetzt (TatA + TatB), wird im Vergleich zu Kontrollreaktionen eine durchschnittliche Transportrate von 180 % erreicht. Während TatB,E10C nicht aktiv ist (Anhang 12), zeigt sich, dass TatA,E10C zur Rekonstitution des Transports anti-TatA-behandelter Thylakoide befähigt ist (Mittelwert der relativen Transportrate: 18 %). Diese Beobachtung bildet einen Gegensatz zur in Hauer et al. (2013) gemessenen Nullaktivität des Proteins. Ursächlich für diesen Gegensatz ist wahrscheinlich die Verwendung unterschiedlicher Substrate und Transportzeiten. Während in Hauer et al. (2013) das Substrat 16/23, welches ein retardiertes Transportverhalten aufzeigt, 2 min transportiert wurde, wurde hier pOEC16 10 min transportiert.

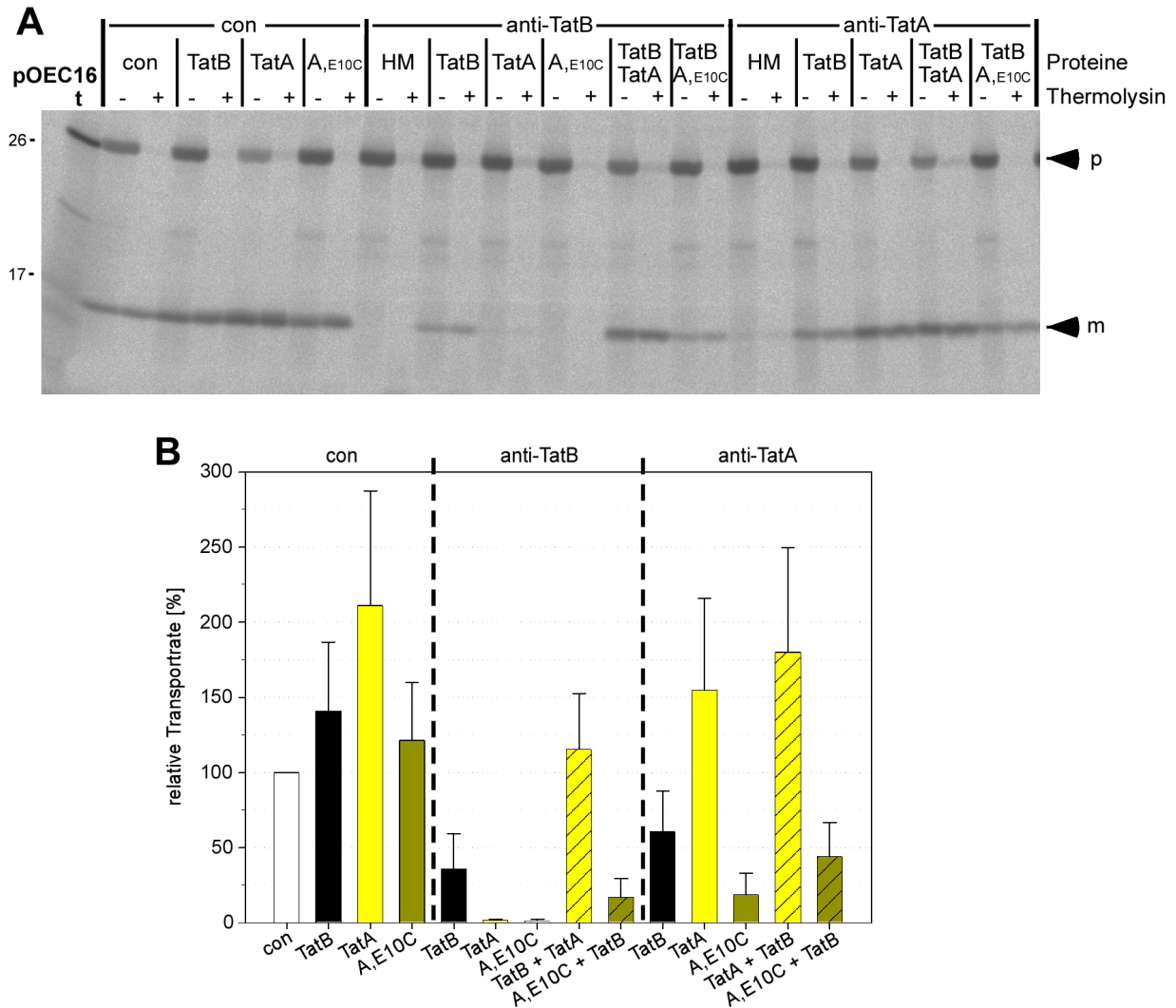


Abbildung 3.24: Rekonstitution des Tat-Transports anti-TatB und anti-TatA-behandelter Thylakoide mit gereinigtem TatB aus *P. sativum*, TatA und TatA,E10C aus *A. thaliana*. (A) Unbehandelte Thylakoide, entsprechend 30 μg Chlorophyll, wurden mit je 0,5 μM TatB, TatA und TatA,E10C vorinkubiert (con). Die Rekonstitutionsreaktionen anti-TatB- bzw. anti-TatA-behandelter Thylakoide wurden mit TatB, TatA und TatA,E10C sowie in Doppelansätzen mit TatA + TatB, und mit TatA,E10C + TatB versetzt. Die Endkonzentration der Einzelproteine lag bei 0,5 μM . Der anschließende Transport von pOEC16 (5 μl) erfolgte 10 min. (B) Die relative Menge des transportierten Substrats (m) jeder Probe wurde auf die Transportreaktion unbehandelter Thylakoide (con) bezogen ($n = 3$). Für TatA,E10C bzw. TatA,E10C + TatB bei anti-TatA-Behandlung ist $n = 2$. Weitere Informationen zum *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuch sind Abbildung 3.3 zu entnehmen.

Wird TatA,E10C in Doppelansätzen mit TatB für Transportreaktionen mit anti-TatA-behandelten Thylakoiden eingesetzt, ist keine Steigerung der TatB-vermittelten Rekonstitution des Tat-Transports erkennbar (TatA,E10C + TatB).

Dass TatB zur Rekonstitution des Tat-Transports anti-TatA-behandelter Thylakoide befähigt ist, ist eine völlig neue Beobachtung. Als Dabney-Smith et al. (2003) erstmalig den *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuch mit anti-TatA-behandelten Thylakoiden durchführten, konnte mit *in vitro* synthetisiertem TatB keine Transportrekonstitution erwirkt werden. Diese

divergenten Ergebnisse für gereinigtes und *in vitro* synthetisiertes TatB werden in Kapitel 4.6.3 diskutiert.

3.5.2 *TatA und TatB rekonstituieren den Tat-Transport NaBr-behandelter Thylakoide*

Um festzustellen, ob TatB auch unabhängig vom Antikörper-basierten *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuch eine TatA-Funktion übernehmen kann, wurden Thylakoide vor Zugabe von TatA bzw. TatB mit Natriumbromid (NaBr) behandelt. Frielingsdorf et al. (2008) stellten fest, dass TatA durch Inkubation mit dem chaotropen Salz partiell aus der Thylakoidmembran entfernt wird, wobei das resultierende TatA-Defizit den Tat-Transport von 16/23 stark einschränkt. Diese Transportreduktion ist jedoch durch Zugabe von TatA reversibel. Der TatBC-Rezeptorkomplex ist wiederum auch nach Behandlung mit NaBr in der Lage Vorläuferproteine zu binden und wird somit nicht in seiner Funktion beeinträchtigt. Eine Western Blot-Analyse von Frielingsdorf et al. (2008) bestätigte, dass TatB und TatC im Vergleich zu TatA durch NaBr-Behandlung kaum aus der Thylakoidmembran herausgelöst werden und somit stärker gebunden in der Membran vorliegen. Auch in dieser Arbeit wurde die NaBr-vermittelte Extraktionseffizienz von TatA und TatB aus Thylakoidmembranen untersucht. Dabei wurden in Abbildung 3.28 Thylakoide mit *in vitro* synthetisiertem TatA bzw. TatB inkubiert und anschließend mit Lösungen chaotroper Salze und basischem pH behandelt. Für NaBr zeigte sich, dass bei Verwendung von 0,2 und 0,6 M 30 – 38 % TatA aus der Membran herausgelöst werden. TatB wird allerdings nur zu 4 – 5 % aus der Membran extrahiert.

Bevor untersucht werden konnte, ob TatA und auch TatB den Tat-Transport NaBr-behandelter Thylakoide wiederherstellen können, wurde mittels einer NaBr-Konzentrationsreihe die geeignete Salzkonzentration bestimmt (Anhang 13). Der Versuch ergab, dass im Rahmen einer sukzessiven Konzentrationserhöhung von 0,2 M auf 1 M ab einer NaBr-Konzentration von 0,4 M eine gleichbleibende Transportrate von 10 – 12 % für pOEC16 ermittelt werden konnte. Da sich die Anwendung chaotroper Salze generell auf die Integrität der Thylakoidmembranen auswirkt, wurde für den folgenden Versuch die niedrigste NaBr-Konzentration gewählt, die zu einer deutlichen Transportreduktion führt. Demzufolge wurden die Thylakoide im Rekonstitutionsversuch mit 0,4 M NaBr behandelt und vor dem Transport von pOEC16 mit 0,5 μ M und 1 μ M TatA bzw. TatB versetzt (Abbildung 3.25).

3.6 TatAB-Chimären zur Identifizierung funktionell wichtiger Bereiche in den Proteinen TatA und TatB

Die in Kapitel 3.5 dargelegten Ergebnisse implizieren, dass TatB eine TatA-Aktivität aufweist. Mit Hilfe des in Kapitel 3.5.2 beschriebenen Versuchs wurde außerdem nachgewiesen, dass es sich bei dem beobachteten Phänomen nicht um ein Artefakt des antikörperbasierten *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuchs handelt.

Nun stellt sich die Frage, aus welchem Grund TatB eine TatA-Funktion aufweist, während TatA keine TatB-Funktion erfüllen kann. Obwohl TatA und TatB eine generelle Ähnlichkeit aufweisen, zeigen sich Unterschiede im Aufbau. Die unstrukturierte C-terminale Region von TatB ist im Vergleich zu TatA verlängert (siehe Abbildung 1.3 und Abbildung 3.26). Des Weiteren ergeben sich Unterschiede in den Aminosäuresequenzen der konservierten Helices von TatA und TatB aus *P. sativum*. So sind die Aminosäuresequenzen der Transmembranhelices zu 54 % identisch, bei den amphipathischen Helices ergibt sich eine Sequenzidentität von 38 % (berechnet auf Basis des Sequenzvergleichs in Abbildung 3.26 A). Mit Hilfe der chimären Tat-Proteine TatAB und TatBA sollte nun analysiert werden, welcher strukturelle Bereich von TatB für die Ausbildung der TatB-Aktivität relevant ist und ob diese erreicht werden kann, obwohl bestimmte Bereiche auf der Aminosäuresequenz von TatA basieren. Des Weiteren wurde analysiert, ob die Tat-Chimären eine TatA-Aktivität aufweisen. Bei TatAB handelt es sich um TatB, welches N-Terminus, Transmembranhelix und einen Teil der *hinge*-Region von TatA beinhaltet. Der TatA-Anteil des TatAB-Proteins wird im Folgenden als TatA-TMH-Region und der TatB-Anteil als TatB-APH-Region bezeichnet. TatBA stellt die reverse Chimäre dar: Hier wurde die TatB-TMH-Region mit der TatA-APH-Region kombiniert. (schematische Darstellung in Abbildung 3.26 B).

Die codierende Sequenz der chimären Proteine TatAB und TatBA wurden in die Vektoren pET30a und pBAT kloniert. Die Proteine wurden analog zu Abbildung 3.4 ausgehend vom pET30a-Vektor in *E. coli* synthetisiert und gereinigt bzw. in Anwesenheit von ³⁵S-Methionin *in vitro* synthetisiert (pBAT). Da die Methode zur TatB-vermittelten Rekonstitution mit TatB aus *P. sativum* im homologen System etabliert wurde, wurden auch die chimären Tat-Proteine auf Basis der Aminosäuresequenzen der Proteine aus Erbse generiert.

Bevor *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuche mit anti-TatA und anti-TatB-behandelten Thylakoiden durchgeführt wurden, wurden die potentielle Assemblierung der TatAB-

Chimären in thylakoidäre TatBC-Komplexe mittels *Blue Native*-PAGE analysiert. Außerdem wurde die Stabilität der Membranintegration der chimären Proteine untersucht.

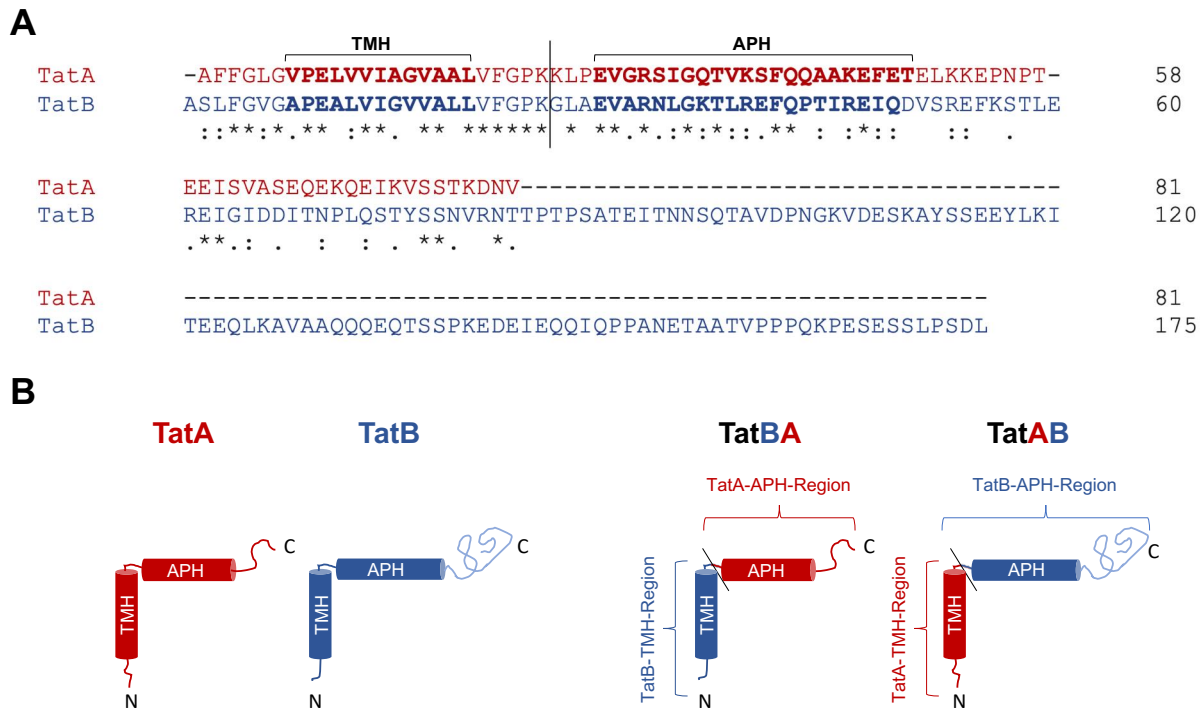


Abbildung 3.26: Aufbau von TatA, TatB und TatAB-Chimären aus *P. sativum*. (A) Aminosäuresequenzvergleich von TatA und TatB aus *P. sativum*. Das Alignment wurde mit Hilfe von Clustal Omega erstellt. Die helikalen Bereiche beider Proteine sind hervorgehoben: Transmembranhelix (TMH; TatA und TatB) und amphipathische Helix (APH; TatA und TatB). Die Einteilung der strukturellen Bereiche orientierte sich für TatA an der NMR-Struktur von TatA aus *A. thaliana* nach Petterson et al. (2018) und für TatB an der NMR-Struktur des *E. coli*-Proteins (Zhang et al., 2014a). Hierbei ist zu beachten, dass insbesondere für TatB aus *P. sativum* Länge und Position der APH und möglicher zusätzlicher löslicher Helices abweichen können, da mit Hilfe des *Onlinetools* Phyre 2 nach der TMH bis zu Serin an Position 96 eine durchgängige α -Helix vorhergesagt wird (siehe Anhang 16). Im Sequenzvergleich werden identische Aminosäuren (*), Aminosäuren mit sehr ähnlichen chemischen Eigenschaften (:), Aminosäuren mit weniger ähnlichen Eigenschaften (.) markiert. Die vertikale Linie trennt die Sequenzbereiche von Tata bzw. TatB, die zur Erstellung der chimären Proteine TatAB und TatBA kombiniert wurden. (B) Schematische Darstellung von TatA, TatB, TatBA und TatAB. Zur Erstellung chimärer Konstrukte wurden N-Terminus, TMH und ein der *hinge*-Region zugeordneter Anteil von TatA bzw. TatB ausgetauscht. Dieser Bereich wird als Tata-TMH bzw. TatB-TMH-Region bezeichnet und wird durch eine Linie von einem Anteil der *hinge*-Region, APH und der unstrukturierten C-terminalen Region getrennt. Diese Region wird als Tata-APH- bzw. TatB-APH-Region bezeichnet. Bei TatAB handelt es sich somit um TatB mit TMH-Tata-Region. TatBA ist die reverse Chimäre. Hier liegt TatA mit TMH-TatB-Region vor.

3.6.1 SDS-PAGE- und Blue Native-PAGE-Analyse thylakoidgebundener TatAB-Chimären

Eine *Blue Native*-PAGE-Analyse könnte Hinweise zur Funktionsausrichtung der TatAB-Chimären ermöglichen, da die authentischen Proteine TatA und TatB hier unterschiedliche Verhalten zeigen. Während TatB als Untereinheit des Rezeptorkomplexes in TatBC-Komplexe assembliert, wurde für TatA keine Komplexbildung im Bereich von 560 und 620 kDa gezeigt (Jakob et al., 2009).

Um nun die chimären Proteine hinsichtlich der Assemblierung in TatBC-Komplexe zu analysieren, wurden diese und auch TatA und TatB in Anwesenheit von ^{35}S -Methionin *in vitro* synthetisiert, 5 min mit Thylakoiden inkubiert und anschließend mittels SDS-PAGE und *Blue Native*-PAGE analysiert.

In Abbildung 3.27 A zeigt sich, dass TatA, TatB, TatAB und TatBA allesamt an die Thylakoidmembran binden (Spuren t). TatA und TatBA weisen ein apparentes Laufverhalten von ca. 14 kDa auf, wohingegen TatAB und TatB bei ca. 24 kDa migrieren.

Für die *Blue Native*-PAGE-Analyse der Tat-Chimären wurden neben TatA und TatB auch pOEC16 und 16/23 vor Solubilisierung der Thylakoidmembranen mit Thylakoiden inkubiert. Dabei binden die Tat-Komplexe die Substrate 16/23 und pOEC16 (Abbildung 3.27 B, *). TatB assembliert in TatBC-Komplexe, die eine geringere Größe als die substratbindenden Komplexe aufweisen (*, siehe zum Vergleich Abbildung 3.8). Für TatBA sind ebenfalls zwei definierte Komplexe, die eine höhere Mobilität aufweisen als TatB-markierte TatBC-Komplexe, sichtbar (*). Diese Komplexbanden konnten in einem Wiederholungsversuch reproduziert werden (siehe Anhang 14: *). Bei Betrachtung von TatAB zeigt sich ein diffuses Signal mit einer zu den TatBA-Komplexen vergleichbaren Größe, das nicht reproduziert werden konnte (siehe Anhang 14). Für TatA ist in dieser Größenordnung ein ähnlich diffuses Signal erkennbar (°).

Unterhalb einer Laufhöhe von 460 kDa können für alle Tat-Proteine weitere Signale identifiziert werden, wobei die Banden für TatA und TatAB bzw. TatBA und TatB jeweils vergleichbare Laufverhalten zeigen. Die Banden könnten wiederum an Proteinkomplexe assoziierte Proteine repräsentieren. Bei den diffusen Banden, die in der Nähe der Lauffront sichtbar sind, könnte es sich um oligomere Tat-Proteine handeln (Ma et al., 2018).

Für die Charakterisierung der Tat-Chimären sind jedoch die definierten Banden (*), die eine höhere Mobilität als TatB-markierte TatBC-Komplexe (*) aufweisen, interessanter. Somit kann aufgrund der charakteristischen Komplexbildung vermutet werden, dass TatBA im

in thylakoido-Rekonstitutionsversuch eine TatB-Funktion aufweist. Das Laufverhalten von TatAB (°) ist zu TatA (°) vergleichbar und impliziert vermutlich eine TatA-Funktion.

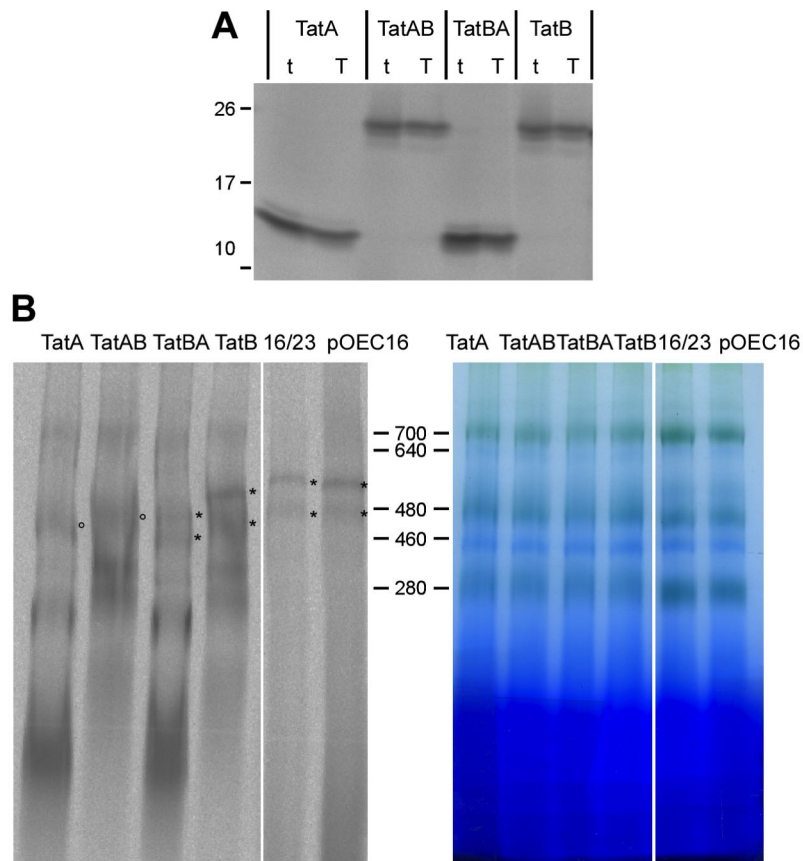


Abbildung 3.27: Membranbindung und -integration von *in vitro* synthetisiertem und radioaktiv markiertem TatA, TatB, TatAB und TatBA. Frisch präparierte Thylakoide, entsprechend 60 µg Chlorophyll, wurden mit je 10 µl TatA, TatAB, TatBA, TatB, 16/23 bzw. pOEC16 versetzt und 5 min auf Eis inkubiert. TatAB und TatB lagen zur radioaktiven Markierung mit der Punktmutation V245M vor. Die Aminosäuresequenz von TatA und TatBA wurde C-terminal um ein Methionin erweitert. Zur *in vitro*-Synthese wurde für TatAB, TatB, pOEC16 und 16/23 *Rabbit Reticulocyte Lysate System* verwendet. TatA und TatBA wurden mittels *Wheat germ extract* synthetisiert. Die Proben wurden zweifach gewaschen, jedoch nicht mit Thermolysin behandelt (siehe Abbildung 3.3). **(A)** Thylakoidfraktionen (T) von TatA, TatAB, TatBA und TatB, entsprechend 15 µg Chlorophyll, wurden über ein 15%iges SDS-PAA-Gel aufgetrennt und via Autoradiographie visualisiert. In den Spuren t wurden die Translationen der Proteine im stöchiometrischen Verhältnis zu den Proben T aufgetragen. **(B)** 45 µg des Thylakoidmaterials wurden mittels *Blue Native*-PAGE aufgetrennt. Links ist das Autoradiogramm des Gels dargestellt. Rechts abgebildet ist das ungefärbte *Blue Native*-Gel. Weitere Details zur *Blue Native*-PAGE sind Abbildung 3.8 zu entnehmen.

