

**Zum Tat-abhängigen Proteintransport an der
Thylakoidmembran:
Membraninteraktion, Rezeptorbindung und
Translokation des chimären 16/23 Proteins**

Dissertation

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –
der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Herrn René Schlesier
geb. am 29.08.1983 in Merseburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. Ralf Bernd Klösger
2. Prof. Dr. Klaus Humbeck
3. Prof. Dr. Matthias Müller

Tag der öffentlichen Verteidigung: 31.03.2015

*„Der Fortgang der wissenschaftlichen Entwicklung ist im
Endeffekt eine ständige Flucht vor dem Staunen.“*

Albert Einstein (1879-1955)

Summary

The thylakoid membrane system, as a central location of photosynthetic activity in plants, harbors a huge number of soluble and membrane proteins, which were either translocated into the thylakoid lumen or inserted into the thylakoid membrane by use of four known transport pathways. One of these pathways is the Tat-dependent protein transport that exists not only at the thylakoid membrane of plants but also at the cytoplasmic membrane of bacteria and archaea. This transport pathway is characterized in particular by its ability to promote the translocation of fully folded proteins across ion-tight membranes in presence of a proton gradient (ΔpH) and/or an electric potential ($\Delta\Psi$). In the thylakoid system, this is enabled by the Tat-translocase consisting of the three membraneous proteins TatA, TatB, and TatC. While TatB and TatC form a substrate binding receptor complex, TatA promotes translocation of the substrate in an until now unknown manner. The Tat-substrates carry a specific Tat-signal peptide with a conserved twin pair of arginines, which led to the term of this pathway (Tat = twin arginine translocation). This motif enables the binding of the Tat-substrate to the translocase and finally also the actual transport of the passenger protein. Following membrane translocation the Tat-signal peptide is generally removed by a processing peptidase.

Using the chimeric 16/23 Protein, which shows drastically retarded transport behaviour, Tat-transport can be divided into consecutive steps including direct membrane interaction, TatBC receptor binding, and the TatA dependent translocation of this model substrate. All of these steps can be examined separately of each other. It was the aim of this work to gain further knowledge about the underlying mechanisms of these processes by analysing in detail the effect of the passenger protein.

The first part of the present work addressed the question, which parts of the chimeric 16/23 protein are involved in the direct membrane insertion and are therefore protected against proteases. Surprisingly it turned out that beside the hydrophobic Tat-signal peptide also the N-terminus of the passenger protein is involved in membrane binding. In the second part it could be demonstrated that the 16/23 protein associates with the *cis*-face of the membrane rather than inserting into the bilayer via its membrane binding patches. Moreover, it was shown that a complete passenger protein is required for a stable membrane interaction, whereby this step was proven to be not essential for transport of the precursor protein. Additionally, it was proven that C-terminal truncations of the passenger protein have significant effects especially on the TatBC receptor binding and thus also on the transport rate of the precursor protein, whereby this effect depends on the extent of truncation. In the last part of the present work it was shown that heterologously overexpressed TatA is able to reconstitute Tat-transport of thylakoids whose TatA activity was inhibited using antiTatA antibodies. This allowed us to exactly quantify the amount of TatA which is required to promote the membrane translocation as well as the

dissociation of the 16/23 protein from the TatBC receptor complex. As it turned out, the amount of overexpressed TatA which is sufficient to efficiently reconstitute Tat-transport corresponds to the naturally occurring TatA-concentration identified in the thylakoid membrane. Furthermore, the obtained results suggest that TatA shows positive cooperativity regarding the catalysis of the Tat-dependent protein transport.