3.6.2 Membranstabilität der TatAB-Chimären

Um zu analysieren, wie stabil die TatAB-Chimären im Vergleich zu TatA und TatB in der Thylakoidmembran gebunden vorliegen, wurde ermittelt, wie effizient die Proteine mit Hilfe von chaotropen Salzen und basischem pH aus der Thylakoidmembran herausgelöst werden. Somit wurden die Proteine TatA, TatB, TatAB und TatBA in Anwesenheit von ^{35}S -Methionin

in vitro synthetisiert, mit Thylakoiden versetzt und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Thylakoide zweimal gewaschen, fraktioniert und dann 30 min mit HM-Puffer oder mit HM-Puffer unter Zusatz von 0,2 M bzw. 0,6 M NaBr, 1 M Harnstoff oder 0,1 M Na₂CO₃ (pH 11,4) inkubiert (Abbildung 3.28). Dabei wurde die Inkubation der Thylakoide mit HM-Puffer als Kontrollbehandlung durchgeführt. Die verwendeten Additive zielen auf die Extraktion von Proteinen ab, die peripher an die Membran assoziiert sind. Hierbei werden u. a. elektrostatische Wechselwirkungen (NaBr, Na₂CO₃) sowie auch hydrophobe Wechselwirkungen (Harnstoff) von Proteinen beeinträchtigt (Schook et al., 1979; Fujiki et al., 1982a; Scherer et al., 1992 und 1996).

Nach der Behandlung wurden die Thylakoide zentrifugiert und die Überstände aufbewahrt. Vor Auftrennung der Fraktionen via SDS-PAGE (Abbildung 3.28 A) wurden die Überstände zur Entfernung kontaminierender Thylakoide erneut zentrifugiert. Zur vergleichenden Auswertung der Stabilität der Membranbindung der Proteine wurde die Proteinverteilung von TatA, TatB, TatAB und TatBA nach jeweiliger Behandlungsmethode in den Sediment- (Thylakoid) und Überstandfraktionen ermittelt (Abbildung 3.28 B).

Bei Betrachtung des Diagramms in Abbildung 3.28 B fällt auf, dass nach Kontrollbehandlung mit HM-Puffer eine erhöhte Extraktion von TatBA (14 %) nachgewiesen werden konnte. Trotz dieser Abweichung erlaubt dieser Einzelversuch Aussagen zur Membranstabilität der Tat-Chimären.

Im Allgemeinen lässt sich ableiten, dass TatA und TatBA effizienter extrahiert werden als TatB und TatAB. Bei Betrachtung von TatA und TatBA fällt auf, dass nach Behandlung der Thylakoide mit 0,2 M und 0,6 M NaBr durchschnittlich 30 % des jeweiligen Proteins der Überstandfraktion zugeordnet werden können, wobei die maximal extrahierte Proteinmenge für TatA bei ca. 40 % liegt. TatAB und TatB werden bei Verwendung von NaBr hingegen nur zu maximal 5 % aus der Thylakoidmembran extrahiert.

Wird Harnstoff eingesetzt, wird TatA mit einem Anteil von 24 % im Überstand detektiert. TatBA und TatAB werden nach Harnstoffzugabe im ähnlichen Mengenverhältnis aus der Membran extrahiert. TatB zeigt die höchste Resistenz bei Harnstoffbehandlung.

Wenn Thylakoide mit basischem pH behandelt wurden (0,1 M Ca₂CO₃), wird für TatA mit 30 % die höchste Extraktionseffizienz gemessen. Während für TatBA ein Proteinanteil von 12 % im Überstand ermittelt wurde, wurden TatAB und TatB nur zu ca. 5 % extrahiert.

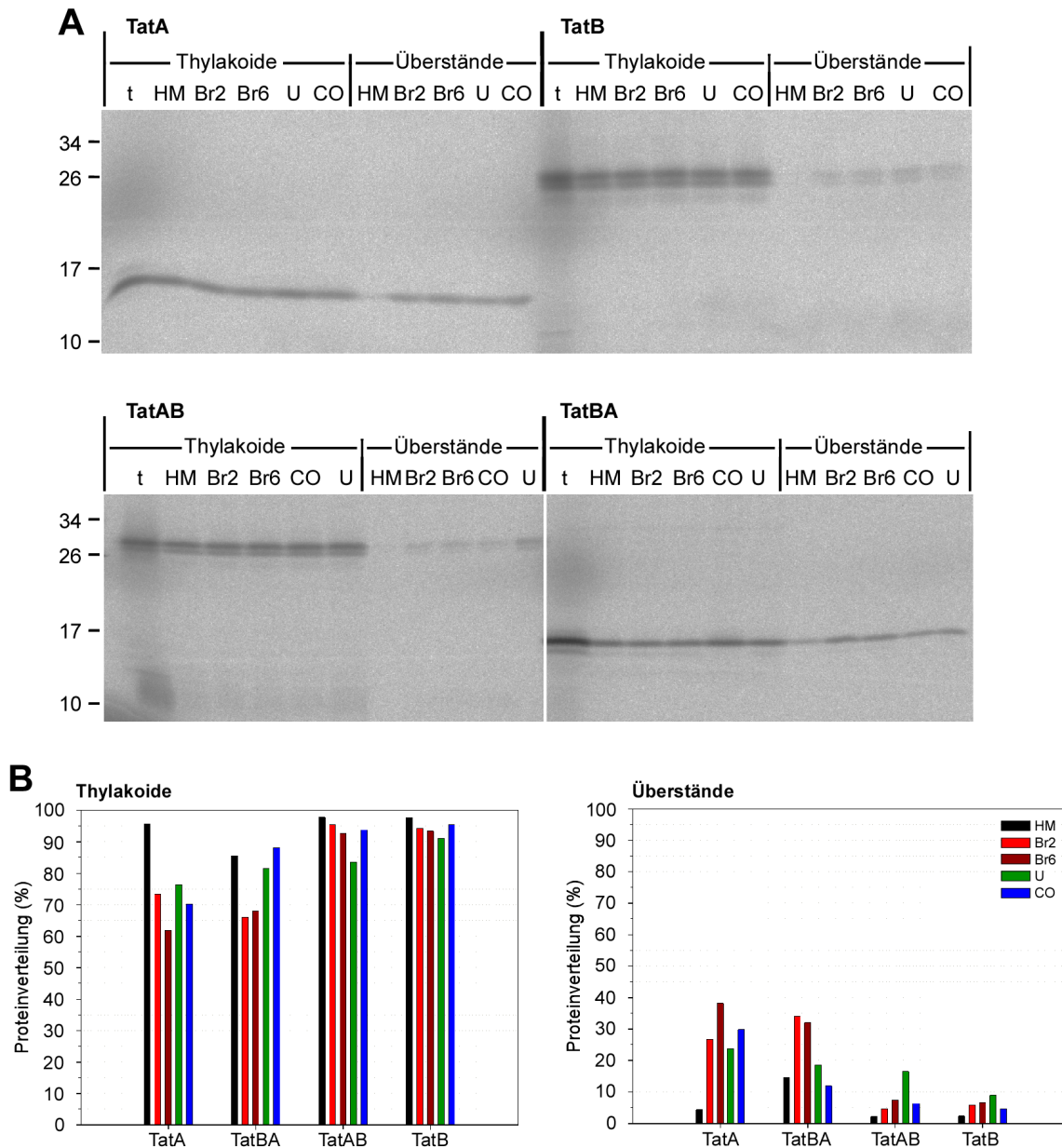


Abbildung 3.28: Membranstabilität von TatA, TatB, TatAB und TatBA. (A) Die Proteine TatA, TatB, TatAB und TatBA wurden analog zu Abbildung 3.27 mittels *Rabbit Reticulocyte Lysate System* (TatAB und TatB) bzw. *Wheat germ extract* (TatA und TatBA) in Anwesenheit von ^{35}S -Methionin *in vitro* synthetisiert. 200 μl frisch präparierte Thylakoide, entsprechend 150 μg Chlorophyll, wurden mit jeweils 25 μl Translation versetzt. Die Ansätze wurden 5 min auf Eis inkubiert und zweifach gewaschen. Im Anschluss wurden die Thylakoide entsprechend 30 μg Chlorophyll fraktioniert und in je 50 μl HM-Puffer (HM), 0,2 M (Br2) bzw. 0,6 M (Br6) Natriumbromid, 1 M Harnstoff (U) oder 0,1 M Na_2CO_3 (CO) aufgenommen. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Thylakoide 5 min bei 10.000 rpm (Heraeus Biofuge Fresco) zentrifugiert, wobei die abgenommenen Überstände zur Entfernung kontaminierender Thylakoide erneut 10 min bei 10.000 rpm sedimentiert wurden. Danach wurden die Thylakoid- und Überstandfraktionen entsprechend 15 μg Chlorophyll mit 10 – 17,5 % - igen SDS-PAA-Gelen aufgetrennt und via Autoradiographie visualisiert. 2 μl Translation (t) des jeweiligen Proteins wurden als Kontrolle aufgetragen. (B) Die Signale in den beiden Fraktionen (Thylakoide und Überstände) wurden quantifiziert. Die Verteilung der Proteine in Thylakoid- und Überstandsfractionen ist graphisch dargestellt. Es handelt sich um einen Einzelversuch.

Die erzielten Ergebnisse legen nahe, dass TatBA mit zu TatA vergleichbarer Effizienz aus der Thylakoidmembran herausgelöst wird. Im Gegensatz zu TatBA weist TatAB eine erhöhte Resistenz gegenüber der Behandlung mit NaBr und Na₂CO₃ auf. Dennoch liegt die durch Harnstoff vermittelte Extraktion für die chimären Proteine in einer vergleichbaren Größenordnung. Insgesamt betrachtet, ist jedoch die Stabilität der Membranbindung von TatAB eher mit jener von TatB vergleichbar, während TatA und TatBA weniger stabil in der Membran verankert sind.

Die *Blue Native*-PAGE-Analyse der Tat-Chimären aus Abbildung 3.27 führte zu der Annahme, dass die Transmembranhelix von TatB für die Assemblierung von TatB und TatBA in TatBC-Komplexe bzw. in Komplexe, die ein zu TatBC-Komplexen vergleichbares Laufverhalten zeigen, entscheidend ist.

Die Ergebnisse des Extraktionsversuchs aus Abbildung 3.28 legen jedoch nahe, dass nicht allein die Transmembranhelix von TatB für die stabile Integration des Proteins in der Thylakoidmembran verantwortlich ist. Insbesondere die im Vergleich zu TatA verlängerte amphipathische Helix sowie auch die C-terminale Region von TatB bewirken die erhöhte Stabilität des Proteins in der Thylakoidmembran.

3.6.3 Rekonstitution des Tat-Transports anti-TatA und anti-TatB-behandelter Thylakoide mit TatAB-Chimären

Um festzustellen, ob die chimären Tat-Proteine TatAB und TatBA eine TatA- bzw. TatB-Aktivität aufweisen, wurde ein *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuch mit anti-TatA und anti-TatB-behandelten Thylakoiden durchgeführt (siehe Abbildung 3.29). Dabei wurden vor 10-minütiger Transportreaktion jeweils 0,5 µM der Proteine TatA, TatAB, TatBA und TatB aus Erbse mit Thylakoiden vorinkubiert. Für unbehandelte Thylakoide ist nach Zugabe von TatA, TatAB, TatBA oder TatB stets eine Erhöhung der Transportrate zu verzeichnen, wobei nach TatA-Zugabe mit 182 % die höchste relative Transportrate (rel. con) erreicht wird.

Die Rekonstitution des Tat-Transport anti-TatA-behandelter Thylakoide wird mit allen verwendeten Tat-Proteinen - TatA, TatAB, TatBA und TatB - erreicht. Wenn die Signalintensitäten von mOEC16 für alle Rekonstitutionsproben anti-TatA-behandelter Thylakoide auf die unbehandelte Kontrolle bezogen werden, ergeben sich relative Transportraten von über 100 %. Die maximale Transportrate liegt hier bei 166 % und wird bei

TatB-vermittelter Rekonstitution des Tat-Transports anti-TatA-behandelter Thylakoide erreicht.

Dass TatA aus Erbse nicht wie *Arabidopsis*-TatA in Abbildung 3.23 die höchste Rekonstitution des Tat-Transport bewirkt, könnte mit der im Vergleich zu *Arabidopsis*-TatA geringeren katalytischen Aktivität des Proteins zusammenhängen (Dissertation von Mandy Waclawek, 2016, siehe dort Tabelle 1). Zu dieser Annahme passt jedoch nicht, dass nach TatA-Zugabe zu unbehandelten Thylakoiden die höchste relative Transportrate beobachtet wurde.

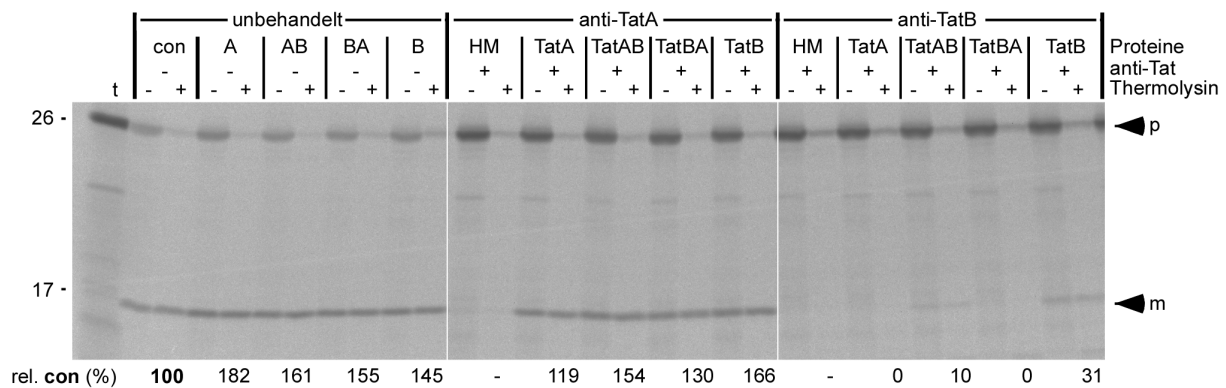


Abbildung 3.29: Rekonstitution des Tat-Transports anti-TatB und anti-TatA-behandelter Thylakoide mit gereinigten TatA, TatB, TatAB und TatBA aus *P. sativum*. Unbehandelte Thylakoide, entsprechend einer Chlorophyllmenge von 30 µg, wurden mit je 0,5 µM TatB, TatA und TatA,E10C vorinkubiert. Die Rekonstitutionsreaktionen anti-TatB- bzw. anti-TatA-behandelter Thylakoide wurden mit je 0,5 µM TatA, TatB, TatAB und TatBA versetzt, wobei die Endkonzentration der Einzelproteine bei 0,5 µM lag. Der anschließende Transport von pOEC16 (5 µl) erfolgte 10 min. Die relative Menge des transportierten Substrats (m) wurde auf die Transportreaktion unbehandelter Thylakoide (con) bezogen. Weitere Details sind Abbildung 3.3 zu entnehmen.

Wenn die TatB-Funktion inhibiert ist, sind ausschließlich TatAB und TatB zur Rekonstitution befähigt. Während TatAB zu einer Rekonstitution des Transports von 10 % führt, liegt die Transportrate nach TatB-Zugabe bei 31 %. Das Vorliegen der Transmembranhelix von TatB in der Chimäre TatBA führt also im Gegensatz zur in Kapitel 3.6.1 geäußerten Annahme nicht zur Ausbildung einer TatB-Funktion. Obwohl in der *Blue Native*-PAGE-Analyse für TatBA höhermolekulare Komplexe beobachtet wurden (Abbildung 3.27), die ein zu TatBC-Komplexen ähnliches Laufverhalten aufweisen, ist das Protein nicht zur TatB-Rekonstitution befähigt (Abbildung 3.29). Wird jedoch die Transmembranhelix von TatB in der Chimäre TatAB durch jene von TatA ersetzt, ist eine Rekonstitution des Tat-Transports anti-TatB-behandelter Thylakoide erkennbar. Somit liegt nahe, dass die APH-Region von TatB entscheidend für die Funktion des TatB-Proteins ist.

4 Diskussion

4.1 Lösliches TatB vermittelt die funktionelle Rekonstitution des Tat-Transports anti-TatB-behandelter Thylakoide

Hauptziel dieser Arbeit war die funktionelle Analyse von TatB mit Hilfe des *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuchs. Die intrinsische TatB-Funktion isolierter Thylakoide aus Erbsenkeimlingen wurde mit Hilfe eines TatB-spezifischen Antikörpers inhibiert. Die Antikörperbehandlung führte zu einer vollständigen Blockierung des Tat-Transports. Durch Zugabe von *in vitro* synthetisiertem und gereinigtem TatB konnte der Tat-Transport authentischer und chimärer Tat-Substrate in isolierten Thylakoiden wiederhergestellt werden (siehe Abbildung 3.3 und Abbildung 3.5). Im Rahmen der Arbeit wurde gezeigt, dass die TatB-vermittelte Transportrekonstitution nicht auf einer Reaktivierung des intrinsischen TatB-Proteins basiert: Als Negativkontrolle für die TatB-vermittelte Rekonstitution fungierte das TatB-Antigen. Da TatB ohne Transmembranhelix nicht in TatBC-Komplexe assemblieren kann, war hier keine Transportrekonstitution zu erwarten. Diese Annahme wurde bestätigt (siehe Abbildung 3.3, Abbildung 3.5 und schematische Darstellung in Abbildung 4.1 A). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die Zugabe des TatB-Antigens zu einer im Vergleich zu TatB erhöhten Ablösung des Antikörpers vom intrinsischen TatB-Protein führt, wobei der Tat-Transport jedoch weiterhin blockiert ist. Für anti-TatB-behandelte Thylakoide, die mit HM-Puffer oder TatB bzw. den Proteinvarianten TatB,E10C und TatB,E10A versetzt wurden, wurden hingegen vergleichsweise geringere Mengen freigesetzten Antikörpers beobachtet. So konnte ausgeschlossen werden, dass die Rekonstitution im Zusammenhang mit einer durch das zugegebene Protein vermittelten Ablösung des Antikörpers vom intrinsischen TatB-Protein steht (siehe Abbildung 3.7, Abbildung 3.14 und Anhang 11). Extern zugegebenes TatB kann die Funktion des inhibierten, endogenen Proteins ersetzen und ist zu einer funktionellen Rekonstitution des Tat-Transports befähigt (siehe Abbildung 4.1 B).

Dieser Umstand ist bemerkenswert, da TatB eine Untereinheit des heterooligomeren, integralen TatBC-Rezeptorkomplexes (560 – 620 kDa) ist (siehe Kapitel 1.4.2.2 Der TatBC-Rezeptorkomplex). Die funktionelle Rekonstitution von TatB setzt folglich die Assemblierung des Proteins in TatBC-Rezeptorkomplexe voraus. Dass extern zugegebenes TatB in TatBC-Komplexe unbehandelter Thylakoide assembliert, wurde bereits für *in vitro* synthetisiertes Protein nachgewiesen (Fincher et al., 2003, siehe auch Abbildung 3.8). In dieser Arbeit konnte

darüber hinaus gezeigt werden, dass auch TatB, das in Anwesenheit von ^{35}S -Met heterolog in *E. coli* synthetisiert und anschließend gereinigt wurde, in TatBC-Rezeptorkomplexe assembliert (siehe Abbildung 3.12).

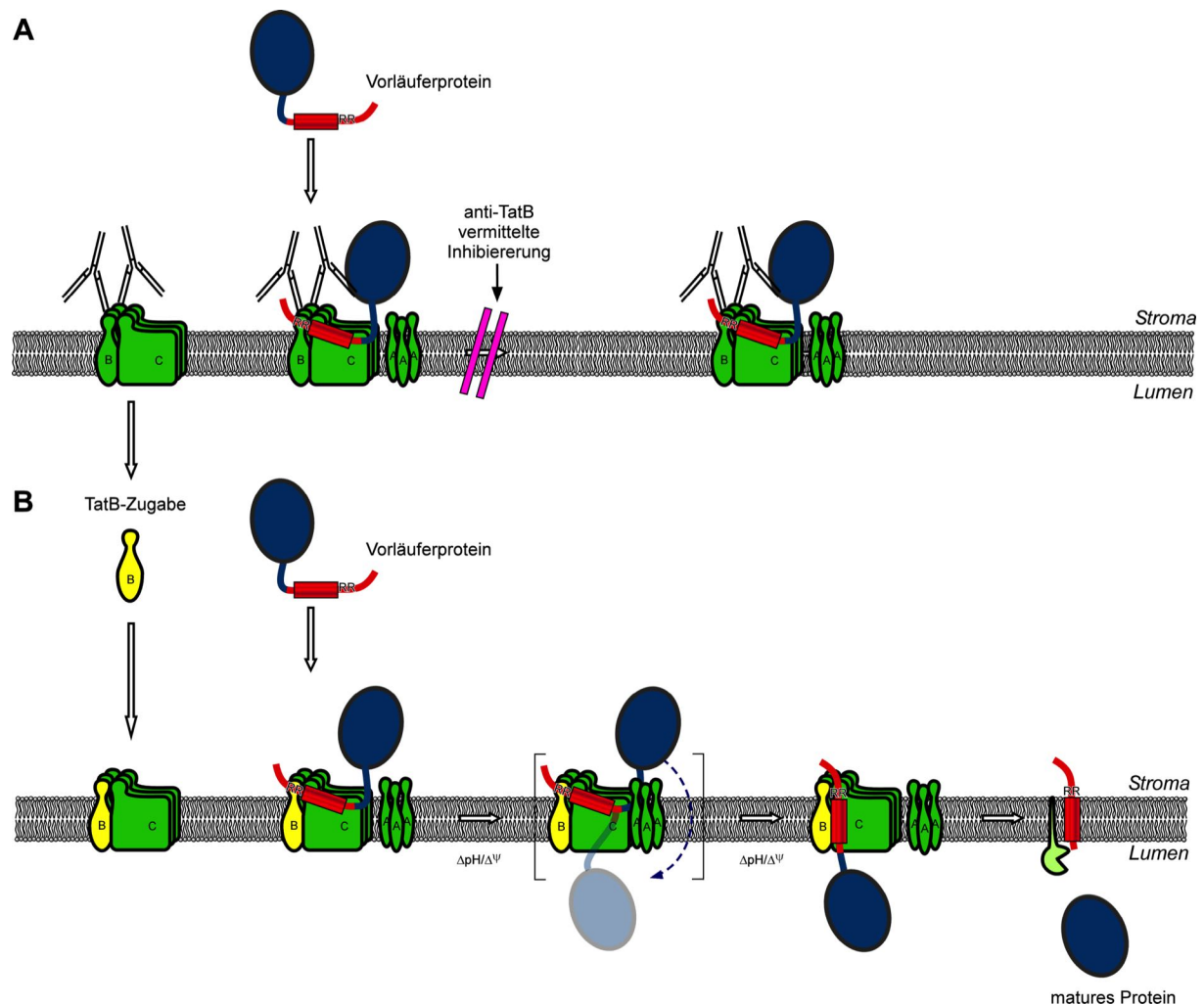


Abbildung 4.1: In thylakoido-Rekonstitution des Tat-Transports (modifiziert nach Frielingsdorf et al., 2008). **(A)** Thylakoidsuspensionen werden mit TatB-spezifischen Antikörpern versetzt. Zugegebenes Tat-Substrat (Signalpeptid in rot, matures Protein in blau) wird daher nicht in das Lumen transportiert (magentafarbene Balken). **(B)** Der Transport kann durch Zugabe von *in vitro* synthetisiertem oder gereinigtem TatB wiederhergestellt werden. Die in (B) gezeigte Rekonstitution des Tat-Transports basiert auf der Annahme, dass TatB in partiell bzw. in *de novo* assemblierte TatBC-Rezeptorkomplexe mit freiem TatC integriert. Des Weiteren ist denkbar, dass ein Austausch zwischen zugegebenem TatB und antikörpergebundenem intrinsischem TatB erfolgt. Für weitere Details zum Tat-Transport siehe Abbildung 1.4 und Kapitel 1.4.2.2: Der Mechanismus des Tat-Transports.

Die erreichte Transportrate nach TatB-vermittelter Rekonstitution anti-TatB-behandelter Thylakoide war stets geringer als die Transportrate unbehandelter Kontrollreaktionen. Die dabei erreichten relativen Transportraten für pOEC16 lagen bei Verwendung von *in vitro* synthetisiertem TatB bei 3–8 % und bei Zugabe von gereinigtem TatB bei 15–40 % (Ausnahme Abbildung 3.29; Variabilität der Transportraten wird in Kapitel 4.5 diskutiert). Die

TatA-vermittelte Rekonstitution anti-TatA-behandelter Thylakoide erfolgt allerdings quantitativ, d.h. die Transportrate nach Rekonstitution ist zu Kontrollreaktionen vergleichbar bzw. kann sogar die Transportrate unbehandelter Thylakoide übersteigen. Im Gegensatz zu TatA ist TatB Bestandteil des TatBC-Rezeptorkomplexes. So kann angenommen werden, dass das Ausmaß der TatB-Rekonstitution durch die erforderliche Assemblierung in TatBC-Komplexe limitiert ist. Um zu untersuchen, ob die TatB-vermittelte Rekonstitution durch eine zeitintensive Assemblierung von TatB limitiert ist, wurden Thylakoide vor dem Transportversuch in einem Zeitraum von 0 – 20 min mit TatB vorinkubiert (siehe Anhang 10). Da festgestellt wurde, dass eine verlängerte Vorinkubation von TatB mit antikörperbehandelten Thylakoiden nicht zur Steigerung der Transportrate nach Rekonstitution führt, kann ein zeitabhängiger Assemblierungsschritt als Ursache für die geringe Transportrekonstitution ausgeschlossen werden.

Es ist möglich, dass extern zugegebenes TatB in existierende TatBC-Komplexe assembliert, was die Verfügbarkeit freier Bindestellen im TatBC-Komplex voraussetzt. Da intrinsisches anti-TatB-behandeltes Protein im Zeitraum des *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuchs nicht degradiert wird (siehe Anhang 15), könnten potentielle Bindestellen für zugegebenes TatB zum einen in partiell assemblierten TatBC-Komplexen verfügbar sein. Zum anderen ist denkbar, dass intrinsisches TatB mit TatC *de novo* TatBC-Komplexe ausbildet, wobei freies TatC erforderlich ist. Des Weiteren ist möglich, dass intrinsisches TatB in vollständig assemblierten TatBC-Komplexen mit dem zugegebenen Protein um die Bindung an die Komplexe konkurriert. Diese Annahme lässt sich mit der für *E. coli* postulierten Dynamik der TatB-Bindung (TMH) an TatC (Positionswechsel zwischen TMH5 und TMH6) vereinen (Habersetzer et al., 2017).

Die postulierten Assemblierungsmechanismen könnten mit einem begrenzten Angebot freier Bindestellen für lösliches TatB in TatBC-Komplexen einhergehen und ursächlich für die geringe Transportrekonstitution sein. Da jedoch nach TatA-Zugabe in TatB-vermittelten Rekonstitutionsversuchen (siehe Abbildung 3.23) eine zu Kontrollreaktionen vergleichbare Transportrate erreicht wird, ist eine Limitierung der Assemblierung des zugegebenen TatB-Proteins unwahrscheinlich (weiterführende Diskussion in Kapitel 4.4).

4.2 Die Bedeutung des Glutamatrests in der TMH von TatA und TatB

Da TatB Bestandteil des TatBC-Rezeptorkomplexes ist, wird angenommen, dass die Assemblierung von TatB in TatBC-Komplexe für die Funktionalität des Proteins essentiell ist. Für authentisches TatB aus *P. sativum*, das nach *in vitro*-Synthese bzw. nach heterologer Synthese in *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuchen eingesetzt wurde, konnte die Assemblierung in TatBC-Komplexe nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.8 und Fincher et al., 2003; Abbildung 3.12). So liegt nahe, dass die Assemblierung von TatB in den Rezeptorkomplex die Fähigkeit zur Transportrekonstitution bedingt.

Dennoch wurde im Rahmen dieser Arbeit beobachtet, dass die Proteinvarianten TatB,E10C und TatB,E10A aus *P. sativum* zu einer Rekonstitution des Tat-Transports anti-TatB-behandelter Thylakoide befähigt sind (siehe Abbildung 3.14), obwohl für diese Proteine keine Assemblierung in TatBC-Komplexe nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 3.13 und Ma et al., 2018 für TatB,E10C (wird als E11C bezeichnet)).

Im Vergleich zu Rekonstitutionsversuchen mit authentischem TatB ist die Transportrate nach Zugabe von TatB,E10C und TatB,E10A zu anti-TatB-behandelten Thylakoiden vermindert. Während TatB den Tat-Transport in Abbildung 3.14 bis zu 38 % wiederherstellte, wurde nach Austausch des Glutamatrests in TatB eine Rekonstitution des Tat-Transports von bis zu 6 % (TatB,E10C) und bis zu 10 % (TatB,E10A) erreicht. Mit Hilfe der Konzentrationsreihen in Abbildung 3.16 kann abgeleitet werden, dass TatB nach Austausch des Glutamatrests eine geringere Rekonstitutionsfähigkeit als das authentische Protein aufweist, wobei der K_m -Wert unverändert bleibt. Als Ursache für die verringerte Rekonstitutionsfähigkeit der Proteinvarianten ist eine eingeschränkte Interaktion mit TatC anzunehmen. Für *E. coli* wurde postuliert, dass der Glutamatrest in der TMH von TatB (hier Position 8) über Wasserstoffbrückenbindungen mit den Resten M205, T208, Q215, welche in TMH5 bzw. TMH6 von TatC positioniert sind, wechselwirkt (Alcock et al., 2016). Des Weiteren wurde die Relevanz des Glutamatrests in *P. sativum* und *E. coli* für die TatBC-Interaktion mit Hilfe von Crosslink-Analysen gezeigt (*P. sativum* und *E. coli*: New et al., 2018; *E. coli*: Kneuper et al. 2012; Rollauer et al. 2012; Blümmel et al., 2015; Alcock et al., 2016; Habersetzer et al., 2017). Die beeinträchtigte Bindung an TatC erklärt vermutlich, warum TatB,E10C und TatB,E10A nicht in TatBC-Komplexen detektiert werden können: Zum einen könnte die Assemblierung der Proteine in TatBC-Komplexe unterhalb des Detektionslimits für eine *Blue Native*-PAGE-Analyse liegen. Zum anderen ist denkbar, dass TatBC-Komplexe, die

TatB,E10A bzw. TatB,E10C enthalten, instabil sind und im Zuge der Solubilisierung mit Digitonin zerfallen und somit nach Durchführung einer *Blue Native*-PAGE nicht nachweisbar sind (siehe Abbildung 3.13).

Frühere Publikationen lieferten divergente Daten zur Funktionalität der Proteinvariante TatB,E8A in *E. coli* (in Pflanzen Position 10). Barrett et al. (2003) und Hicks et al. (2003) konnten unabhängig voneinander für *E. coli* zeigen, dass TatB,E8A aus *E. coli* im Tat-Transport aktiv ist. Alcock et al. (2016) beobachteten hingegen für TatB,E8A keine Transportaktivität. Die Autoren bemerkten, dass Barrett et al. (2003) und Hicks et al. (2003) mit *E. coli*-Stämmen arbeiteten, in denen die Tat-Gene überexprimiert wurden, während für die eigenen Arbeiten die Expression der Tat-Gene u. a. über einen authentischen Promotor reguliert wurde. Alcock et al. (2016) zeigten mittels Co-IP, dass eine Überproduktion der Proteinvariante TatB,E8A den postulierten TatC-Interaktionsdefekt kompensieren kann (siehe Fig. 6D), während nach Genexpression unter Kontrolle des authentischen Promotors keine Kompensation beobachtet wurde.

Dennoch ist denkbar, dass die Interaktion von TatB und TatC im TatBC-Komplex nicht ausschließlich vom Glutamatrest in der TMH von TatB abhängig ist. Analysen von Ma et al. (2018) zeigen, dass sich der Austausch verschiedener Aminosäurereste in TMH (G8, E11), *hinge*-Region (G24, K26, G27) und APH (Q43, P44, R47, E48) zu Cysteinresten z. T. erheblich auf die Assemblierung in TatBC-Komplexe auswirkt (Die Positionierung der Aminosäurereste ist in dieser Publikation um eine Position verschoben, da das Startmethionin als Position 1 deklariert wurde). So ist vorstellbar, dass ein Aminosäureaustausch des Glutamats an Position 10 zwar eine Destabilisierung der TatBC-Interaktion hervorruft, jedoch keinen vollständigen Ausfall der Proteinfunktion zur Folge hat.

Im Falle von TatA, welches mit TatB eine Proteinfamilie bildet, ist die transiente Interaktion mit dem TatBC-Rezeptorkomplex sogar Bestandteil der Proteinfunktion.

Während der Glutamatrest in der TMH von TatB hochkonserviert ist, liegt dieser Aminosäurerest von TatA in Proteobakterien, *Firmicutes*, Actino-, Acido- und Cyanobakterien oftmals substituiert als Histidin, Glutamin, Glycin oder auch Serin vor (Alcock et al., 2016).

Pflanzliches TatA trägt ebenfalls einen Glutamatrest an Position 10 in der TMH. Wie für TatB wird auch für TatA postuliert, dass der in der TMH von TatA vorliegende Glutamatrest relevant für die Interaktion des Proteins mit TatC ist (*P. sativum*: Aldridge et al., 2014) und für die Homooligomerisierung des Proteins bedeutend ist (Dabney-Smith et al., 2006). Außerdem

wurde vermutet, dass der Glutamatrest eine Funktion als pH-Sensor übernimmt: Die Protonierung der γ -Carboxylgruppe bei saurem pH im Lumen könnte unter Transportbedingungen die Assemblierung von TatA mit dem TatBC-Rezeptorkomplex steuern (Dabney-Smith et al., 2003). Diese Annahme konnte bisher nicht bestätigt werden (Dissertation von Christopher Paul New, 2020).

Die Proteine TatA,E10C; E10D; E10A und E10Q wurden bereits im *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuch auf ihre TatA-Funktion untersucht und als inaktiv (E10C in Hauer et al., 2013; E10A und E10Q in Dabney-Smith et al., 2003) bzw. als marginal aktiv bewertet (E10D in Dabney-Smith et al., 2003). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass TatA,E10Q in Tat-Transportversuchen mit Thylakoiden der Mais-Mutante *tha4* (Walker et al., 1999) keinen Tat-Transport vermittelt (Fincher et al., 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die TatA,E10C-vermittelte Rekonstitution von anti-TatA-behandelten Thylakoiden im Vergleich zu authentischem TatA eine deutlich verminderte Transportrate ermittelt. Es wurde eine relative Transportrate von 18 % erreicht (siehe Abbildung 3.24). Die Diskrepanz zur von Hauer et al. (2013) gemessenen Nullaktivität von TatA,E10C ergibt sich, wie bereits in Kapitel 3.5 erwähnt, wahrscheinlich aus der Anwendung verschiedener Transportzeiten und Substrate.

In dieser Arbeit konnte also gezeigt werden, dass TatA,E10C und TatB,E10C in Rekonstitutionsversuchen aktiv sind. Obwohl die Daten für TatA,E10C einen Gegensatz zu Hauer et al. (2013) und Dabney-Smith et al. (2003) bilden, ist unstrittig, dass der Austausch des Glutamats in der TMH von TatA und TatB einen negativen Einfluss auf die vermittelte Transportrekonstitution in *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuchen hat. Der Umstand, dass nachweisbare TatB-Assemblierung und Funktion womöglich nicht streng verknüpft sind, stellt eine der bisher als grundlegend angenommenen TatB-Eigenschaften in Frage.

4.3 Die Rolle des C-Terminus von TatB für den Tat-abhängigen Proteintransport

Während die Entfernung der C-terminal unstrukturierten Region von TatA aus *E. coli*, Erbse und *Arabidopsis* (Lee et al., 2002; Dabney-Smith et al., 2003; Petterson et al., 2019) nachweislich keinen negativen Einfluss auf die Proteinaktivität hat, lässt sich für *E. coli*-TatB-core aus Literaturdaten eine verminderte Proteinaktivität ableiten (Lee et al., 2002; Maldonado et al., 2011).

Die in Abbildung 3.19 gezeigten Daten legen nahe, dass TatB-core, welches TatB₁₋₁₀₃ aus Erbse entspricht, bei Verwendung von zu authentischem TatB vergleichbaren Konzentrationen

ebenfalls eine verminderte Transportrekonstitution vermittelt, die jedoch bei Verwendung von 4 μM Protein gesteigert werden konnte (Abbildung 3.19). Somit ist denkbar, dass TatB-core eine im Vergleich zu authentischem TatB verringerte Affinität zum TatBC-Komplex aufweist. Ursächlich hierfür könnte u. a. eine funktionelle Bedeutung der C-terminalen Region sein. So wurde für *E. coli*-TatB gezeigt, dass der Aminosäurerest D106, der in der C-terminalen Region positioniert ist, mit intramolekularen Lysinresten im Bereich der löslichen Helices quervernetzt werden kann (Fröbel et al., 2019).

Für TatB-core aus *A. thaliana* (TatB₁₋₁₀₆), das nur eine marginale Transportrekonstitution vermittelt (siehe Abbildung 3.19), konnte im Gegensatz zum verkürzten Protein aus Erbse eine verstärkte Aggregatbildung beobachtet werden, deren Ursache unklar ist (Abbildung 3.4).

Aus Abbildung 4.2 A ist zu erkennen, dass die TatB-Proteine aus *A. thaliana* und Erbse im Bereich der Aminosäurereste 1 – 70 eine hohe Sequenzhomogenität aufweisen. Mit Hilfe eines vergleichenden Hydropathieplots sind erst ab Sequenzposition 70 Unterschiede in der Hydrophobizität der TatB-Proteine aus *A. thaliana* und Erbse zu erkennen (siehe Abbildung 4.2 B). Es kann jedoch keine deutlich erhöhte Hydrophobizität für *A. thaliana*-TatB-core abgeleitet werden.

Die Aggregate konnten nicht mittels Ultrazentrifugation aus der Proteinlösung, die in Rekonstitutionsversuchen eingesetzt wurde, entfernt werden. Die wahrscheinlich inaktiven Proteinaggregate beeinflussen die Konzentrationsbestimmung des löslichen *A. thaliana*-TatB-core-Proteins. Somit ist anzunehmen, dass aktives TatB-core in geringerer Stoffmengenkonzentration im *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuch vorlag, als angenommen. Da die Aggregatbildung im Reinigungsprozess nicht verhindert werden konnte, ist unklar, ob *Arabidopsis*-TatB-core tatsächlich nur eine geringe Transportrekonstitution vermitteln kann. Möglicherweise kann die Bildung von Proteinaggregaten zukünftig minimiert werden, wenn RP-HPLC-Elutionsfraktionen des Proteins vor *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuchen mittels Dialyse in HM-Puffer mit Harnstoff überführt werden. Die chaotropen Eigenschaften des Harnstoffs könnten hydrophobe Effekte reduzieren (Salvi et al., 2005).

Thylakoiden zurückzuführen ist. Das Defizit wird dabei wahrscheinlich durch die partielle Extraktion von TatA aus der Thylakoidmembran im Rahmen von Waschungen hervorgerufen, die bei der Durchführung von Rekonstitutionsversuchen unabdingbar sind. Demzufolge ist die in Kapitel 4.1 postulierte Limitierung der freien Bindestellen für extern zugegebenes TatB in TatBC-Komplexen nicht ursächlich für die im Vergleich zu unbehandelten Kontrollreaktionen geringeren Transportraten nach TatB-vermittelter Rekonstitution (rel. con 15 – 40 %: siehe z.B. Abbildung 3.5, Abbildung 3.14, Abbildung 3.16 und Abbildung 3.23).

Es war jedoch nicht möglich den mutmaßlichen Verlust des intrinsischen TatA-Proteins mittels Western Blot-Analyse zu visualisieren (siehe Abbildung 3.21). Lediglich *in vitro* synthetisiertes TatA aus *P. sativum*, das zu unbehandelten Thylakoiden hinzugegeben wurde, konnte nach Durchführung von vier aufeinanderfolgenden Waschschritten in Überstandsfraktionen nachgewiesen werden. Dabei lag der in Überstandsfraktionen ermittelte Proteinanteil pro Waschschriff bei 3 – 5 %. Der Gesamtanteil des *in vitro* synthetisierten Proteins in allen Überstandsfraktionen betrug 18 %. Auch wenn sich die Ergebnisse des Versuchs nicht unmittelbar auf intrinsisches TatA übertragen lassen, ist anzunehmen, dass intrinsisches TatA bei jedem Waschschriff geringfügig aus der Thylakoidmembran herausgelöst wird. Mit dieser Annahme geht einher, dass der Tat-Transport isolierter Thylakoide durch sukzessive Waschungen vermindert wird und durch Zugabe von TatA aus *A. thaliana* erhöht werden kann. Die erreichten Transportraten waren sogar stets höher als die der Kontrollreaktionen jedes Waschstadiums (siehe Abbildung 3.20, bei 2,5-minütigem Transport). Dieser Effekt konnte ebenfalls beobachtet werden, wenn Erbsen-TatA, das im Vergleich zu *Arabidopsis*-TatA eine geringere katalytische Aktivität aufweist, vor der Transportreaktion mit vierfach-gewaschenen Thylakoiden vorinkubiert wurde (siehe Abbildung 3.29: unbehandelte Thylakoide, Spuren con vs. A; siehe auch Abb. 25 in der Dissertation von Mandy Waclawek, 2016). Der Tat-Transport in Thylakoiden, die direkt nach der Lyse mit TatA vorinkubiert werden, war ebenfalls erhöht (siehe 0 x HM und 0 x HM). Es ist unwahrscheinlich, dass hier ein TatA-Defizit in der Thylakoidmembran vorliegt, da die Thylakoide direkt nach der Lyse der Chloroplasten noch keinem Waschschriff unterzogen wurden. Allerdings steht nach TatA-Zugabe eine erhöhte Proteinmenge für den Tat-Transport zur Verfügung, sodass eine gesteigerte Transporteffizienz nachvollziehbar ist. Das extern zugegebene Protein inseriert spontan in die Thylakoidmembran und könnte entsprechend der TatA-Funktion zusätzlich transient am TatBC-Rezeptorkomplex assemblieren.

Da TatA in Erbsen-Chloroplasten nicht nur in der Membran vorliegend sondern auch im Stroma nachgewiesen wurde, könnte darüber hinaus lösliches Protein eine Funktion im Transportprozess übernehmen (Frielingsdorf et al., 2008). Nach einem möglichen *Recycling*-Mechanismus von löslichem und membrangebundenem TatA könnte das im Stroma verfügbare Protein als Reserve fungieren und für den Transport von Substraten in die Membran integriert werden. Insbesondere diese postulierte Proteinreserve könnte dann nach Thylakoidwaschungen in *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuchen fehlen und zusätzlich zu TatA, das aus der Thylakoidmembran herausgelöst wird, einen negativen Einfluss auf die Transporteffizienz haben.

4.5 Variabilität des Tat-Transports in *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuchen

Im Allgemeinen wurde beobachtet, dass die Transportraten nach TatB-vermittelter Rekonstitution Schwankungen unterliegen. So wurden bei 10-minütigem Tat-Transport von pOEC16 nach Zugabe von gereinigtem TatB relative Transportraten im Bereich von 15 – 40 % ermittelt (Ausnahme Abbildung 3.29).

Ein Faktor, der die Transportrate nach TatB-vermittelter Rekonstitution beeinflussen kann, ist das gereinigte TatB-Protein. Es wurde festgestellt, dass die Aktivität des mittels RP-HPLC gereinigten TatB-Proteins mit zunehmender Zeit abnimmt, obwohl es in Acetonitril/Wasser bei 4 °C gelagert wurde. Aus diesem Grund wurden alle in dieser Arbeit gezeigten Rekonstitutionsversuche mit gereinigtem TatB durchgeführt, das maximal zwei Wochen in Acetonitril/Wasser vorlag, sodass die schwankenden Transportrekonstitutionen nicht auf die Lagerungsdauer des gereinigten Proteins zurückzuführen sind.

Bei allen durchgeführten *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuchen, wurden für die Quantifizierung des murens Proteins unbehandelte Thylakoide in der Kontrollreaktionen als Referenz eingesetzt. Es wäre denkbar, dass eine schwankende Aktivität und/oder Ausgangsmenge des endogenen TatA-Proteins der verwendeten Erbsenkeimlinge verschiedener Versuche ursächlich für die Variabilität der TatB-Rekonstitution ist, obwohl konstante Anzuchtbedingungen vorliegen. Jedoch müsste die TatA-Menge aller Proben eines Versuchs vergleichbar sein und somit bei der Ermittlung der Transportraten keine Rolle spielen. So ist unwahrscheinlich, dass die variablen Transportraten in *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuchen auf einem Wasch- bzw. Extraktionseffekt von TatA basieren.

Es ist denkbar, dass schwankende Transportraten mit unterschiedlichen Transportkompetenzen von unbehandelten und antikörperbehandelten Thylakoide eines Versuchs einhergehen. Die Ursache für das postulierte Phänomen ist jedoch unbekannt.

4.6 TatA vs. TatB – Gemeinsamkeiten und Unterschiede

4.6.1 Proteinbedarf im Translokationsprozess

Die TatB-Konzentration, bei der 50 % des rekonstituierten Transports erreicht werden, liegt bei $0,15 \mu\text{M}$. Obwohl für die TatB-vermittelte Transportrekonstitution im Vergleich zu *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuchen mit TatA deutlich geringere Transportraten erreicht werden, ist ein ähnlicher Proteinbedarf erkennbar: Der für TatA ermittelte K_m -Wert befindet sich mit $0,12 \mu\text{M}$ in der gleichen Größenordnung (Hauer et al., 2013). So wäre denkbar, dass die Tat-Komponenten in äquivalenten Mengen in der Tat-Translokase benötigt werden.

Wie bereits erwähnt, existieren divergierende Angaben zur Stöchiometrie der Tat-Proteine in der Thylakoidmembran, sodass je nach verwendeter Methode und Spezies im Vergleich zu TatB und TatC ein geringeres (Jakob et al., 2009), vergleichbares (Mori et al., 2001; Jakob et al., 2009) oder höheres TatA-Level (Celedon & Cline 2012) postuliert wird. In den angegebenen Publikationen wurden insbesondere die Mengenverhältnisse der in den Thylakoidmembranen vorliegenden Proteine bestimmt, während in dieser Arbeit und in Hauer et al. (2013) am Translokationsprozess beteiligte Proteine untersucht wurden. Hier ist zu beachten, dass nicht bekannt ist, ob tatsächlich die Gesamtmenge der TatA- und TatB-Proteine in Rekonstitutionsversuchen aktiv ist. Dennoch ist die aus den Daten der AG Klößen abzuleitende 1:1 Stöchiometrie von TatA:TatB im Translokationsprozess bemerkenswert. Neben den ähnlichen Bedarfsmengen von TatA und TatB im Tat-Transport konnte für beide Proteine auf eine positive Kooperativität beim Transportprozess geschlossen werden (siehe Hauer et al., 2013; Abbildung 3.19 und Zinecker et al., 2020). Entsprechend dem favorisierten Modell der Coenzym-vermittelten Translokation könnte TatA im TatBC-Substrat-Komplex eine Konformationsänderung auslösen, die wiederum die Affinität des am TatBC-Substrat-Komplex assemblierenden TatA-Proteins erhöht, bis es den Transport eines Substrates über die Membran katalysieren kann (Hauer et al., 2013).

Warum hingegen die TatB-vermittelte Rekonstitution eine positive Kooperativität zeigt, lässt sich schwer einordnen: Am ehesten denkbar wäre eine kooperative Assemblierung, wenn

extern zugegebenes TatB mit freiem TatC eine Komplexbildung eingeht. Es wurde jedoch gezeigt, dass die Transportrate nach Rekonstitution unabhängig von der Vorinkubation des extern zugegebenen Proteins ist, sodass die Assemblierung in TatBC-Komplexe bereits vor Beginn der Transportreaktion abgeschlossen sein müsste und nicht ursächlich für die positive Kooperativität ist (siehe Anhang 10). Es wäre aber auch möglich, dass assembliertes TatB dynamisch ist und im Austausch mit TatB-Proteinen anderer TatBC-Komplexe steht, sodass dieser Effekt im Zusammenhang mit einer positiven Kooperativität stehen könnte. Der für *E. coli* postulierte Positionswechsel von TatA und TatB an den TatC-Bindestellen bei der Ausbildung der aktiven Translokase bekräftigt dabei jedoch ausschließlich die Dynamik des TatB-Proteins innerhalb eines TatBC-Komplexes (Habersetzer et al., 2017).

4.6.2 Membranintegration von TatA und TatB

Die Daten dieser Arbeit und Frielingsdorf et al. (2008) legen nahe, dass TatA im Vergleich zu TatB weniger stabil in der Thylakoidmembran integriert ist. Dabei wurde festgestellt, dass insbesondere die APH-Region und nicht die TMH-Region für die verstärkte Membranintegration von TatB verantwortlich ist (siehe Abbildung 3.28).

Diese Beobachtung wird außerdem durch Analysen zur Hydrophobizität und zur Amphiphilie der Proteine unterstützt (siehe Abbildung 4.3). Wenn TatA und TatB aus Erbse in einem Hydropathie-Plot nach Kyte & Doolittle (1982) aufgetragen werden, ist zu erkennen, dass der N-terminale Bereich der Transmembranhelix von TatA im Vergleich zu TatB etwas hydrophober ist, wohingegen der C-terminale Bereich der TMH für TatB eine erhöhte Hydrophobizität aufweist, sodass die TMH-Regionen beider Proteine einen insgesamt vergleichbaren hydrophoben Charakter zeigen (siehe Abbildung 4.3 A). So ist nachvollziehbar, dass TatBA unter Anwendung chaotroper Salze in einer zu TatA vergleichbaren Effizienz aus der Thylakoidmembran extrahiert werden kann (siehe Abbildung 3.28).

Zum Vergleich der amphipathischen Helices beider Proteine eignet sich insbesondere die Analyse des α -helikalen hydrophoben Moments (Eisenberg et al., 1982; siehe Abbildung 4.3 B). Dieser Wert gibt an, inwieweit hydrophobe und hydrophile Aminosäuren in einer α -Helix voneinander getrennt sind und sich somit eine hydrophobe und hydrophile Oberfläche der Helix ergibt. Je höher also der berechnete Wert für ein Sequenz-Fenster liegt, desto besser getrennt sind die hydrophilen und hydrophoben Aminosäurereste.

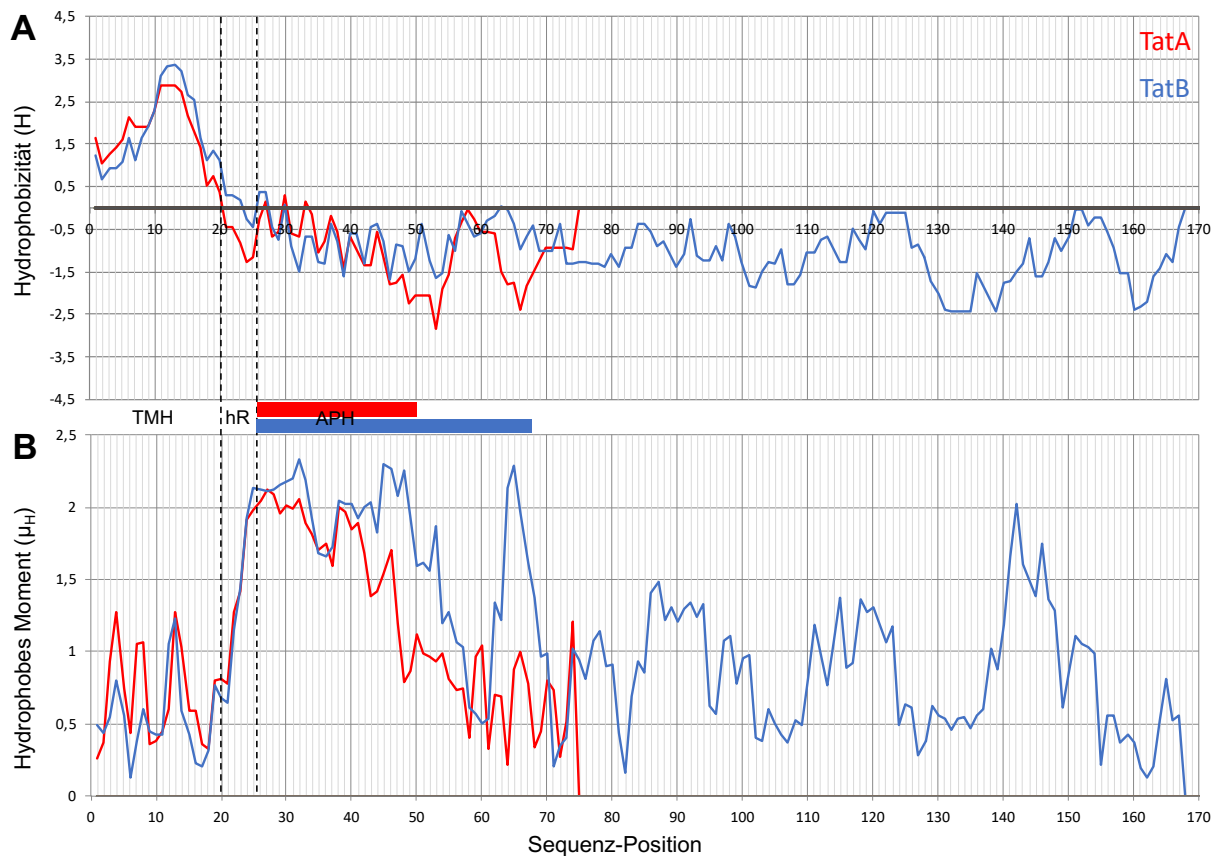


Abbildung 4.3: Analyse der Hydrophobizität und des hydrophoben Moments von TatA und TatB aus *P. sativum*. (A) Im Diagramm sind die durchschnittlichen Werte (Fensterbreite 9) für Hydrophobizität (positive Werte) und Hydrophilie (negative Werte) der beiden Proteine dargestellt. Dabei wurde die Hydropathie-Skalierung von Kyte und Doolittle (1982) gewählt. (B) Das α -helikale hydrophobe Moment nach Eisenberg et al. (1982) beschreibt den Charakter α -helikaler Bereiche, wobei hohe Werte auf Amphiphilie hinweisen (Fensterbreite 9). Die Bereiche für Transmembranhelix (TMH), hinge-Region (hR) und amphipathische Helices (APH; Balkendarstellung) wurden markiert. Die Festlegung der Einteilung richtet sich für TatA nach Petterson et al. (2018; TatA aus *A. thaliana*, exakte Positionen: TMH = V6 – L19; APH = E27 – S48). Die TMH-Region von TatB wurde nach Zhang (Yi) et al. (2014a; TatB aus *E. coli*, exakte Position: S7 – L19) eingegrenzt. Die APH-Region von TatB aus *P. sativum* erstreckt sich laut Zhang (Lei) et al. (2014) und Ma et al. (2018) von L28-G65.

Während das hydrophobe Moment für TatA von Sequenz-Position 25 – 47 maximal ist (oberhalb von 1,5), erstreckt sich dieses für TatB von Sequenz-Position 25 – 54. Dabei ist festzustellen, dass das hydrophobe Moment für TatB stets höher liegt als für TatA. Außerdem ist ein weiteres Maximum im Bereich der Sequenz-Positionen 60 -70 zu erkennen. Die Betrachtung des hydrophoben Moments impliziert somit für TatB eine vergleichsweise verlängerte APH, die außerdem eine ausgeprägte Trennung hydrophober und hydrophiler APH-Reste zeigt, was schließlich die Assoziation mit der Membrangrenzschicht verbessert. In Ma et al. (2018) dargestellte *helical wheel*-Plots für die Aminosäuresequenzbereiche L28 - P44 und T45 - G65 zeigen ebenfalls die Amphiphilie dieses Bereichs an. Zhang (Lei) et al. (2014) wiesen außerdem mit Hilfe von NMR-Spektroskopie nach, dass die postulierte APH von TatB

(L28 – G65) mit Phospholipiden interagiert und unabhängig von der TMH mit Membranen assoziieren kann. Schließlich ist nachvollziehbar, dass die APH von TatB ursächlich für eine im Vergleich zu TatA erhöhte Membranbindung sein kann (siehe Abbildung 3.28).

4.6.3 Proteinfunktion von *TatA* und *TatB*

Während postuliert wird, dass *TatA* den Transport eines Substrats vermittelt und dabei nur transient mit dem *TatBC*-Rezeptorkomplex interagiert, vollführt *TatB* im heterooligomeren Komplex mit *TatC* die Funktion des Substratrezeptors. Diese deutliche Abgrenzung der Proteinfunktionen wurde hauptsächlich für *TatABC*-Systeme beschrieben (Settles & Martienssen, 1998; Cline & Mori, 2001; Mori & Cline, 2002; Alcock et al., 2013; Aldridge et al., 2014; Maurer et al., 2010). So wurde festgestellt, dass bei simultanen Deletionen von *tatA* und *tatE* oder aber Deletion von *tatB* kein *Tat*-Transport der TMAO-Reduktase (*TorA*) erfolgt, da keine Enzymaktivität gemessen wurde. Bei diesem physiologischen Test werden *E. coli*-Zellen unter anaeroben Bedingungen angezogen, wobei die TMAO-Atmung als Indikator für ein funktionierendes *Tat*-System gilt. Es wurde außerdem gezeigt, dass die Deletionen von *tatA* und *tatE* nicht mittels Expression von *tatB* komplementiert werden. Auch der reverse Ansatz, die Deletion von *tatB* über die Expression von *tatA* zu komplementieren, ist nicht möglich (Sargent et al., 1999).

Im *in thylakoido*-System kann *TatA* ebenfalls nicht die Funktion von *TatB* übernehmen (siehe Abbildung 3.24 und Abbildung 3.29). Es ist wahrscheinlich, dass *TatA* keine *TatB*-Aktivität aufweist, weil das Protein keine stabile Bindung mit *TatC* eingeht (z.B. Mori & Cline, 2002; Aldridge et al., 2014) und außerdem im Vergleich zu *TatB* eine verkürzte amphipathische Helix aufweist. Letztere ist wahrscheinlich Voraussetzung für die *TatB*-Funktion (siehe Abbildung 3.29 und weiterführende Diskussion in Kapitel 4.6.4).

Interessanterweise konnten jedoch für *E. coli*-*TatA* Suppressormutationen im N-Terminus des Proteins isoliert werden, welche die Abwesenheit von *TatB* kompensieren, sodass diese *TatA*-Varianten wie in *B. subtilis* bifunktionell sind und gemeinsam mit *TatC* den *Tat*-Transport vermitteln (Blaudeck et al., 2005).

Eine potentielle duale Funktion von *TatB* wurde bisher nicht beschrieben. Demzufolge handelt es sich bei dem mehrfach reproduzierten Ergebnis, dass *TatB* den *Tat*-Transport anti-*TatA*-behandelter Thylakoide rekonstituieren kann, um eine vollkommen neue und für die

Diskussion der TatA-Funktion möglicherweise fundamental bedeutende Beobachtung (siehe Abbildung 3.24).

Mit Hilfe der NaBr-Behandlung von Thylakoiden, bei der insbesondere TatA aus der Thylakoidmembran extrahiert wird (siehe Abbildung 3.25 und Abbildung 3.28; Frielingsdorf et al., 2008), konnte ebenfalls gezeigt werden, dass TatB den Verlust von TatA zum Teil kompensieren kann und dass die beobachtete TatA-Aktivität von TatB kein Artefakt der Antikörperbehandlung der Rekonstitutionsversuche aus Abbildung 3.24 ist.

Außerdem wurde mit Hilfe des TatB-Antigens gezeigt, dass die Membranintegration von TatB essentiell ist, um den Tat-Transport anti-TatA-behandelter Thylakoide zu rekonstituieren (siehe Anhang 17). Darüber hinaus kann auch mit TatB,E10C keine Rekonstitution des Transports erreicht werden, was darauf hindeutet, dass die Interaktion mit TatC ebenfalls ein wesentlicher Faktor für die TatA-Aktivität von TatB ist (siehe Anhang 12).

Die beobachtete Bifunktionalität von TatB ist erstaunlich, da TatB im Gegensatz zu TatA (Oates et al., 2005) stabil in TatBC-Komplexe assembliert. Wenn außerdem die komplexunabhängige Oligomerisierung bei TatA ein wesentliches Merkmal für die TatA-Funktion ist, ist darüber hinaus interessant, dass TatB nicht zur Homooligomerisierung außerhalb des Rezeptorkomplexes neigt (Kneuper et al., 2012; Ma et al. 2018)

Es ist jedoch zu beachten, dass nur extern zugegebenes TatB eine TatA-Aktivität in Rekonstitutionsversuchen vermitteln kann. Es kann vermutet werden, dass intrinsisches TatB durch die feste Bindung an TatBC-Komplexe eingeschränkt ist, sodass nur die Zugabe von löslichem TatB, welches dann ungebunden in der Membran vorliegt und lateral frei diffundieren kann, die Ausübung der TatA-Funktion am TatBC-Rezeptorkomplex ermöglicht. Da für TatB-Rekonstitutionen bereits nach Zugabe von 0,3 μ M TatB die maximale Transportrate erreicht wird (siehe Abbildung 3.16), ist anzunehmen, dass TatB in den durchgeführten Versuchen im Überschuss vorliegt (siehe Abbildung 3.24 und Abbildung 3.29), sodass neben in TatBC-Komplexen assembliertem Protein tatsächlich ungebundenes TatB in der Membran vorliegen könnte.

Obwohl unklar ist, wie die gezeigte Bifunktionalität von TatB in aktuelle Modellvorstellungen eingeordnet werden könnte, konnten mit den durchgeführten Versuchen dennoch mechanistische Aspekte zur TatA-Aktivität des Proteins abgeleitet werden.

Dabney-Smith et al. (2003) konnten die TatB-vermittelte Rekonstitution des Tat-Transports anti-TatA-behandelter Thylakoide nicht beobachten. Im Unterschied zu den in Abbildung 3.24 und Abbildung 3.29 gezeigten Daten, wurde *in vitro* synthetisiertes TatB verwendet. Möglicherweise kann mit *in vitro* synthetisiertem TatB keine TatA-Aktivität erreicht oder detektiert werden.

Wie bereits in Kapitel 4.1 zusammengefasst wurde, ist die in dieser Arbeit erreichte TatB-vermittelte Rekonstitution des Tat-Transports von pOEC16 mit *in vitro* synthetisiertem TatB geringer (3 – 8 %) als bei Verwendung von gereinigtem TatB (15 – 40 %). Ursächlich für die geringere Rekonstitutionsleistung des *in vitro* synthetisierten TatB-Proteins könnte z.B. eine unvollständige bzw. inkorrekte Faltung des Proteins sein. Daten der AG Klösgen deuten darauf hin, dass insbesondere die RP-HPLC-Reinigung von heterolog synthetisiertem TatB einen wesentlichen Einfluss auf die Aktivität des Proteins im *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuch hat, wobei die Ausprägung der korrekten Faltung im Reinigungsprozess wahrscheinlich ist. Bei der Rückfaltung der unter denaturierenden Bedingungen aus *inclusion bodies* aufgereinigten TatA- und TatB-Proteine erwies sich die Kombination aus RP-HPLC zur finalen Proteinreinigung und direkt aus Acetonitril/Wasser erfolgter Dialyse als entscheidender Schritt bei der Rückfaltung eines funktionellen Tat-Proteins. Organische Lösungsmittel begünstigen nachweislich die Ausbildung von Helices (Yu et al., 2016). So konnte für RP-HPLC-gereinigtes TatA aus *A. thaliana* bereits mittels Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) die Ausbildung der α -Helices nachgewiesen werden (Pettersen et al., 2018).

4.6.4 Identifikation funktionell wichtiger Bereiche von TatA und TatB

Die Beobachtung, dass TatA keine TatB-Aktivität vermitteln kann, impliziert, dass TatB im Vergleich zu TatA besondere Eigenschaften aufweist, die zur Erfüllung der TatB-Funktion essentiell sind. Ursächlich für die Ausübung einer TatB-Aktivität könnten insbesondere Unterschiede in TMH und APH der Tat-Proteine sein. Wie in Kapitel 3.6 beschrieben wurde, zeigen sich bereits im Vergleich der Aminosäuresequenzen Unterschiede. Obwohl die Transmembranhelices von TatA und TatB ähnlich hydrophob sind (siehe Abbildung 4.3 A), wurde durch die Analyse des hydrophoben Moments festgestellt (siehe Abbildung 4.3 B), dass die APH von TatB verlängert ist und eine ausgeprägtere Trennung hydrophober und hydrophiler Reste zeigt, was schließlich auch die Assoziation mit der Membran verbessern könnte. Diese Annahme konnte durch Untersuchungen zur Membranstabilität der chimären

Tat-Proteine TatAB und TatBA im Vergleich zu den authentischen Proteinen festgestellt werden (siehe Abbildung 3.28 und Diskussion in 4.6.2). Während TatBA und TatA ähnlich effizient aus der Thylakoidmembran extrahiert wurden, zeigte TatAB eine zu TatB vergleichbare Membranstabilität. Interessanterweise konnte auch nur TatAB den Tat-Transport anti-TatB-behandelter Thylakoide rekonstituieren, TatBA war nicht zur Rekonstitution befähigt (siehe Abbildung 3.29).

Eine potentiell verbesserte Bindung zu TatC für TatAB lässt sich jedoch aus den *Blue Native*-Analysen nicht ableiten (siehe Abbildung 3.27 und Anhang 14), da keine Komplexe identifiziert wurden, die ein zu TatBC-Komplexen vergleichbares Laufverhalten aufweisen. TatBC-ähnliche Komplexe wurden jedoch für TatBA, das keine TatB-Aktivität aufweist, festgestellt. Diese Komplexe zeigen, dass die Transmembranhelix von TatB die stabile Interaktion mit TatC vermittelt, die jedoch nicht essentiell für die TatB-Funktion zu sein scheint, da die TatB-vermittelte Rekonstitution mit TatAB im Vergleich zu authentischem Protein verringert, jedoch nicht inhibiert ist (siehe Abbildung 3.29).

Eine Diskrepanz zwischen Assemblierung und Funktion von TatB-Proteinen ergab sich ebenfalls für TatB,E10C und TatB,E10A (siehe Kapitel 4.2). Die Daten der Rekonstitutionsversuche legen nahe, dass die stabile bzw. nachweisbare Interaktion von TatB und TatC nicht essentiell für die TatB-Funktion ist.

Da für TatB im *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuch eine TatA-Aktivität nachgewiesen werden konnte, wurde angenommen, dass auch TatAB und TatBA eine Rekonstitution vermitteln, wenn intrinsisches TatA inhibiert ist. Diese Annahme wurde bestätigt (siehe Abbildung 3.29).

Der in dieser Arbeit gezeigte Rekonstitutionsversuch mit chimären TatAB-Proteinen, kann mit früheren Publikationen verglichen werden (siehe Abbildung 3.29). Dabney-Smith et al. (2003) untersuchten ebenfalls die TatA-vermittelte Rekonstitution chimärer Tat-Proteine, die in ihrem Aufbau den hier verwendeten Proteinen TatAB und TatBA gleichen. Wie Tabelle 4.1 zu entnehmen ist, wurde bei Zugabe von TatB bzw. TatAB zu anti-TatA-behandelten Thylakoiden keine Transportrekonstitution erreicht. Möglicherweise hängt dies, wie bereits in Kapitel 4.6.3 beschrieben wurde, mit einer inkorrekten bzw. unvollständigen Faltung des verwendeten *in vitro* synthetisierten TatB-Proteins zusammen.

Auch Lee et al. (2002) untersuchten die Funktionalität der vergleichbar konstruierten chimären Proteine TatAB und TatBA in *E. coli*. Im Gegensatz zu Dabney-Smith et al. (2003)

wurde hier gezeigt, dass TatAB die TatA-Funktion bei Deletion von *tatA* ersetzen kann, während TatBA die Abwesenheit von TatA nicht kompensieren kann. Methodisch basiert dieser Versuch auf der SDS-Empfindlichkeit von *tat*-Deletionsmutanten, der mit einem Defizit der Tat-abhängig transportierten Zellwandamidasen AmiA und AmiC einhergeht (Ize et al., 2003). In Übereinstimmung mit Abbildung 3.29 aus dieser Arbeit konnte also in Lee et al. (2002) festgestellt werden, dass TatAB eine TatA-Aktivität aufweist.

Tabelle 4.1: Vergleich der TatA- bzw. TatB-Aktivitäten in *E. coli* und *P. sativum*. In der Tabelle werden Ergebnisse der eigenen Arbeit und der Publikationen von Lee et al. (2002) und Dabney-Smith et al. (2003) zu chimären TatAB-Proteinen gegenübergestellt. Lee et al. (2002) untersuchten die SDS-Empfindlichkeit der *tat*-Deletionsstämme Δ *tatAE* und Δ *tatB*, die mit TatA-, TatAB-, TatBA- und TatB-synthetisierenden Plasmiden transformiert wurden. In der eigenen Arbeit und in Dabney-Smith et al. (2003) wurden *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuche (siehe Abbildung 3.29) zur Untersuchung der TatA- bzw. TatB-Aktivität unter Verwendung von TatA- bzw. TatB-spezifischen Antikörpern (nur in dieser Arbeit) angewendet. Ein + zeigt das Wachstum der *E. coli*-Zellen in Lee et al. (2002) bzw. die Rekonstitution des Tat-Transports in Dabney-Smith et al. (2003) und der eigenen Arbeit an. N.g. (nicht gemessen) gibt an, dass die Kombination nicht erprobt wurde.

<i>E. coli</i>	Protein	Zellwachstum Lee et al., 2002	<i>in thylakoido</i> -Rekonstitution		Protein	<i>Erbse</i>
			Dabney-Smith et al., 2003	diese Arbeit		
Δ <i>tatAE</i>	TatA	n.g.	+	+	TatA	anti-TatA
	TatAB	+	-	+	TatAB	
	TatBA	-	+	+	TatBA	
	TatB	n.g.	-	+	TatB	
Δ <i>tatB</i>	TatA	n.g.	n.g.	-	TatA	anti-TatB
	TatAB	+	n.g.	+	TatAB	
	TatBA	-	n.g.	-	TatBA	
	TatB	n.g.	n.g.	+	TatB	

Die Deletion von *tatB* wurde in Lee et al. (2002) ebenfalls mit TatAB kompensiert, wohingegen für TatBA keine TatB-Aktivität festgestellt werden konnte. Diese Ergebnisse entsprechen dem *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuch aus Abbildung 3.29 und verdeutlichen die Relevanz der TatB-APH-Region für die TatB-Aktivität.

4.7 Schlussbemerkungen

Die in dieser Arbeit etablierte Methode zur TatB-vermittelten Rekonstitution des Tat-Transports ermöglichte erstmals die Analyse der TatB-Aktivität im *in thylakoido*-System und legt nahe, dass TatA und TatB im Tat-Transport in äquivalenten Mengen benötigt werden.

Darüber hinaus handelt es sich bei der Beobachtung, dass TatB den Tat-Transport anti-TatA-behandelter Thylakoide rekonstituieren kann, um eine bisher einzigartige Beobachtung. Es ist denkbar, dass die Fähigkeit zur Rekonstitution des Tat-Transports anti-TatA-behandelter Thylakoide auf den Gemeinsamkeiten von TatA und TatB beruht. So kann insbesondere die verlängerte amphipathische Helix von TatB ein Alleinstellungsmerkmal der Funktion von TatB sein. Mit Hilfe des *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuchs können nun weitere chimäre TatAB-Proteine zur gezielten Analyse der APH-Region von TatB untersucht werden. So könnte der funktionsdeterminierende Bereich, der für eine TatB-Aktivität entscheidend ist, weiter eingegrenzt werden.

5 Literaturverzeichnis

- Akopian D., Shen K., Zhang X., Shan S.O. (2013b). Signal recognition particle: an essential protein-targeting machine. *Annual Review of Biochemistry* 82, 693–721
- Alami M., Lüke I., Deitermann S., Eisner G., Koch H. G., Brunner J., Müller M. (2003). Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in *Escherichia coli*. *Molecular Cell* 12(4), 937–946
- Albiniak A. M., Baglieri J., & Robinson C. (2012). Targeting of luminal proteins across the thylakoid membrane. *Journal of Experimental Botany* 63(4), 1689–1698
- Alcock F., Baker M.A., Greene N.P., Palmer T., Wallace M.I., Berks B.C. (2013) Live cell imaging shows reversible assembly of the TatA component of the twin-arginine protein transport system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, E3650–3659
- Alcock F., Damen M.P, Levring J. and Berks B.C. (2017). *In vivo* experiments do not support the charge zipper model for Tat translocase assembly. *eLife* 6, e30127
- Alcock F., Stansfeld P. J., Basit H., Habersetzer J., Baker M. A.B., Palmer T., Wallace M.I., Berks, B. C. (2016). Assembling the Tat protein translocase. *eLife* 5, e20718
- Alder N.N. and Theg S.M. (2003). Energetics of protein transport across biological membranes: A study of the thylakoid ΔpH -dependent/cpTat pathway. *Cell*,112(2), 231–242
- Aldridge C., Ma X., Gerard F., Cline K. (2014). Substrate-gated docking of pore subunit Tha4 in the TatC cavity initiates Tat translocase assembly. *Journal of Cell Biology* 205(1), 51–65
- Aldridge C., Storm A., Cline K., Dabney-Smith C. (2012). The chloroplast twin arginine transport (Tat) component, Tha4, undergoes conformational changes leading to Tat protein transport. *Journal of Biological Chemistry* 287(41), 34752–34763
- Arnon D. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenyloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 4999–5001
- Bageshwar U.K., Whitaker N., Liang F.C., Musser S. M. (2009). Interconvertibility of lipid- and translocon-bound forms of the bacterial Tat precursor pre-Sufl. *Molecular Microbiology* 74(1), 209–226
- Balsera M., Goetze T.A., Kovacs-Bogdan E., Schurmann P., Wagner R., Buchanan B.B., Soll J., Bölter B. (2009a). Characterization of Tic110, a channel-forming protein at the inner envelope membrane of chloroplasts, unveils a response to Ca^{2+} and a stromal regulatory disulfide bridge. *Journal of Biological Chemistry* 284, 2603–2616

- Barrett C.M.L., Mathers J.E., & Robinson C. (2003). Identification of key regions within the *Escherichia coli* TatAB subunits. *FEBS Letters* 537(1–3), 42–46
- Bechtluft P., Nouwen N., Tans S.J., Driessen A.J.M. (2010). SecB - a chaperone dedicated to protein translocation. *Molecular BioSystems* 6, 620–627
- Becker T., Hritz J., Vogel M., Caliebe A., Bukau B., Soll J., Schleiff E. (2004b). Toc12, a novel subunit of the intermembrane space preprotein translocon of chloroplasts. *Molecular Biology of the Cell* 15, 5130–44
- Beckert B., Kedrov A., Sohmen D., Kempf G., Wild K., Sinning I., Stahlberg H., Wilson D. N., Beckmann R. (2015). Translational arrest by a prokaryotic signal recognition particle is mediated by RNA interactions. *Nature Structural & Molecular Biology* 22, 767–773
- Bennewitz B., Sharma M., Tannert F., Klösigen R.B. (2020). Dual targeting of TatA points to a chloroplast-like Tat pathway in plant mitochondria. *BioRxiv* (preprint), <https://doi.org/10.1101/2020.04.06.026997>
- Berghöfer J., Karnauchov I., Herrmann R.G., Klösigen R.B. (1995) Isolation and characterization of a cDNA encoding the SecA protein from spinach chloroplasts: evidence for azide-resistance of Sec-dependent protein translocation across thylakoid membranes of spinach. *Journal of Biological Chemistry* 270, 18341–18346
- Berghöfer J. & Klösigen R.B. (1996). Isolation and characterization of a cDNA encoding the SecY protein from spinach chloroplasts. *Plant Physiology* 112, 863
- Berghöfer J. & Klösigen R.B. (1999). Two distinct translocation intermediates can be distinguished during protein transport by the TAT (Δ pH) pathway across the thylakoid membrane. *FEBS Letters* 460(2), 328–332
- Berks B.C. (1996). A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Molecular Microbiology* 22(3), 393–404
- Berks B.C., Palmer T., Sargent F. (2005) Protein targeting by the bacterial twin arginine translocation (Tat) pathway. *Current opinion in microbiology* 8(2), 174–181
- Berks B.C., Palmer T., Sargent F. (2003). The Tat protein translocation pathway and its role in microbial physiology, *Advances in Microbial Physiology* 47 187–254
- Berks B.C., Sargent F., Palmer T. (2000). The Tat protein export pathway. *Molecular Microbiology* 35(2), 260–274.
- Bogsch E., Brink S., Robinson C. (1997). Pathway specificity for a Δ pH-dependent precursor thylakoid lumen protein is governed by a 'Sec-avoidance' motif in the transfer peptide and a 'Sec-incompatible' mature protein. *EMBO Journal* 16(13), 3851–3859

- Bogsch E.G., Sargent F., Stanley N.R., Berks B.C., Robinson C., Palmer T. (1998) An essential component of a novel bacterial protein export system with homologues in plastids and mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 273, 18003–18006
- Blümmel A. S., Haag L. A., Eimer E., Müller M., Fröbel, J. (2015). Initial assembly steps of a translocase for folded proteins. *Nature Communications* 6, 7234
- Bolhuis A., Mathers J. E., Thomas J. D., Barrett C. M. and Robinson C. (2001) TatB and TatC form a functional and structural unit of the twin-arginine translocase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 276(23), 20213–20219
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254
- Braun N. A., Davis A. W., Theg S. M. (2007). The Chloroplast Tat Pathway Utilizes the Transmembrane Electric Potential as an Energy Source. *Biophysical Journal* 93(6), 1993–1998
- Bruce B. (1998). The role of lipids in plastid protein transport. *Plant Molecular Biology* 38(1–2), 223–246
- Bruce B.D. (2000) Chloroplast transit peptides: structure, function and evolution. *Trends in Cell Biology* 10, 440–447
- Bruce B.D. (2001). The paradox of plastid transit peptides: conservation of function despite divergence in primary structure. *Biochimica et Biophysica Acta* 1541, 2–21
- Brüser T. & Sanders C. (2003). An alternative model of the twin arginine translocation system. *Microbiological Research* 158 (1), 7–17
- Brüser T., Yano T., Daldal F. (2003). Membrane targeting of a folded and cofactor-containing protein. *European Journal of Biochemistry* 270, 1211–1221
- Cabelli R.J., Chen L., Tai P.C., Oliver D.B. (1988). SecA protein is required for secretory protein translocation into *E. coli* membrane vesicles. *Cell* 55, 683–692
- Cai D., Herrmann R.G., Klösgen R.B. (1993). The 20 kDa apoprotein of the CP24 complex of photosystem II: An alternative model to study import and intra-organellar routing of nuclear-encoded thylakoid proteins. *Plant Journal* 3, 383–392
- Carrie C., Weißenberger S., Soll J. (2016). Plant mitochondria contain the protein translocase subunits TatB and TatC. *Journal of Cell Science*, 129 (20), 3935–3947
- Chaddock A.M., Mant A., Karnauchov I., Brink S., Herrmann R.G., Klösgen R.B., Robinson C. (1995). Type of signal peptide: central role of a twin-arginine motif in transfer signals for the Δ pH-dependent thylakoidal protein translocase. *EMBO Journal* 14(12), 2715–2722

- Chan C.S., Zlomislic M.R., Tieleman D.P., Turner R.J. (2007). The TatA subunit of *Escherichia coli* twin-arginine translocase has an N-in topology. *Biochemistry* 46(25), 7396–7404
- Celedon J.M. & Cline K. (2013). Intra-plastid protein trafficking: How plant cells adapted prokaryotic mechanisms to the eukaryotic condition. *Biochimica et Biophysica Acta* 1833(2), 341–351
- Celedon J.M, Cline K. (2012), Stoichiometry for binding and transport by the twin arginine translocation system. *Journal of Cell Biology* 197, 523–534
- Chen Y.L., Chen L.J., Chu C.C., Huang P.K., Wen J.R., Li H.M. (2018). TIC236 links the outer and inner membrane translocons of the chloroplast. *Nature* 564, 125–129
- Chen K.Y. & Li H.M. (2007). Precursor binding to an 880-kDa Toc complex as an early step during active import of protein into chloroplasts. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 49, 149–158
- Clark S. A. & Theg S. M. (1997). A folded protein can be transported across the chloroplast envelope and thylakoid membranes. *Molecular Biology of the Cell* 8(5), 923–934
- Cline K. (2001). Thylakoid Δ pH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport. *Journal of Cell Biology* 154(4), 719–730
- Cline K. & Henry R. (1996). Import and Routing of Nucleus-Encoded Chloroplast Proteins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 12, 1–26
- Cline K. & McCaffery M. (2007). Evidence for a dynamic and transient pathway through the TAT protein transport machinery. *EMBO Journal* 26(13), 3039–3049
- Cline K. & Mori H. (2001). Thylakoid Δ pH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport. *Journal of Cell Biology* 154, 719–729
- Constan D., Froehlich J.E., Rangarajan S., Keegstra K. (2004). A stromal Hsp100 protein is required for normal chloroplast development and function in Arabidopsis. *Plant Physiology* 136(3), 3605–3615
- Creighton A.M., Hulford A., Mant A., Robinson D., Robinson C. (1995) A monomeric, tightly folded stromal intermediate on the Δ pH-dependent thylakoid protein transport pathway. *Journal of Biological Chemistry* 270, 1663–1669
- Cristóbal S., De Gier J.W., Nielsen H., von Heijne G. (1999). Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in *Escherichia coli*. *EMBO Journal* 18(11), 2982–2990
- Cronan J.E. (2003). Bacterial membrane lipids: where do we stand? *Annual Review of Microbiology* 57, 203–224

- Dabney-Smith C. & Cline K. (2009). Clustering of C-terminal stromal domains of Tha4 homooligomers during translocation by the Tat protein transport system. *Molecular Biology of the Cell* 20 (7), 2060–2069
- Dabney-Smith C., Mori H., Cline K. (2006). Oligomers of Tha4 organize at the thylakoid Tat translocase during protein transport. *Journal of Biological Chemistry* 281, 5476–5483
- Dabney-Smith C., Mori H., Cline K. (2003). Requirement of a Tha4-conserved transmembrane glutamate in thylakoid Tat translocase assembly revealed by biochemical complementation. *Journal of Biological Chemistry* 278(44), 43027–43033
- Dittmar J., Schlesier R., Klösigen R.B. (2014). Tat transport of a Sec passenger leads to both completely translocated as well as membrane-arrested passenger proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1843(2), 446–453
- Driessen A.J.M., Nouwen N. (2008). Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annual Review of Biochemistry* 77, 643–667
- Duong F, Wickner W. (1997). The SecDFyajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling. *EMBO Journal* 16, 4871–4879
- Economou A., Pogliano J.A., Beckwith J., Oliver D.B., Wickner W. (1995). SecA membrane cycling at SecYEG is driven by distinct ATP binding and hydrolysis events and is regulated by SecD and SecE. *Cell* 83(7), 1171–1181
- Economou A., Wickner W. (1994). SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. *Cell* 78, 835–843
- Eimer E., Fröbel J., Blümmel A.S., Müller M. (2015). TatE as a regular constituent of bacterial twin-arginine protein translocases. *Journal of Biological Chemistry* 290, 29281–29289
- Eisenberg D., Weiss R.M. & Terwilliger T.C. (1982). The helical hydrophobic moment: amphiphilicity of a helix. *Macmillan Journals Ltd* 299, 371–374
- Endo T., Kawakami M., Goto A., America T., Weisbeek P., Nakai M. (1994). Chloroplast protein import: chloroplast envelopes and thylakoids have different abilities to unfold proteins. *European Journal of Biochemistry* 225(1), 403–409
- van den Ent F. & Löwe J. (2006). RF cloning: a restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 67(1), 67–74
- Falk S., Ravaud S., Koch J., Sinning I. (2010). The C terminus of the Alb3 membrane insertase recruits cpSRP43 to the thylakoid membrane. *Journal of Biological Chemistry* 285, 5954–5962

- Fekkes P., van der Does C., Driessen A.J. (1997). The molecular chaperone SecB is released from the carboxy-terminus of SecA during initiation of precursor protein translocation. *EMBO Journal* 16, 6105–6113
- Fekkes P. & Driessen A.J. (1999). Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63, 161–173
- Ferreras M., Gavilanes J.G., Garciassegura J.M. (1993) A Permanent Zn²⁺ Reverse Staining Method for the Detection and Quantification of Proteins in Polyacrylamide Gels. *Analytical Biochemistry* 213(2), 206–212
- Fincher V., Dabney-Smith C., Cline K. (2003). Functional assembly of thylakoid ΔpH-dependent/Tat protein transport pathway components *in vitro*. *European Journal of Biochemistry* 270(24), 4930–4941
- Franklin A.E. & Hoffman N.E. (1993). Characterization of a chloroplast homologue of the 54-kDa subunit of the signal recognition particle. *Journal of Biological Chemistry* 268, 22175–22180
- Frielingsdorf S. (2008). Funktionelle Charakterisierung von Teilschritten des Tat-abhängigen Proteintransports an der Thylakoidmembran. Dissertation, *Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*
- Frielingsdorf S., Jakob M., Klösgen R.B. (2008). A stromal pool of TatA promotes Tat-dependent protein transport across the thylakoid membrane. *Journal of Biological Chemistry* 283(49), 33838–33845
- Fröbel J., Blümmel A.S., Drepper F., Warscheid B., Müller M. (2019). Surface-exposed domains of TatB involved in the structural and functional assembly of the Tat translocase in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 294(38), 13902–13914
- Fröbel J., Rose P., Lausberg F., Blümmel A.S., Roland Freudl R., Müller M. (2012b). Transmembrane insertion of twin-arginine signal peptides is driven by TatC and regulated by TatB. *Nature Communications* 3, 1311
- Fröbel J., Rose P., Müller M. (2011) Early contacts between substrate proteins and TatA translocase component in twin-arginine translocation. *Journal of Biological Chemistry* 286 (51), 43679–43689
- Fujiki Y., Hubbard A.L., Fowler S. and Lazarow P.B. (1982a). Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: Application to endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 93, 97–102
- Fulgosi H. and Soll J. (2002). The chloroplast protein import receptors Toc34 and Toc159 are phosphorylated by distinct protein kinases. *Journal of Biological Chemistry* 277, 8934–8940

- Gérard F. and Cline K. (2006). Efficient twin arginine translocation (Tat) pathway transport of a precursor protein covalently anchored to its initial cpTatc binding site. *Journal of Biological Chemistry* 281, 6130–6135
- Gérard F. and Cline K. (2007). The thylakoid proton gradient promotes an advanced stage of signal peptide binding deep within the Tat pathway receptor complex. *Journal of Biological Chemistry* 282, 5263–72
- Gohlke U., Pullan L., McDevitt C.A., Porcelli I., de Leeuw E., Palmer T., Saibil H.R., Berks B.C. (2005). The TatA component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(30), 10482–10486
- Goosens V.J., De-San-Eustaquio-Campillo A., Carballido-López R. and van Dijl J.M. (2015). A Tat ménage à trois - The role of *Bacillus subtilis* TatAc in twin-arginine protein translocation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1853(10), 2745–2753
- Gouffi K., Gérard F., Santini C.L., Wu L.F. (2004). Dual Topology of the *Escherichia coli* TatA Protein. *Journal of Biological Chemistry* 279(12), 11608–11615
- Gray M.W. & Doolittle W.F. (1982) Has the endosymbiont hypothesis been proven? *Microbiology Reviews* 46(1), 1–42
- Habersetzer J., Moore K., Cherry J., Buchanan G., Stansfeld P., Palmer T. & Road S.P. (2017). Substrate-triggered position-switching of TatA and TatB is an essential step in the *Escherichia coli* Tat protein export pathway. *Open Biology* 7, 170091
- Hageman J., Baecke C., Ebskamp M., Pilon R., Smeekens S. and Weisbeek P. (1990) Protein import into and sorting inside the chloroplast are independent processes. *Plant Cell* 2, 479–494
- Hageman J., Robinson C., Smeekens S., Weisbeek, P. (1986). A thylakoid processing protease is required for complete maturation of the lumen protein plastocyanin. *Nature* 324(6097), 567–569
- Halpin C., Elderfield P.D., James H.E., Zimmermann R., Dunbar B., Robinson C. (1989). The reaction specificities of the thylakoidal processing peptidase and *Escherichia coli* leader peptidase are identical. *EMBO Journal* 8(12), 3917–3921
- Hamasanathan S., Anthony-muthu T.S., Bageshwar U.K., Musser S.M. (2017). A hinged signal peptide hairpin enables Tat-dependent protein translocation. *Biophysical Journal* 113, 2650–2668
- Hamsanathan S. & Musser S.M. (2018). The Tat protein transport system: Intriguing questions and conundrums. *FEMS Microbiology Letters* 365(12), fny123
- Hauer RS., Freudl R., Dittmar J., Jakob M., Klösgen R.B. (2017). How to achieve Tat transport with alien TatA. *Scientific Reports* 7(1), 1–13

- Hauer R.S., Schlesier R., Heilmann K., Dittmar J., Jakob M., Klösigen R.B. (2013). Enough is enough: TatA demand during Tat-dependent protein transport. *Biochimica et Biophysica Acta* 1833(5) 957–965
- von Heijne G. (1985). Signal sequences. The limits of variation. *Journal of Molecular Biology* 184(1), 99–105
- von Heijne G., Steppuhn J., Herrmann R. G. (1989). Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *European Journal of Biochemistry / FEBS* 180(3), 535–545
- Heins L., Mehrle A., Hemmler R., Wagner R., Küchler M., Hormann F., Sveshnikov D., Soll J. (2002). The preprotein conducting channel at the inner envelope membrane of plastids. *EMBO Journal* 21, 2616–2625
- Hill A.V. (1913). The combinations of haemoglobin with oxygen and carbon monoxide. *Biochemical Journal* 7(5), 471–480
- Hinnah S.C., Wagner R., Sveshnikova N., Harrer R., Soll J. (2002). The chloroplast protein import channel Toc75: pore properties and interaction with transit peptides. *Biophysical Journal* 83, 899–911
- Horn A., Hennig J., Ahmed Y.L., Stier G., Wild K., Sattler M., Sinning I. (2015). Structural basis for cpSRP43 chromodomain selectivity and dynamics in Alb3 insertase interaction. *Nature Communications* 6, 1–11
- Hou B., Frielingsdorf S., Klösigen R.B. (2006). Unassisted membrane insertion as the initial step in Δ pH/Tat-dependent protein transport. *Journal of Molecular Biology* 355(5), 957–967
- Hou B., Heidrich E.S., Mehner-Breitfeld D., Brüser T. (2018). The TatA component of the twin-arginine translocation system locally weakens the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* upon protein substrate binding. *Journal of Biological Chemistry. Journal of Biological Chemistry* 293, 7592–7605
- Hulford A., Hazell L., Mould R.M., Robinson C. (1994) Two distinct mechanisms for the translocation of proteins across the thylakoid membrane, one requiring the presence of a stromal protein factor and nucleotide triphosphates. *Journal of Biological Chemistry* 269, 3251–3256
- Hu Y., Zhao E., Li H., Xia B., Jin C. (2010). Solution NMR structure of the TatA component of the twin-arginine protein transport system from gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Journal of the American Chemical Society* 132(45), 15942–15944
- Hynds P.J., Robinson D., Robinson C. (1998). The Sec-independent twin-arginine translocation system can transport both tightly folded and malformed proteins across the thylakoid membrane. *Journal of Biological Chemistry* 273, 34868–34874

- Inaba T., Li M., Alvarez-Huerta M., Kessler F., Schnell D.J. (2003). atTic110 functions as a scaffold for coordinating the stromal events of protein import into chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry* 278, 38617–38627
- Inoue H., Li M., Schnell D. J. (2013). An essential role for chloroplast heat shock protein 90 (Hsp90C) in protein import into chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(8), 3173–3178
- Jack R.L., Sargent F., Berks B.C., Sawers G., Palmer T. (2001). Constitutive expression of *Escherichia coli* tat genes indicates an important role for the twin-arginine translocase during aerobic and anaerobic growth. *Journal of Bacteriology* 183(5), 1801–1804
- Jakob M., Kaiser S., Gutensohn M., Hanner P., Klösigen R.B. (2009). Tat subunit stoichiometry in *Arabidopsis thaliana* challenges the proposed function of TatA as the translocation pore. *Biochimica et Biophysica Acta* 1793(2), 388–394
- Järvi S., Gollan P.J., Aro E.M. (2013). Understanding the roles of the thylakoid lumen in photosynthesis regulation. *Frontiers in Plant Science* 4(434)
- Jongbloed J.D.H., Grieger U., Antelmann H., Hecker M., Nijlan R., Bron S., van Dijl J.M. (2004). Two minimal Tat translocases in *Bacillus*. *Molecular Microbiology* 54, 1319–1325
- Jongbloed J.D.H., Martin U., Antelmann H., Hecker M., Tjalsma H., Venema G., Bron S., van Dijl J.M., Müller J. (2000) TatC is a specificity determinant for protein secretion via the twin-arginine translocation pathway. *Journal of Biological Chemistry* 275, 41350–41357
- Jongbloed J.D.H., van der Ploeg R., van Dijl J.M (2006). Bifunctional TatA subunits in minimal Tat protein translocases. *Trends in Microbiology* 14, 2–4
- Karnauchov I., Cai D., Schmidt I., Herrmann R.G., Klösigen, R.B. (1994). The thylakoid translocation of subunit 3 of photosystem I, the psaF gene product, depends on a bipartite transit peptide and proceeds along an azide-sensitive pathway. *Journal of Biological Chemistry* 269, 32871–32878
- Keegstra K., Cline K. (1999). Protein Import and Routing Systems of Chloroplasts. *Plant Cell* 11 557–570
- Kelley L., Mezulis S., Yates C., Wass M.N., Sternberg M.J.E (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols* 10, 845–858
- Kim S.J., Robinson C., Mant A. (1998). Sec/SRP-independent insertion of two thylakoid membrane proteins bearing cleavable signal peptides. *FEBS Letters* 424, 105–108
- Kirwin P.M., Elderfield P.D., Robinson C. (1987) Transport of proteins into chloroplasts. Partial purification of a thylakoidal processing peptidase involved in plastocyanin biogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 262(34), 16386–90

- Kirwin P.M., Elderfield P.D., Williams R.S., Robinson C. (1988) Transport of proteins into chloroplasts. Organization, orientation, and lateral distribution of the plastocyanin processing peptidase in the thylakoid network. *Journal of Biological Chemistry* 263, 18128–18132
- Klimyuk V.I., Persello-Cartieaux F., Havaux M., Contard P., Meierhoff K., Schünemann D., Gouet P., Jones J.D.G., Hoffman N.E., Nussaume L. (1999). A chromodomain protein encoded by the arabidopsis *Cao* gene is a plant-specific component of the chloroplast signal recognition particle pathway that is involved in LHCP targeting. *Plant Cell* 11, 87–991
- Klösgen R.B., Brock I.W., Herrmann R.G., Robinson C. (1992). Proton gradient-driven import of the 16 kDa oxygen-evolving complex protein as the full precursor protein by isolated thylakoids. *Plant Molecular Biology* 18(5), 1031–1034
- Kneuper H., Maldonado B., Jäger F., Krehenbrink M., Buchanan G., Keller R., Müller M., Berks B.C., Palmer T. (2012). Molecular dissection of TatC defines critical regions essential for protein transport and a TatB-TatC contact site. *Molecular Microbiology* 85(5), 945–961
- Ko K. & Cashmore A.R. (1989) Targeting of proteins to the thylakoid lumen by the bipartite transit peptide of the 33 kd oxygen-evolving protein. *EMBO Journal* 8, 3187–3194.
- Koch S., Fritsch M.J., Buchanan G., Palmer T. (2012) The *Escherichia coli* TatA and TatB proteins have an N-out C-in topology in intact cells. *Journal of Biological Chemistry* 287 (18), 14420–31
- Komarudin A.G. & Driessen A.J.M. (2019). SecA-Mediated Protein Translocation through the SecYEG Channel. *Microbiology Spectrum* 7(4)
- Kovacheva S., Bédard J., Wardle A., Patel R., Jarvis P. (2007). Further *in vivo* studies on the role of the molecular chaperone, Hsp93, in plastid protein import. *Plant Journal* 50(2), 364–379
- Kovács-Bogdán E., Benz J.P., Soll J., Bölder B. (2011). Tic20 forms a channel independent of Tic110 in chloroplasts. *BMC Plant Biology* 11, 133
- Kreutzenbeck P., Kroger C., Lausberg F., Blaudeck N, Sprenger G., Freudl R. (2007). *Escherichia coli* twin arginine (Tat) mutant translocases possessing relaxed signal peptide recognition specificities. *Journal of Biological Chemistry* 282 (11), 7903–7911
- Krimm I., Gans P., Hernandez J.F., Arlaud G.J, Lancelin J.M. (1999). A coil–helix instead of a helix–coil motif can be induced in a chloroplast transit peptide from *Chlamydomonas reinhardtii*. *European Journal of Biochemistry* 265, 171–180
- Kühlbrandt W., Wang D.N., Fujiyoshi Y. (1994). Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* 367, 614–621
- Kyte J. & Doolittle R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* 157(1), 105–132

- 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*. Sequence of a full-length cDNA clone and import of the precursor protein into chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry* 270, 17664–17667
- Lausberg F., Fleckenstein S., Kreutzenbeck P., Fröbel J., Rose P., Müller M., Freudl R., Bassilana M. (2012). Genetic Evidence for a Tight Cooperation of TatB and TatC during Productive Recognition of Twin-Arginine (Tat) Signal Peptides in *Escherichia coli*. *PLOS ONE* 7(6), e39867
- Leake M.C., Greene N.P., Godun R.M., Granjon T., Buchanan G., Chen S., Berry R.M., Palmer T., Berks B.C. (2008). Variable stoichiometry of the TatA component of the twin-arginine protein transport system observed by *in vivo* single-molecule imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 15376–15381
- Lee D.W., Yoo Y.J., Razzak M.A., Hwang I. (2018). Prolines in transit peptides are crucial for efficient preprotein translocation into chloroplasts. *Plant Physiology* 176(1), 663–677
- Lee P.A., Buchanan G., Stanley N.R., Berks B.C., Palmer T. (2002). Truncation analysis of TatA and TatB defines the minimal functional units required for protein translocation. *Journal of Bacteriology* 184(21), 5871–5879
- Leister D. (2003) Chloroplast research in the genomic age. *Trends in Genetics* 19, 47-56
- Lewis N.E., Marty N.J, Kathir K.M, Rajalingam D., Kight, A.D., Daily A., Kumar T.K.S., Henry R.L., Goforth, R.L. (2010). A dynamic cpSRP43-Albino3 interaction mediates translocase regulation of chloroplast signal recognition particle (cpSRP)-targeting components. *Journal of Biological Chemistry* 285, 34220–34230
- Liang F.C., Kroon G., McAvoy C.Z., Chi C., Wright P.E., Shan S.O. (2016). Conformational dynamics of a membrane protein chaperone enables spatially regulated substrate capture and release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113, E1615–1624
- Li X., Henry R., Yuan J., Cline K., Hoffman N.E. (1995). A chloroplast homologue of the signal recognition particle subunit SRP54 is involved in the posttranslational integration of a protein into thylakoid membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 3789-3793
- Lindenstrauß U. & Brüser T. (2009). Tat transport of linker-containing proteins in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* 295, 135–140
- Liu L., McNeilage R.T., Lan-xin S., Theg S.M. (2014) ATP requirement for chloroplast protein import is set by the K_m for ATP hydrolysis of stromal Hsp70 in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* 26(3), 1246–1255

- Lorković Z.J., Schröder W.P., Pakrasi H.B., Irrgang K.D., Herrmann R.G., Oelmüller R. (1995). Molecular characterization of PsbW, a nuclear-encoded component of the photosystem II reaction center complex in spinach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(19), 8930–8934
- Ma X. & Cline K. (2013). Mapping the signal peptide binding and oligomer contact sites of the core subunit of the pea twin arginine protein translocase. *Plant Cell* 25(3), 999–1015
- Ma Q., Fite K., New C.P., Dabney-Smith C. (2018). Thylakoid-integrated recombinant Hcf106 participates in the chloroplast twin arginine transport system. *Plant Direct* 2(10), 1–13
- Malakhov M. P., Mattern M.R., Malakhova O.A., Drinker M., Weeks S.D., Butt T.R. (2004). SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *Journal of Structural and Functional Genomics* 5, 75–86
- Maldonado B., Kneuper H., Buchanan G., Hatzixanthis K., Sargent F., Berks B.C., Palmer T. (2011). Characterisation of the membrane-extrinsic domain of the TatB component of the twin arginine protein translocase. *FEBS Letters* 585(3), 478–484
- Mant A., Schmidt I., Herrmann R.G., Robinson C., Klösgen R.B. (1995) Sec-dependent thylakoid protein translocation. Δ pH requirement is dictated by passenger protein and ATP concentration. *Journal of Biological Chemistry* 270, 23275–23281
- Margulis L. (1970) Origin of eukaryotic cells. *Yale University Press (New Haven)*
- Marques J.P., Dudeck I., Klösgen R.B. (2003). Targeting of EGFP chimeras within chloroplasts. *Molecular Genetics and Genomics* 269(3), 381–387
- Maurer C., Panahandeh S., Jungkamp A.C., Moser M., Müller M. (2010). TatB functions as an oligomeric binding site for folded Tat precursor proteins. *Molecular Biology of the Cell* 21(23), 4151–4161
- McFadden G.I. (1999) Endosymbiosis and evolution of the plant cell. *Current Opinion in Plant Biology* 2, 513–519
- Mereschkowsky C. (1905) Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biologisches Zentralblatt* 25, 593–604
- Michl D., Robinson C., Shackleton J.B., Herrmann R.G., Klösgen R.B. (1994). Targeting of proteins to the thylakoids by bipartite presequences: CFoll is imported by a novel, third pathway. *EMBO Journal* 13, 1310–1317
- Molik, S. (2005) Das plastidäre Rieske Fe/S-Protein: Analyse des Transport- und Assemblierungsprozesses. Dissertation, *Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*

- Molik S., Karnauchoy I., Weidlich C., Herrmann R.G., Klösgen R.B. (2001) The Rieske Fe/S protein of the cytochrome b6/f complex in chloroplasts: missing link in the evolution of protein transport pathways in chloroplasts? *Journal of Biological Chemistry* 276, 42761–42766
- Monteferrante C.G, Baglieri J., Robinson C., van Dijl, J.M. (2012). TatAc, the third TatA subunit of *Bacillus subtilis*, can form active twin-arginine translocases with the TatCd and TatCy subunits. *Applied and Environmental Microbiology* 78(14), 4999–5001
- Moreau P., Bessoule J.J., Mongrand S., Testet E., Vincent P., Cassagne C., 1998. Lipid trafficking in plant cells. *Progress in Lipid Research* 37, 371–391
- Mori H. & Cline K. (2002). A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid Δ pH/Tat translocase. *Journal of Cell Biology* 157(2), 205–210
- Mori H., Summer E.J., Cline K. (2001). Chloroplast TatC plays a direct role in thylakoid Δ pH-dependent protein transport. *FEBS Letters* 501(1), 65–68
- Motohashi R., Nagata N., Ito T., Takahashi S., Hobo T., Yoshida S., Shinozaki K. (2001). An essential role of a TatC homologue of a Δ pH-dependent protein transporter in thylakoid membrane formation during chloroplast development in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(18), 10499–10504
- Mould R.M. & Robinson C. (1991). A proton gradient is required for the transport of two luminal oxygen-evolving proteins across the thylakoid membrane. *Journal of Biological Chemistry* 266(19), 12189–12193
- Müller M. & Klösgen R.B. (2005). The Tat pathway in bacteria and chloroplasts. *Molecular Membrane Biology* 22(1–2), 113–121
- Nakai M., Goto A., Nohara T., Sugita D., Endo T. (1994). Identification of the SecA protein homolog in pea chloroplasts and its possible involvement in thylakoidal protein transport. *The Journal of Biological Chemistry* 269(50), 31338–31341
- Neuhoff V., Stamm R., Eibl H. (1985) Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis* 6(9), 427448
- New C.P (2020). Analysis of Tha4 function and organization in chloroplast twin arginine transport. PhD thesis, *Miami University*.
- New C.P., Ma Q., Dabney-Smith C. (2018). Routing of thylakoid lumen proteins by the chloroplast twin arginine transport pathway. *Photosynthesis Research* 138, 289–301

- Nielsen V.S., Mant A., Knoetzel J., Møller B.L., Robinson C. (1994). Import of barley photosystem I subunit N into the thylakoid lumen is mediated by a bipartite presequence lacking an intermediate processing site: Role of the ΔpH in translocation across the thylakoid membrane. *Journal of Biological Chemistry* 269(5), 3762–3766
- Nilsson R., Brunner J., Hoffman N.E. and Van Wijk K.J. (1999) Interactions of ribosome nascent chain complexes of the chloroplast-encoded D1 thylakoid membrane protein with cpSRP54. *EMBO Journal* 18, 733–742
- Oates J., Barrett C.M.L., Barnett J.P., Byrne K.G., Bolhuis A., Robinson C. (2005). The *Escherichia coli* twin-arginine translocation apparatus incorporates a distinct form of TatABC complex, spectrum of modular TatA complexes and minor TatAB complex. *Journal of Molecular Biology* 346(1), 295–305
- Orriss G.L., Tarry M.J., Ize B., Sargent F., Lea S.M., Palmer T., Berks B.C. (2007). TatBC, TatB and TatC form structurally autonomous units within the twin arginine protein transport system of *Escherichia coli*. *FEBS Letters* 581 (21), 4091–4097
- Ouyang M., Li X., Ma J., Chi W., Xiao J., Zou M., Chen F., Lu C., Zhang, L. (2011). LTD is a protein required for sorting light-harvesting chlorophyll-binding proteins to the chloroplast SRP pathway. *Nature Communications* 2, 277
- Palmer T. & Stansfeld P.J. (2020). Targeting of proteins to the twin-arginine transport pathway. *Molecular Microbiology* 113(5)
- Perry S.E. & Keegstra K. (1994) Envelope membrane proteins that interact with chloroplastic precursor proteins. *Plant Cell* 6, 93–105
- Petru 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), 1–14
- Petterson P., Ye W., Jakob M., Tannert F., Klösgen R. B., Mäler L. (2018). Structure and dynamics of plant TatA in micelles and lipid bilayers studied by solution NMR. *FEBS Journal* 285, 1886–1906
- du Plessis D.J.F., Nouwen N., Driessen A.J.M. (2011). The Sec translocase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1808, 851–865
- Qbadou S., Becker T., Bionda T., Reger K., Ruprecht M., Soll J., Schleiff E. (2007). Toc64 - a preprotein-receptor at the outer membrane with bipartite function. *Journal of Molecular Biology* 367, 1330–1346
- Ramasamy S., Abrol R., Suloway C.J.M. and Clemons W.M. (2013). The glove-like structure of the conserved membrane protein TatC provides insight into signal sequence recognition in twin-arginine translocation. *Structure* 21(5), 777–788

- Rensink W. A., Schnell D. J., Weisbeek P.J. (2000). The transit sequence of ferredoxin contains different domains for translocation across the outer and inner membrane of the chloroplast envelope. *Journal of Biological Chemistry* 275, 10265–10271
- Richter S. & Lamppa G.K. (1998). A chloroplast processing enzyme functions as the general stromal processing peptidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(13), 7463–7468
- Richter S., Lindenstrauss U., Lücke C., Bayliss R., Brüser T. (2007). Functional tat transport of unstructured, small, hydrophilic proteins. *Journal of Biological Chemistry* 282(46), 33257–33264
- Robinson C., Cai D., Hulford A., Brock I. W., Michl D., Hazell L., Schmidt I., Herrmann R.G., Klösgen, R.B. (1994). The presequence of a chimeric construct dictates which of two mechanisms are utilized for translocation across the thylakoid membrane: evidence for the existence of two distinct translocation systems. *EMBO Journal* 13(2), 279–285
- Robinson C. & Ellis R.J. (1984). Transport of proteins into chloroplasts. Partial purification of a chloroplast protease involved in the processing of imported precursor polypeptides. *European Journal of Biochemistry* 142(2), 337–342
- Robinson C., Mant A. (1997). Targeting of proteins into and across the thylakoid membrane. *Trends in Plant Science* 2, 431–437
- Robinson C., Matos, C.F.R.O., Beck D., Ren C., Lawrence J., Vasisht N., Mendel S. (2011). Transport and proofreading of proteins by the twin-arginine translocation (Tat) system in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1808(3), 876–884
- Rocco M.A., Waraho-Zhmayev D., DeLisa M.P. (2012). Twin-arginine translocase mutations that suppress folding quality control and permit export of misfolded substrate proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 13392–13397
- Rodrigue A., Chanal A., Beck K., Müller M. and Wu L.F. (1999) Co-translocation of a periplasmic enzyme complex by a hitchhiker mechanism through the bacterial tat pathway. *Journal of Biological Chemistry* 274, 13223–13228
- Rodriguez F., Rouse S.L., Tait C.E., Harmer J., De Riso A., Timmel C.R., Sansom M.S.P., Berks B. C., Schnell J.R. (2013). Structural model for the protein-translocating element of the twin-arginine transport system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(12), E1092–1101
- Rollauer S.E., Tarry M.J., Graham J.E., Jaaskelainen M., Jager F., Johnson S., Krehenbrink M., Liu S. M., Lukey M.J., Marcoux J., Mcdowell M.A., Rodriguez F., Roversi P., Stansfeld P.J., Robinson C.V., Sansom M.S., Palmer T., Hogbom M., Berks B.C., Lea S.M. (2012). Structure of the TatC core of the twin-arginine protein transport system. *Nature* 492(7428), 210–214

- Rose P., Frobel J., Graumann P.L., Müller M. (2013) Substrate-dependent assembly of the Tat translocase as observed in live *Escherichia coli* cells. *PLOS ONE* 8, e69488
- Roy L.M. & Barkan A. (1998). A SecY homologue is required for the elaboration of the chloroplast thylakoid membrane and for normal chloroplast gene expression. *Journal of Cell Biology* 141(2), 385–395
- Rudolf M., Machettira A.B., Groß L.E., Weber K.L., Bolte K., Bionda T., Sommer M.S., Maier U. G., Weber A.P.M., Schleiff E., Tripp J. (2013). *In vivo* function of Tic22, a protein import component of the intermembrane space of chloroplasts. *Molecular Plant* 6, 817–829
- Ruthenberg N. (2014). Bakterielle Überexpression und Aufreinigung von antigenen Fragmenten der Untereinheiten der Tat-Translocase aus *Pisum sativum*. Wissenschaftliche Hausarbeit, *Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*
- Salvi G., De Los Rios P., Vendruscolo M. (2005). Effective interactions between chaotropic agents and proteins. *Proteins Structure Function and Bioinformatics* 61(3): 492–499
- Sambasivarao D., Turner R.J., Simala-Grant J.L., Shaw G., Hu J. and Weiner J.H. (2000). Multiple roles for the twin arginine leader sequence of dimethyl sulfoxide reductase of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 275, 22526–31
- Saraogi I. & Shan S.O (2014) Co-translational protein targeting to the bacterial membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* 1843, 1433–1441
- Sargent F., Bogsch E.G., Stanley N.R., Wexler M., Robinson C., Berks B.C., Palmer T. (1998). Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. *EMBO Journal*, 17 (13), 3640–3650
- Sargent F., Gohlke U., De Leeuw E., Stanley N.R., Palmer T, Saibil H.R., Berks B.C. (2001). Purified components of the *Escherichia coli* Tat protein transport system form a double-layered ring structure. *European Journal of Biochemistry* 268 (12), 3361–3367
- Sargent F., Stanley N.R, Berks B.C, Palmer T. (1999). Sec-independent protein translocation in *Escherichia coli*. A distinct and pivotal role for the TatB protein. *Journal of Biological Chemistry* 274, 36073–36082
- Schäfer K., Künzler P., Klingl A., Eubel H., Carrie C. (2020). The plant mitochondrial Tat pathway is essential for Complex III biogenesis. *Current Biology* 30(5), 840–853
- Schägger H., Cramer W.A., von Jagow G. (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by Blue Native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 217, 220–230

- Schägger H. & von Jagow G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochemistry* 199, 223–231
- Scherer P.E., Lederkremer G.Z., Williams S., Fogliano M., Baldini G., and Lodish H.F. (1996). Cab45, a novel (Ca²⁺)-binding protein localized to the Golgi lumen. *Journal Cell Biology* 133, 257–268
- Schimper A. (1883). Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörner. *Botanische Zeitung* 41, 105–114
- Schleiff E., Jelic M., Soll J. (2003a). A GTP-driven motor moves proteins across the outer envelope of chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 4604–4609
- Schlesier R. & Klösigen R.B. (2015). C-terminal truncation of a Tat passenger protein affects its membrane translocation by interfering with receptor binding. *Journal of Biological Chemistry* 396(4), 349–357
- Schlesier R. & Klösigen R.B. (2010). Twin arginine translocation (Tat)-dependent protein transport: the passenger protein participates in the initial membrane binding step. *Journal of Biological Chemistry* 391, 1411–1417
- Schnell D.J., Blobel G., Keegstra K., Kessler F., Ko K., Soll J. (1997) A consensus nomenclature for the protein-import components of the chloroplast envelope. *Trends in Cell Biology* 7, 303–304
- Schook W., Puszkin S., Bloom W., Ores C., Kochwa S. (1979). Mechanochemical properties of brain clathrin: Interactions with actin and alpha-actinin and polymerization into basketlike structures or filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 116–120
- Schubert M., Petersson U., Haas B. J., Funk C., Schröder W. P., Kieselbach T. (2002). Proteome map of the chloroplast lumen of *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* 277(10), 8354–8365
- Schünemann D., Amin P., Hartmann E., Hoffman N. E. (1999) 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, 12177–12182
- Schünemann D., Gupta S., Persello-Cartieaux F., Klimyuk V.I., Jones J.D., Nussaume L., Hoffmann N.E. (1998). A novel signal recognition particle targets light-harvesting proteins to the thylakoid membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 10312–10316
- Schwenkert S., Soll J., Bolter B. (2011). Protein import into chloroplasts - how chaperones feature into the game. *Biochimica et Biophysica Acta* 1808, 901–911

- Settles A.M., Yonetani A., Baron A., Bush D.R., Cline K., Martienssen R. (1997). Sec-independent protein translocation by the maize Hcf106 protein. *Science* 278(5342), 1467–1470
- Shi L.X. & Theg S.M. (2013). The chloroplast protein import system: From algae to trees. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1833(2), 314–331
- Scherer P.E., Manning-Krieg U.C., Jenö P., Schatz G. and Horst M. (1992). Identification of a 45-kDa protein at the protein import site of the yeast mitochondrial inner membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 11930–11934
- Singer S.J. and Nicolson G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720–731
- Smeekens S., Bauerle C., Hageman J., Keegstra K., Weisbeek P. (1986) The role of the transit peptide in the routing of precursors toward different chloroplast compartments. *Cell* 46, 365–375
- Smith M.D., Rounds C.M., Wang F., Chen K., Afithile M., Schnell D.J. (2004). atToc159 is a selective transit peptide receptor for the import of nucleus-encoded chloroplast proteins. *Journal of Cell Biology* 165, 323–334
- Sohrt K. & Soll J. (2000). Toc64, a new component of the protein translocon of chloroplasts. *Journal of Cell Biology* 148, 1213–1221.
- Sommer M. S and Schleiff E. (2009) Molecular interactions within the plant TOC complex. *Journal of Biological Chemistry* 390, 736–744
- Stahl T., Glockmann C., Soll J., Heins L. (1999). Tic40, a new “old” subunit of the chloroplast protein import translocon. *Journal of Biological Chemistry* 274, 37467–37472
- Stanley N.R. (2000). The Twin Arginine Consensus Motif of Tat Signal Peptides Is Involved in Sec-independent Protein Targeting in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 275(16), 11591–11596
- Steiner J.M., Kocher T., Nagy C., Löffelhardt W. (2002). Chloroplast SecE: evidence for spontaneous insertion into the thylakoid membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 293, 747–752
- Sutherland G.A., Grayson K.J., Adams N.B.P., Mermans D.M.J., Jones A.S., Robertson A.J., Auman D.B., Brindley A.A., Sterpone F., Tuffery P., Derreumaux P., Dutton P.L., Robinson C., Hitchcock A., Neil Hunter C. (2018). Probing the quality control mechanism of the *Escherichia coli* twin-arginine translocase with folding variants of a *de novo*-designed heme protein. *Journal of Biological Chemistry* 293(18), 6672–6681

- Sveshnikova N., Grimm R., Soll J., Schleiff E. (2000). Topology studies of the chloroplast protein import channel Toc75. *Biological Chemistry* 381, 687–693
- Tarry M.J., Schäfer E., Chen S., Buchanan G., Greene N.P., Lea, S.M., Palmer T., Saibil H.R., Berks B.C. (2009). Structural analysis of substrate binding by the TatBC component of the twin-arginine protein transport system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(32), 13284–13289
- Taubert J. & Brüser T. (2014) Twin-arginine translocation-arresting protein regions contact TatA and TatB. *Journal of Biological Chemistry* 395, 827–836
- Taw M., Boock J.T., Kim D., Rocco M.A., Waraho-Zhmayev D., DeLisa M.P. (2020). Twin-arginine translocase component TatB performs folding quality control via a general chaperone activity. *BioRxiv* (preprint) <https://doi.org/10.1101/2020.05.11.089458>
- Theg S.M., Bauerle C., Olsen L.J., Selman B.R., Keegstra K. (1989). Internal ATP is the only energy requirement for the translocation of precursor proteins across chloroplastic membranes. *Journal of Biological Chemistry* 264(12), 6730–6736
- Thomas J.D., Daniel R., Errington J. & Robinson C. (2001). Export of active green fluorescent protein to the periplasm by the twin-arginine translocase (Tat) pathway in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 39(1), 47–53
- Thompson S.J., Kim S.J., Robinson C. (1998). Sec-independent insertion of thylakoid membrane proteins: Analysis of insertion forces and identification of a loop intermediate involving the signal peptide. *Journal of Biological Chemistry* 273(30), 18979–18983
- Thompson S.J., Robinson C., Mant A. (1999) Dual signal peptides mediate the signal recognition particle / Sec-independent insertion of a thylakoid membrane polyprotein, PsbY. *Journal of Biological Chemistry* 274, 4059–4066
- Trösch R., Töpel M., Flores-Pérez Ú., Jarvis P. (2015b). Genetic and physical interaction studies reveal functional similarities between ALBINO3 and ALBINO4 in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 169, 1292–1306
- Tsukazaki T., Nureki O. (2011). The mechanism of protein export enhancement by the SecDF membrane component. *Biophysics (Nagoya-Shi)* 7, 129–133
- Ulfig A., Freudl R. (2018). The early mature part of bacterial twin-arginine translocation (Tat) precursor proteins contributes to TatBC receptor binding. *Journal of Biological Chemistry* 293(19):7281–7299
- Ulfig, A., Fröbel J., Lausberg F., Blümmel A. S., Heide A. K., Müller M., Freudl R. (2017). The h-region of twin-arginine signal peptides supports productive binding of bacterial Tat precursor proteins to the TatBC receptor complex. *Journal of Biological Chemistry* 292(26), 10865–10882

- Viitanen P.V., Doran E.R, Dunsmuir P. (1988). What is the role of the transit peptide in thylakoid integration of the light harvesting chlorophyll a/b protein? *Journal of Biological Chemistry* 263 15000–15007.
- Voelker R. & Barkan A. (1995). Two nuclear mutations disrupt distinct pathways for targeting proteins to the chloroplast thylakoid. *EMBO Journal* 14(16), 3905–3914
- Voorhees R.M. & Hegde R.S. (2016). Toward a structural understanding of co-translational protein translocation. *Current Opin in Cell Biology* 41, 91–99
- Waclawek M. (2016). Spinat als alternatives Modellsystem zur Analyse des Tat-abhängigen Membrantransports von Proteinen. Dissertation, *Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*
- Walker M.B., Roy L.M., Coleman E., Voelker R., Barkan A. (1999). The Maize *tha4* gene functions in Sec-independent protein transport in chloroplasts and is related to *hcf106*, *tatA*, and *tatB*. *Journal of Cell Biology* 147(2), 267–275
- Walther T.H., Gottselig C., Grage S.L., Wolf M., Vargiu A.V, Klein M.J., Vollmer S., Prock S., Hartmann M., Afonin S., Stockwald E., Heinzmann H., Nolandt O.V., Wenzel W., Ruggerone P., Ulrich, A.S. (2013). Folding and self-assembly of the TatA translocation pore based on a charge zipper mechanism. *Cell* 152, 316–326.
- Walther T.H., Grage S.L., Roth N., Ulrich A.S. (2010) Membrane alignment of the pore-forming component TatA(d) of the twin-arginine translocase from *Bacillus subtilis* resolved by solid-state NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* 132(45):15945–15956
- Weiner J.H., Bilous P.T., Shaw G.M., Lubitz S.P., Frost L., Thomas G.H., Cole J.A. Turner R.J. (1998). A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins. *Cell* 93(1), 93–101
- Weiss J.N. (1997). The Hill equation revisited: uses and misuses. *FASEB Journal* 835–841
- Wexler M., Sargent F., Rachael L., Stanley N.R., Bogsch E.G., Robinson C., Berks B.C., Palmer T. (2000). TatD Is a Cytoplasmic Protein with DNase Activity: No requirement for TatD Sec-independent protein export. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 16717–16722
- Wienk H. L., Czisch M., de Kruijff B. (1999). The structural flexibility of the preferredoxin transit peptide. *FEBS Letters* 453, 318–326
- Woolhead C.A., Thompson S.J., Moore M., Tissier C., Mant A., Rodger A., Henry R., Robinson C. (2001). Distinct Albino3-dependent and-independent pathways for thylakoid membrane protein insertion. *Journal of Biological Chemistry* 276, 40841–40846
- Yen M.R., Tseng Y.H., Nguyen E.H., Wu L.F., Saier M.H. (2002). Sequence and phylogenetic analyses of the twin-arginine targeting (Tat) protein export system. *Archives of Microbiology* 177(6), 441–450

- Yi L. & Dalbey R.E. (2005). Oxa1/Alb3/YidC system for insertion of membrane proteins in mitochondria, chloroplasts and bacteria. *Molecular Membrane Biology* 22(1–2), 101–111
- Yuan J. & Cline K. (1994). Plastocyanin and the 33-kDa subunit of the oxygen-evolving complex are transported into thylakoids with similar requirements as predicted from pathway specificity. *Journal of Biological Chemistry* 269(28), 18463–18467
- Yuan J., Henry R., McCaffery M. and Cline K. (1994) SecA homolog in protein transport within chloroplasts: evidence for endosymbiont-derived sorting. *Science* 266, 796–798.
- Yuan J., Kight A., Goforth R. L., Moore M., Peterson E. C., Sakon J., Henry, R. (2002). ATP stimulates signal recognition particle (SRP)/FtsY-supported protein integration in chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry* 277(35), 32400–32404
- Yu Y., Wang J., Shao Q., Shi J., Zhu W. (2016). The effects of organic solvents on the folding pathway and associated thermodynamics of proteins: a microscopic view. *Scientific Reports* 6, 19500.
- Zhang Y., Wang L., Hu Y., Jin C. (2014a). Solution structure of the TatB component of the twin-arginine translocation system. *Biochimica et Biophysica Acta* 1838(7), 1881–1888
- Zinecker S., Jakob M., Klösigen R. B. (2020). Functional reconstitution of TatB into the thylakoidal Tat translocase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1867(2), 118606
- Zoufaly S., Fröbel J., Rose P., Flecken T., Maurer C., Moser M., Müller M. (2012). Mapping precursor-binding site on TatC subunit of twin arginine-specific protein translocase by site-specific photo cross-linking. *Journal of Biological Chemistry* 287(16), 13430–13441
- Zybailov B., Rutschow H., Friso G., Rudella A., Emanuelsson O., Sun Q., van Wijk K.J. (2008). Sorting signals, N-terminal modifications and abundance of the chloroplast proteome. *PLoS One* 3, e1994
- Zygadlo A., Robinson C., Scheller H. V., Mant A. & Jensen P.E (2006) The properties of the positively charged loop region in PSI-G are essential for its 'spontaneous' insertion into thylakoids and rapid assembly into the photosystem I complex. *Journal of Biological Chemistry* 281, 10548–10554

Publikationen

Zinecker S., Jakob M., Klösgen R.B. (2020). Functional reconstitution of TatB into the thylakoidal Tat translocase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1867 (2), 118606

Alanen H.I, Walker K.L, Lourdes Velez Suberbie M., Matos C.F.R.O, **Bönisch S.**, Freedman R.B., Keshavarz-Moore E., Ruddock L.W., Robinson C. (2015). Efficient export of human growth hormone, interferon α 2b and antibody fragments to the periplasm by the Escherichia coli Tat pathway in the absence of prior disulfide bond formation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1853(3), 756–763.

Danksagung

Die Arbeit ist geschrieben, die gefüllten Umzugskartons stapeln sich bereits und nun heißt es wohl oder übel Abschied nehmen. Ich blicke zurück auf einige herausfordernde, anspruchsvolle und schöne Jahre.

So möchte ich mich zuallererst bei meinem Betreuer **Prof. Dr. Rabe Klösigen** für das entgegengebrachte Vertrauen in meine Fähigkeiten zur Bearbeitung einer Dissertation bedanken. Ich verdanke ihm, dass ich mich mit der TatB-Rekonstitution beschäftigen durfte. Ein Thema, das mir wirklich sehr ans Herz gewachsen ist, auch wenn es mir durchaus einige schlaflose Nächte bereitete. Rückblickend betrachtet lässt sich meine Doktorandenzeit im Labor als sehr (TatBC-)komplexe Wanderung mit einigen Höhen und Tiefen beschreiben. Ich verdanke Rabe Klösigen jede erdenkliche Unterstützung bei der *geordneten* Bearbeitung meines Projekts. So war es immer möglich, Daten gemeinsam auszuwerten, zu diskutieren und neue Denkansätze zu schaffen. Ich war sehr zufrieden mit der gewährten Freiheit bei der Planung und Durchführung meiner Experimente. Ich denke außerdem gern an viele interessante Gespräche über Zimmerlinden und kalten Kaffee zurück.

Bei **Dr. Mario Jakob** möchte ich mich für die unermüdliche Hilfs- und Diskussionsbereitschaft sowie Unterstützung während des Schreibprozesses bedanken. Besonders in Erinnerung wird mir bleiben, dass jedes ungelöste Problem „erst einmal nicht so schlimm“ war und dass eigentlich immer irgendwo Tat-Proteine in der *pipeline* waren, wenn ich sie am Dringendsten benötigte. In diesem Sinne möchte ich mich auch bei **Birgit Kretschmann** als Triebkraft in der Proteinschmiede 253 bedanken. Besonders in der finalen Phase war ich froh über jedes Protein, das schon gereinigt vorlag und direkt im Rekonstitutionsversuch zum Einsatz kommen konnte. Ich erinnere mich außerdem gern an viele lustige Gespräche und bedanke mich für die Unterstützung bei experimentellen Fragestellungen.

Matthias Reimers und ich sind (fast) zeitgleich als wissenschaftliche Mitarbeiter in das Doktorandendasein gestartet. Ich bedanke mich für die großartige gemeinsame Zeit und deine immerwährende Hilfsbereitschaft – vor allem in der finalen *last minute*-Korrekturlese. Du warst ein genialer Kollege und bist ein sehr guter Freund, auf den ich mich immer verlassen kann. Mit **Jana Kungel** als Teil des Tat-Teams habe ich einen weiteren großartigen und humorvollen Menschen kennengelernt. Vielen Dank für deine allumfassende Unterstützungs- und Motivationsbereitschaft sowie die zahlreich *geschriebenen* Sprachnachrichten.

Ich möchte mich auch bei meinen früheren Laborkolleginnen **Dr. Mandy Waclawek** und **Julia Dittmar** bedanken. Es hat Spaß gemacht, mit euch zusammenzuarbeiten und ich bin euch dankbar für euren Beistand im ganz normalen Laboralltag. Ich bin froh, dass wir uns nie aus den Augen verloren haben und neben der Arbeit viele wunderbare Erinnerungen teilen. Ich danke Mandy außerdem für die tatkräftige Unterstützung in den letzten sechs Monaten.

Auch **Dr. Mayank Sharma** bleibt mir mit seiner aufgeschlossenen und humorvollen Art in Erinnerung. Danke für die vielen fachspezifischen Diskussionen und lustigen Gespräche.

Ich danke **Dr. Bationa Bennewitz** für die grandiose Idee, TatB in der TatA-vermittelten Rekonstitution zu testen. Dieses Thema und der insgesamt hilfreiche Diskurs im Progress haben meiner Arbeit und auch meiner Motivationen neuen Aufschwung gegeben.

Ich bedanke mich bei **Ulrike Gosdzinski** für die Hinweise zur Immundetektion von TatA. Darüber hinaus war es ein guter Tipp von dir, den His-HRP-Antikörper zu testen.

Ebenfalls bin ich froh, **Leander Ehmke**, **Franziska Tannert** und **Viktoria Burgdorf** als sympathische und hilfsbereite Kollegen kennengelernt zu haben.

Es war spannend und herausfordernd für mich, mit **Mario Riedel** und **Georg Redlich** zusammenzuarbeiten. Ich habe mit Freude dabei zugesehen, wie ihr eure Bachelorprojekte verwirklicht habt.

Mein Dank richtet sich außerdem an **René Hauer** für die intensive Auseinandersetzung mit der TatA-vermittelten Transportrekonstitution. Ebenfalls freue ich mich, dass **Dr. René Schlesier** weiterhin ein ungebrochenes Interesse am Tat-Transportweg hat und stets diskussionsbereit ist.

Norbert Ruthenberg danke ich, dass er mit der Reinigung des TatB-Antigens den Grundstein für die TatB-vermittelte Rekonstitution gelegt hat.

Durch die Zusammenarbeit mit **Dr. Jeremy Sloan** konnte ich mich erstmals experimentell mit dem SRP-Transportweg beschäftigen und bin dankbar für die durchgeführten *in thylakoido*-Versuche und freue mich vor allem über die positiven Ergebnisse.

Bei **Michael Röser**, **Peter Borkner** und **Siegfried Platzer** möchte ich mich für die Reparatur von Geräten, Behebung technischer Probleme und die Unterstützung im Gewächshaus bedanken.

Schließlich richtet sich ein ganz besonderes Dankeschön an meine **Eltern, Großeltern** und **Tobias**. Danke, dass ihr immer für mich da gewesen seid, mich unterstützt habt und in kritischen Experimentier- und Schreibphasen stets motivierende Worte finden konntet.

Christin, ich bin dir unendlich dankbar, dass du es schon seit der Abiturphase mit mir aushältst und immer an mich glaubst. Ich weiß, dass dir ein Stein vom Herzen fällt, wenn ich die Arbeit endlich abgegeben habe und danke dir für dein unerschütterliches Durchhaltevermögen und deine Liebe.

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Sarah Zinecker

Halle (Saale), 07.02.2021

 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Sarah Zinecker (geb. Bönisch)
 geboren: 14.01.1991 in Halle (Saale)

BERUFLICHER WERDEGANG

12.2015 – 11.2019 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pflanzenphysiologie
 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

06.2014 – 08.2014 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Pflanzenphysiologie
 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

STUDIUM UND WEITERBILDUNG

12.2015 – 11.2020 Promotion in der Arbeitsgruppe Prof. Klösgen
 Institut für Pflanzenphysiologie
 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Thema: Funktionelle Rekonstitution von TatB in die thylakoidäre Tat-
 Translokase

10.2012 – 09.2015 Master of Science Biologie in der Arbeitsgruppe Prof. Klösgen
 Institut für Pflanzenphysiologie
 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Thema: Untersuchungen zur Assemblierung von TatB in die
 thylakoidären Tat-Komplexe von *Pisum sativum*

10.2009 – 10.2012 Bachelor of Science Biologie in der Arbeitsgruppe Prof. Heilmann
 Institut für Biochemie und Biotechnologie
 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Thema: Expression, Reinigung und Charakterisierung einer PI4P5-
 Kinase aus *Nicotiana tabacum*

SCHULBILDUNG

08.2003 – 07.2009 Allgemeine Hochschulreife - Gymnasium am Markt, Hettstedt

08.2001 – 06.2003 Sekundarschule Gerbstedt

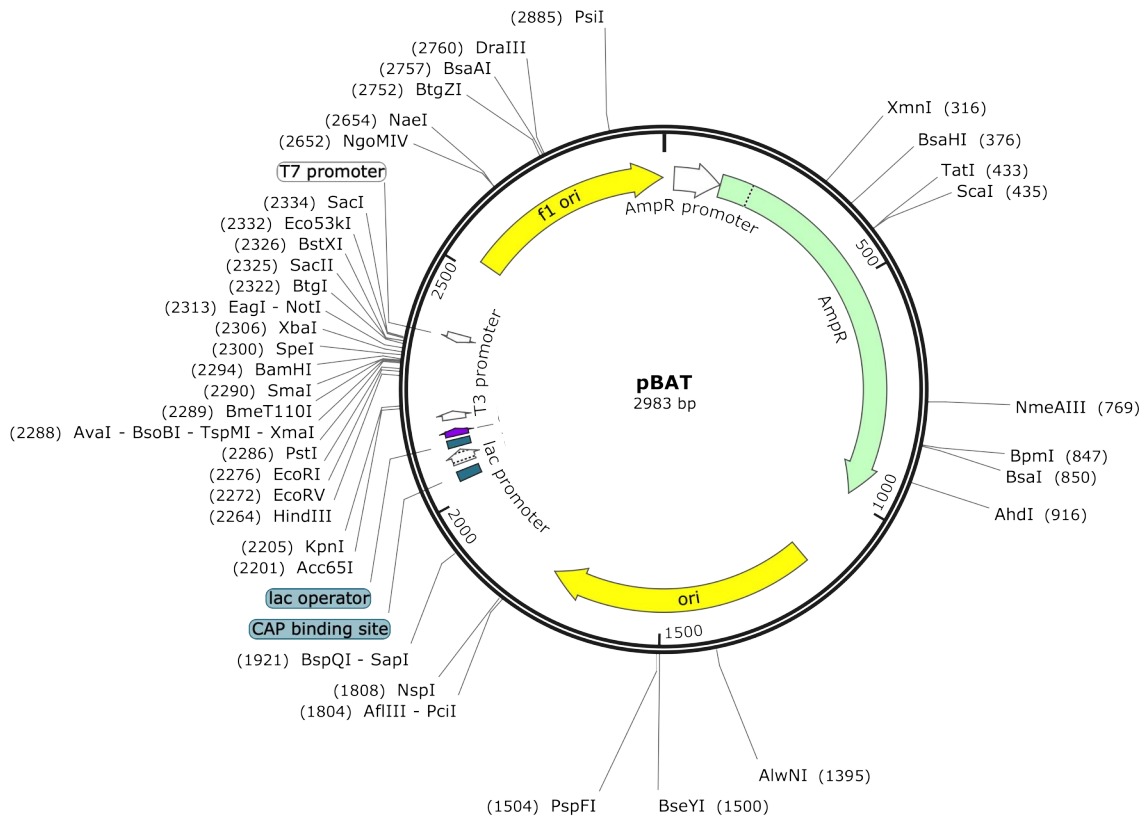
08.1997 – 06.2001 Grundschule „Rosa Luxemburg“ Halle (Saale)

Sarah Zinecker

Halle (Saale), 07.02.2021

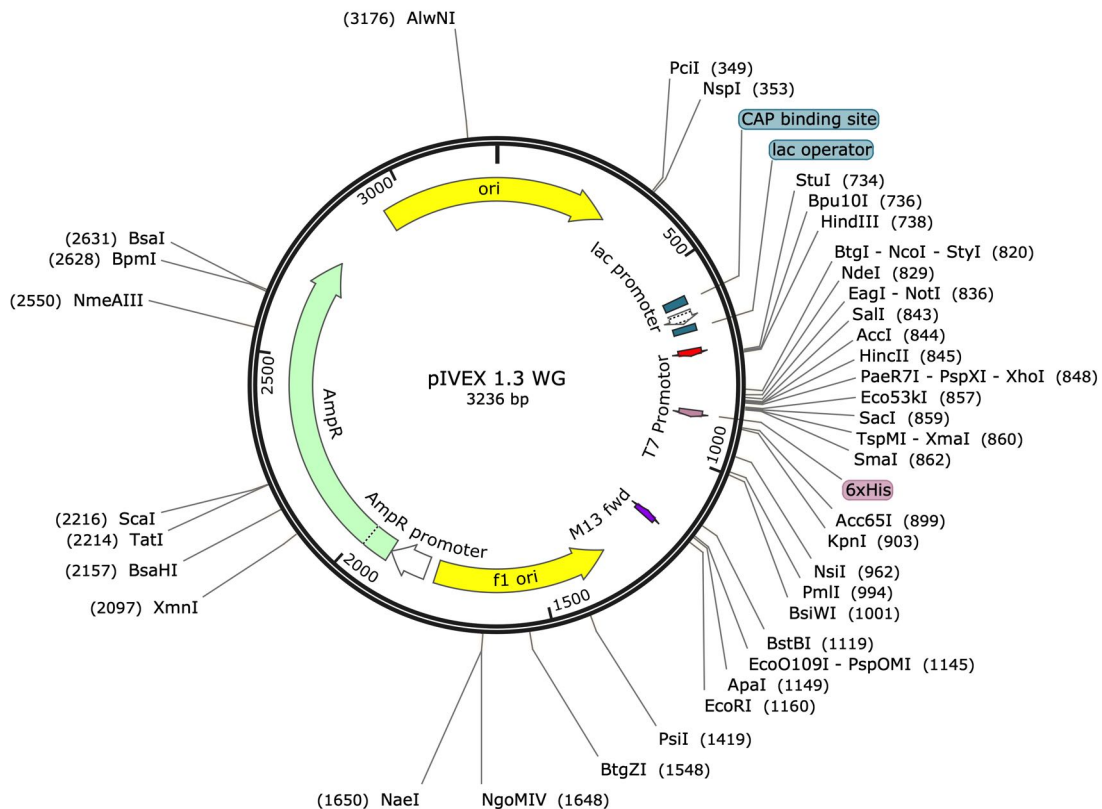
Anhang

Created with SnapGene®

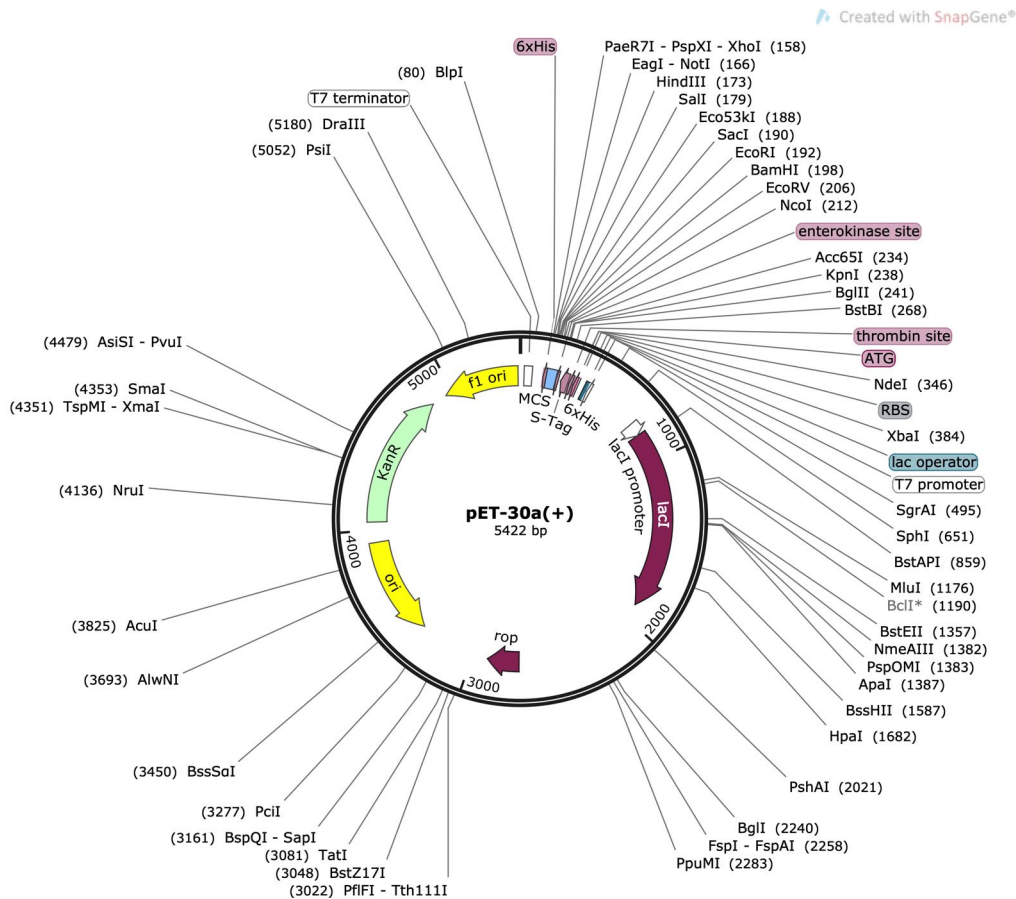


Anhang 1: Vektorkarte von pBAT

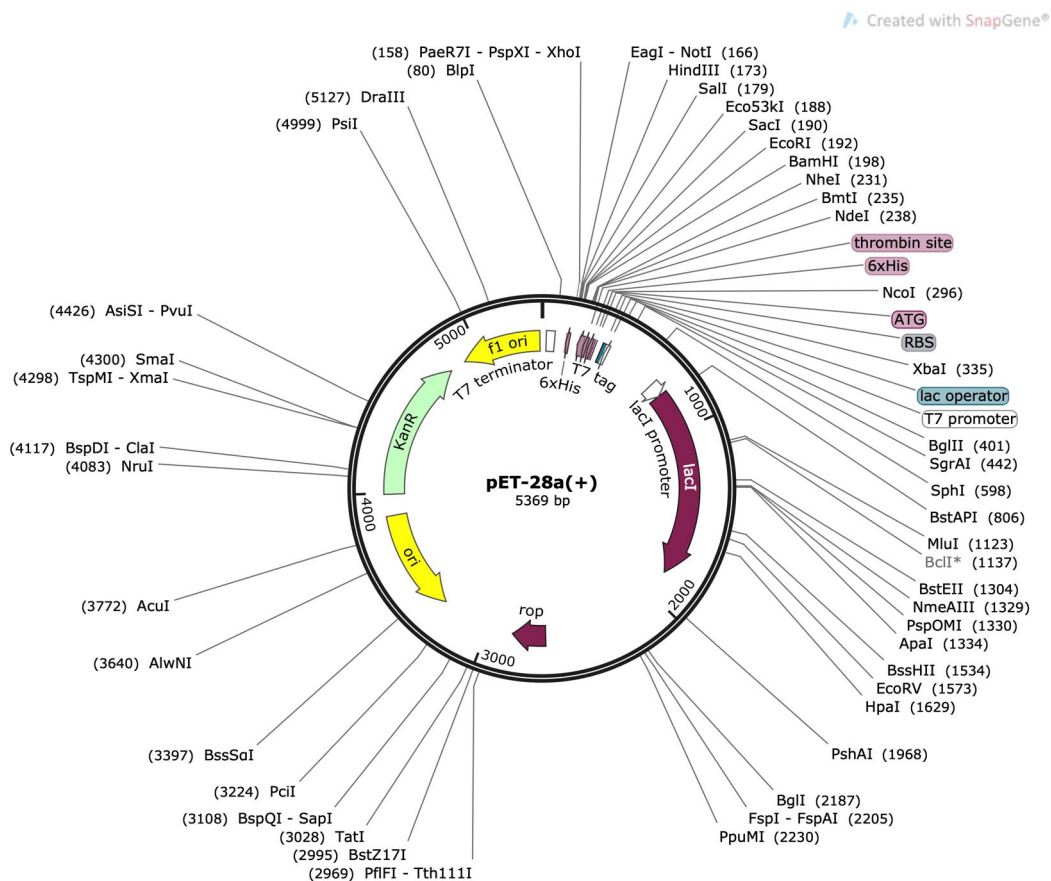
Created with SnapGene®



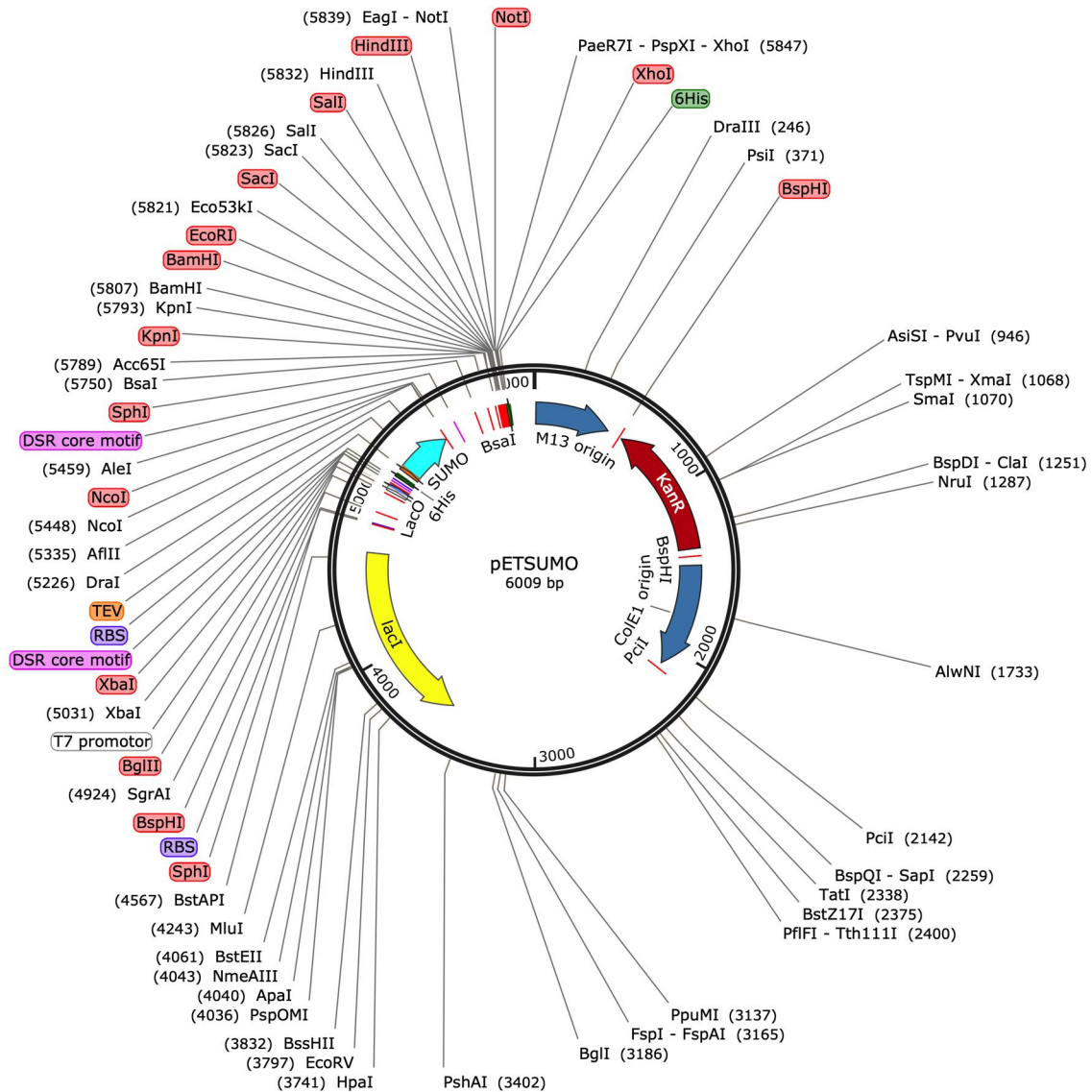
Anhang 2: Vektorkarte von pIVEX 1.3 WG



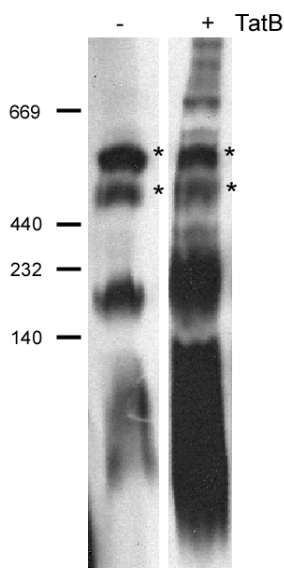
Anhang 3: Vektorkarte von pET30a



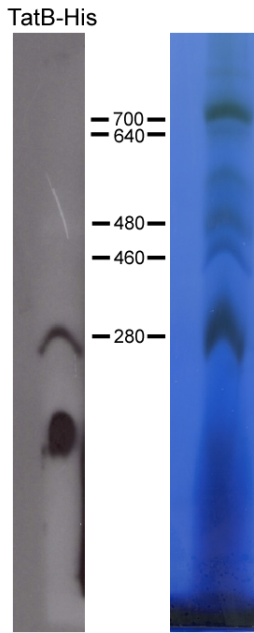
Anhang 4: Vektorkarte von pET28a



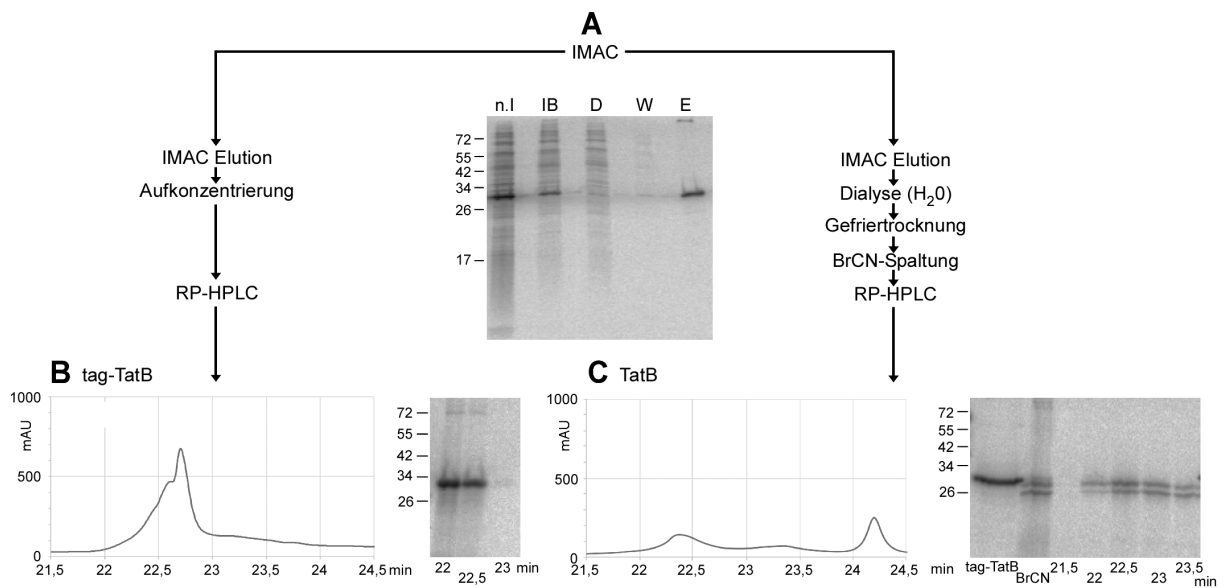
Anhang 5: Vektorkarte von pETSUMO



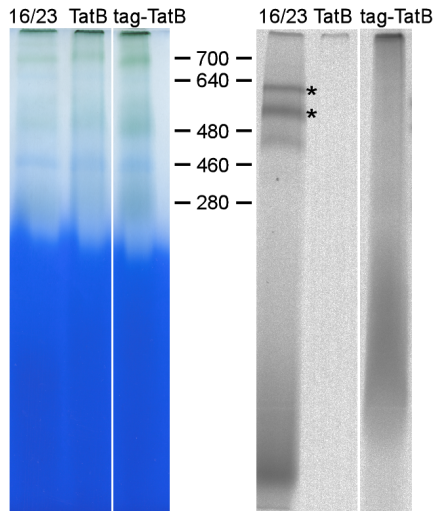
Anhang 6: Western Blot-Analyse von intrinsischem und extern zugegebenem TatB nach Blue Native-PAGE. Erbsenthylakoide, entsprechend 60 µg, wurden 5 min auf Eis mit HM (-) oder mit 0,5 µM gereinigtem TatB inkubiert. Nach Solubilisierung der Thylakoidmembranproteine wurden diese über ein 5 – 13,5 %iges Blue Native-PAA-Gradientengel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Weitere Informationen zur Blue Native-PAGE-Analyse sind in Abbildung 3.8 angegeben. Zur Immundetektion von TatB mittels ECL (enhanced chemiluminescence) wurde die Membran 2 h mit anti-TatB-Antikörper (*Pisum sativum*) und anschließend 1 h mit horseradish Peroxidase-konjugiertem anti-rabbit IGG inkubiert. Weitere Informationen zur Western Blot-Analyse sind in Kapitel 2.2.2.17 angegeben.



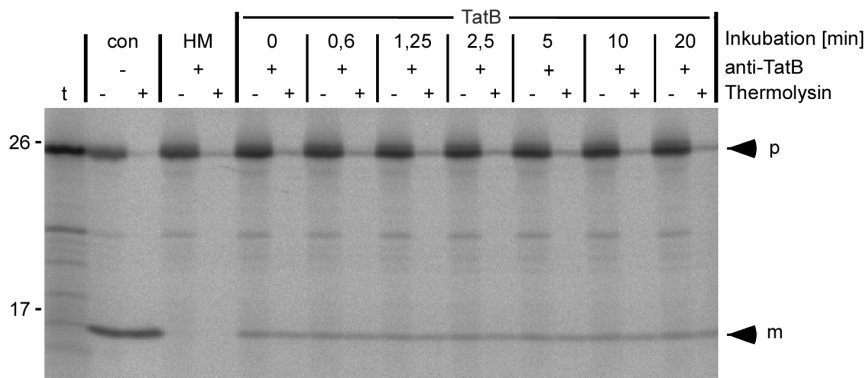
Anhang 7: Western Blot-Analyse von extern zugegebenem TatB-His nach Blue Native-PAGE. Erbsenthylakoide, entsprechend 60 µg, wurden 5 min auf Eis mit 0,5 µM gereinigtem TatB-His inkubiert. Nach Solubilisierung der Thylakoidmembranproteine wurden diese über ein 5 – 13,5 %iges Blue Native-PAA-Gradientengel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Weitere Informationen zur Blue Native-PAGE-Analyse sind in Abbildung 3.8 angegeben. Zur Immundetektion von TatB-His (links) mittels ECL (*enhanced chemiluminescence*) wurde die Membran 1 h mit anti-His-HRP-Antikörperkonjugat (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) inkubiert. Die Membran dient als Ladekontrolle (rechts). Weitere Informationen zur Western Blot-Analyse sind in Kapitel 2.2.2.17 angegeben.



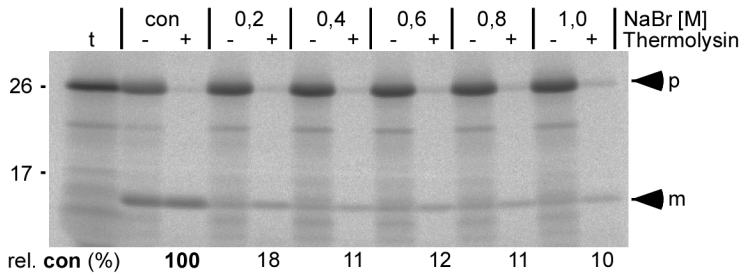
Anhang 8: Heterologe Synthese und Reinigung von radioaktiv markiertem tag-TatB_M. (A) Nach Synthese in *E. coli* liegt TatB als Fusionsprotein mit N-terminalem His/S-tag (*tag*) vor, welches über IMAC gereinigt wird. Das Eluat wird entweder mit verbleibender *tag*-Region gereinigt (Flieβschema links) oder zuvor einer Bromcyan-Spaltung unterzogen (Flieβschema rechts). „n.I“: nach Induktion; „IB“: *inclusion bodies* vor Säule; „D“: Durchfluss; „W“: Waschung; „E“: Elution. In (B) und (C) sind Ausschnitte der Chromatogramme der RP-HPLC Reinigungen von *tag*-TatB und TatB dargestellt (mAU: *mili absorption units*, Detektionswellenlänge 220 nm). Die Fraktionierung der Proteinproben erfolgte von 21,5 – 23,5 min in 30 Sekunden Schritten, die Fraktion ab 23,5 min wurde für 1 min gesammelt (bis 24,5 min). 30 µl der einzelnen Fraktionen wurden über 15 %ige SDS-PAA-Gele aufgetrennt und via Autoradiographie visualisiert. Zur Kontrolle der Spaltreaktion in (C) wurde *tag*-TatB_M im stöchiometrischen Verhältnis zur BrCN-Spaltreaktion (BrCN = Bromcyan) aufgetragen.



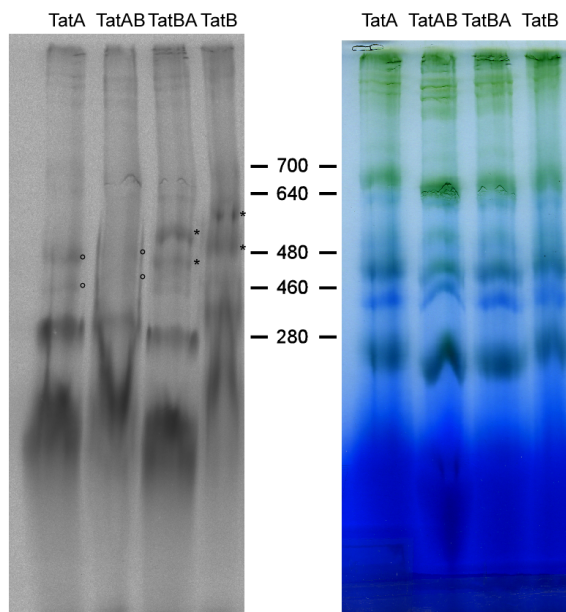
Anhang 9: Membranintegration von gereinigtem und radioaktiv markiertem *tag-TatB_M* bzw. *TatB_M*. Erbsenthylakoide, entsprechend 60 µg, wurden 5 min auf Eis mit 16/23 (*Rabbit Reticulocyte Lysate System*) oder mit den Proteinen TatB bzw. *tag-TatB*, welche in Anwesenheit von ³⁵S-Methonin ausgehend vom pET30a-Vektor in *E. coli* synthetisiert wurden, inkubiert. Dazu wurden die RP-HPLC-Fractionen (Anhang 8 B und C) der gereinigten Proteine *tag-TatB* (Fraktion 22 und 22,5 min) und TatB (Fraktion 22–23,5 min) gefriergetrocknet, in 100 µl HM-Puffer aufgenommen, bei 160.000 x g (4 °C) zentrifugiert. Die Überstände wurden schließlich zu Thylakoiden hinzugefügt. Nach Solubilisierung der Thylakoidmembranproteine wurden diese über 5–13,5 %ige *Blue Native*-PAA-Gradientengele aufgetrennt (links) und mittels Autoradiographie (rechts) visualisiert. Weitere Informationen zur *Blue Native*-PAGE-Analyse sind in Abbildung 3.8 angegeben.



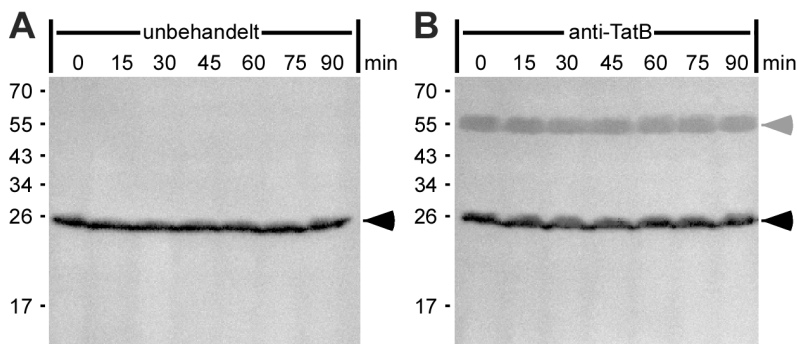
Anhang 10: Einfluss der Vorinkubation von TatB auf die TatB-vermittelte Rekonstitution des Tat-Transports. Unbehandelte (con) oder mit TatB-spezifischem Antikörper behandelte Thylakoide (HM), entsprechend 30 µg Chlorophyll, wurden mit 5 µl pOEC16 versetzt. Im Rekonstitutionsversuch wurden anti-TatB-behandelte Thylakoide vor Zugabe von pOEC16 für die über den Spalten angegebenen Zeiten mit 0,5 µM TatB auf Eis inkubiert. Die Transportzeit betrug 10 min. Weitere Details zum *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuch sind Abbildung 3.3 zu entnehmen.



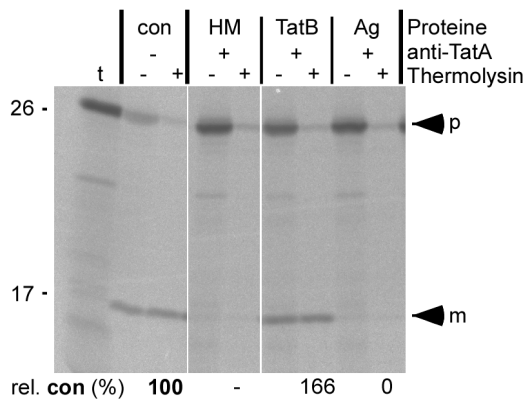
Anhang 13: Einfluss von NaBr auf den Tat-Transport. Thylakoide, entsprechend 30 µg Chlorophyll, wurden 30 min auf Eis mit 0,2 – 1 M NaBr inkubiert und anschließend zwei Waschungen unterzogen. pOEC16 (5 µl) wurde 10 min in unbehandelte (con) und NaBr-behandelte Thylakoide transportiert. Die relative Menge des transportierten Substrats (m) wurde auf die Transportreaktion unbehandelter Thylakoide (con) bezogen. Weitere Details zum *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuch sind Abbildung 3.3 zu entnehmen.



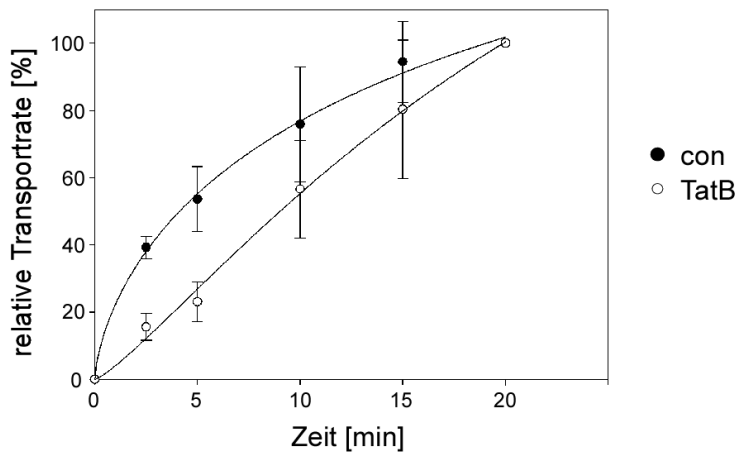
Anhang 14: Membranbindung und -integration von *in vitro* synthetisiertem und radioaktiv markiertem TatA, TatB, TatAB und TatBA II. Frisch präparierte Thylakoide, entsprechend 60 µg Chlorophyll, wurden mit je 10 µl TatA, TatAB, TatBA oder TatB versetzt und 5 min auf Eis inkubiert. Nach Solubilisierung der Thylakoidmembranproteine wurde die Proben via *Blue Native*-PAGE aufgetrennt. Links ist das Autoradiogramm des Gels (rechts) abgebildet. Weitere Details sind Abbildung 3.27 zu entnehmen.



Anhang 15: Stabilität von intrinsischem TatB nach Antikörperbehandlung. Unbehandelte Thylakoide (A) und anti-TatB-behandelte Thylakoide (B) wurden für die oberhalb der Spuren angegebenen Zeiten auf Eis inkubiert und im Anschluss zweifach mit HM-Puffer gewaschen. Stöchiometrische Menge jeder Probe, entsprechend 7,5 µg Chlorophyll wurden über 15 %ige SDS-PAA Gele aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Zur Immundetektion von TatB mittels ECL (*enhanced chemiluminescence*) wurde die Membran 2 h mit anti-TatB-Antikörper (*Arabidopsis thaliana*) und anschließend für 1 h mit *horseradish Peroxidase*-konjugiertem anti-rabbit IGG inkubiert. Die Position von intrinsischem TatB ist mit schwarzen Pfeilköpfen gekennzeichnet. Die grauen Pfeilköpfe zeigen die Position der schweren Kette des anti-TatB-Antikörpers an. Weitere Informationen zur Western Blot-Analyse sind in Kapitel 2.2.2.17 angegeben.



Anhang 17: Rekonstitution des Tat-Transports anti-TatA-behandelter Thylakoide mit gereinigten TatB und TatB-Antigen aus *P. sativum*. Unbehandelte (con) oder mit TatB-spezifischem Antikörper behandelte Thylakoide (HM), entsprechend 30 µg Chlorophyll, wurden mit 5 µl pOEC16 versetzt. Die Rekonstitutionsreaktionen anti-TatA-behandelter Thylakoide wurden vor Zugabe des Tat-Substrats mit HM bzw. TatB oder TatB-Antigen (Ag) versetzt, wobei die Endkonzentration der Einzelproteine bei 0,5 µM lag. Die Transportreaktion wurde 10 min durchgeführt. Die relative Menge des transportierten Substrats (m) wurde auf die Transportreaktion unbehandelter Thylakoide (con) bezogen. Weitere Details zum *in thylakoido*-Rekonstitutionsversuch sind Abbildung 3.3 zu entnehmen.



Anhang 18: Kinetik des Tat-Transports unbehandelter und rekonstituierter Thylakoide. Der Transport des Substrats wurde nach Wiederholung des in Abbildung 3.15 A dargestellten Experiments ($n = 3$) quantifiziert. Die relative Menge des murenen OEC16 wurde für jeden Zeitpunkt der Kontrollreaktionen (con) im Vergleich zur 20-minütigen Kontrollreaktion (con) bestimmt, für Rekonstitutionsreaktionen (TatB) wurde die relative Menge des murenen Proteins im Vergleich zur 20-minütigen Rekonstitutionsreaktion (TatB) bestimmt. Schwarze Kreise: Kontrolltransport unbehandelter Thylakoide (con), weiße Kreise: TatB-Rekonstitution (TatB).

Anhang 19: Aminosäuresequenzen gereinigter Tat-Proteine

siehe Kapitel 2.1.13.2: Tat-Komponenten, Konstrukte zur heterologen Synthese

TatA (*A. thaliana*)

10 20 30 40 50 60
 ALFGLGVPEL AVIAGVAALL FGPKKLPEIG KSIGKTVKSF QQAAKEFESE LKTEPEESVA

70 80
 ESSQVATSNK EEEKKTEVSS SSKENV

TatA (*P. sativum*)

10 20 30 40 50 60
 AFFGLGVPEL VVIAGVAALV FGPKKLPEVG RSIGQTVKSF QQAAKEFETE LKKEPNPTEE

70 80
 ISVASEQEKQ DIKVSSTKDN V

TatB (*A. thaliana*)

10 20 30 40 50 60
 ASLFGVGAPE ALVIGVVALL VFGPKGLAEV ARNLGKTLRT FQPTIRELQD VSRDFKSTLE

70 80 90 100 110 120
 REIGLDDIST PNVYNQNRNTN PVQPPPPPPP PSVPSTEAPV TANDPNDSQS PKAYTSEDYL

130 140 150 160 170
 KFTEEQLKAL SPAESQTEDQ TQTQEPPOPT TVQTPTGESQ PNGTARETTA ASPPRQD

TatB-core (*A. thaliana*)

10 20 30 40 50 60
 ASLFGVGAPE ALVIGVVALL VFGPKGLAEV ARNLGKTLRT FQPTIRELQD VSRDFKSTLE

70 80 90 100
 REIGLDDIST PNVYNQNRNTN PVQPPPPPPP PSVPSTEAPV TANDPN

TatB (*P. sativum*)

10 20 30 40 50 60
 ASLFGVGAPE ALVIGVVALL VFGPKGLAEV ARNLGKTLRE FQPTIREIQD VSREFKSTLE

70 80 90 100 110 120
 REIGIDDITN PLQSTYSSNV RNTTPTPSAT EITNNSQTAV DPNGKVDESK AYSSEEYLKI

130 140 150 160 170
 TEEQLKAVAA QQEQTSPPK EDEIEQQIQP PANETAATVP PPQKPESESS LPSDL

TatB-core (*P. sativum*)

10 20 30 40 50 60
 ASLFGVGAPE ALVIGVVALL VFGPKGLAEV ARNLGKTLRE FQPTIREIQD VSREFKSTLE
 70 80 90 100
 REIGIDDITN PLQSTYSSNV RNTTPTPSAT EITNNSQTAV DPN

TatB-Antigen (*P. sativum*)

10 20 30 40 50 60
 MGPKGLAEVA RNLGKTLREF QPTIREIQDV SREFKSTLER EIGIDDITNP LQSTYSSNVR
 70 80 90 100 110 120
 NTTTPTSATE ITNNSQTAVD PNGKVDESKA YSSEEYLKIT EEQLKAVAAQ QQEQTSSPKE
 130 140 150 160
 DEIEQQIQPP ANETAATVPP POKPESESSL PSDLLEHHHH HH

TatAB (*P. sativum*)

10 20 30 40 50 60
AFFGLGVPEL **VVIAGVAAL**V **FGPKGLAEVA** RNLGKTLREF QPTIREIQDV SREFKSTLER
 70 80 90 100 110 120
 EIGIDDITNP LQSTYSSNVR NTTTPTSATE ITNNSQTAVD PNGKVDESKA YSSEEYLKIT
 130 140 150 160 170
 EEQLKAVAAQ QQEQTSSPKE DEIEQQIQPP ANETAATVPP POKPESESSL PSDL

TatBA (*P. sativum*)

10 20 30 40 50 60
 ASLFGVGAPE ALVIGVVALL VFGPK**KLPEV** **GRSIGQTVKS** **FQQA**KEFET **ELKKEPNPTE**
 70 80
EISVASEQEK **QDIKVSSTKD** NV