Zusammenfassung

Das thylakoidale Membransystem als zentraler Ort der pflanzlichen Photosynthese beherbergt eine Fülle von löslichen und membranständigen Proteinen, die über vier bisher bekannte Transportwege in die Thylakoidmembran oder in das Thylakoidlumen inseriert bzw. transloziert werden. Einer dieser Wege ist der Tat-abhängige Proteintransport, welcher nicht nur an der Thylakoidmembran von Pflanzen sondern auch an der Cytoplasmamembran von Bakterien und Archaeen vorkommt. Dieser Transportweg zeichnet sich insbesondere durch seine Fähigkeit aus, nur in Anwesenheit eines Protonengradienten (ΔpH) und/oder elektrochemischen Gradienten ($\Delta\psi$) die Translokation von völlig gefalteten Proteinen über eine ionendichte Membran zu vermitteln. Ermöglicht wird dies im thylakoidalen System durch eine Tat-Translokase, die aus den drei membranständigen Proteinen TatA, TatB und TatC besteht. Während TatB und TatC einen Rezeptorkomplex zur Bindung von Tat-Substraten bilden, vermittelt TatA über einen bisher unbekanntem Mechanismus deren Translokation. Tat-Substratproteine besitzen ein spezifisches Tat-Signalpeptid mit einem essentiellen Doppelarginin-Motiv, das dem Transportweg seinen Namen verleiht (Tat = *twin arginine translocation*) und über dessen Bindung an die Translokase letztendlich der Transport des eigentlichen Passagierproteins ermöglicht wird. Nach erfolgter Membrantranslokation wird das Tat-Signalpeptid im Allgemeinen mittels Prozessierungspeptidasen entfernt.

Mit Hilfe des chimären 16/23 Proteins, das ein verlangsamtes Transportverhalten aufweist, ist es möglich, den Tat-Transport in einzelne Schritte zu untergliedern. Demnach lassen sich die translokaseunabhängige Membraninteraktion, die TatBC-Rezeptorbindung als auch die TatA-abhängige Translokation dieses Modellsubstrats separat voneinander untersuchen. Ziel dieser Arbeit war es, über eine detaillierte Analyse des Einflusses des Passagierproteins auf diese Teilschritte weitere Kenntnisse über deren zugrunde liegenden Mechanismen zu erlangen.

So wurde im ersten Teil dieser Arbeit der Frage nachgegangen, welche Bereiche des chimären 16/23 Proteins an der direkten Membraninteraktion beteiligt und somit gegenüber Proteasen geschützt sind. Es stellte sich überraschenderweise heraus, dass neben dem hydrophoben Signalpeptid auch der N-Terminus des Passagierproteins in die Membranbindung involviert ist. Im zweiten Abschnitt der Arbeit konnte gezeigt werden, dass das 16/23 Protein mit einem Großteil dieser membrangeschützten Bereiche eher an die *cis*-Seite der Membran assoziiert vorliegt und nicht in diese inseriert. Des Weiteren zeigte sich, dass für diese stabile Membraninteraktion das vollständige Passagierprotein benötigt wird und, dass dieser Schritt nicht essentiell für den Tat-abhängigen Membrantransport des Vorläuferproteins ist. Darüber hinaus ließ sich verdeutlichen, dass C-terminale Verkürzungen des Passagierproteins einen signifikanten Einfluss vor allem auf die TatBC-Rezeptorbindung und damit einhergehend auch

auf die Transportrate des Vorläuferproteins haben, wobei dieser Einfluss abhängig vom Ausmaß der Verkürzung ist. Im letzten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass heterolog überexprimiertes TatA in der Lage ist, die Transportfähigkeit von Thylakoiden zu rekonstituieren, deren TatA-Aktivität mittels antiTatA-Antikörper blockiert wurde. Dies ermöglichte die genaue Quantifizierung des TatA-Bedarfs sowohl für die Membrantranslokation als auch für die Dissoziation des 16/23 Proteins vom TatBC-Rezeptorkomplex. Dabei stellte sich heraus, dass die Menge an überexprimiertem TatA, die für eine effiziente Rekonstitution des Tat-Transports benötigt wird, in etwa der natürlich vorkommenden TatA-Konzentration in der Thylakoidmembran entspricht. Zudem deuten die erhaltenen Daten darauf hin, dass TatA eine positive Kooperativität hinsichtlich der Katalyse des Tat-abhängigen Proteintransports aufweist.

Inhaltsverzeichnis

Summary	IV
Zusammenfassung	VI
Inhaltsverzeichnis	VIII
Abbildungsverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Kompartimentierung der eukaryontischen Zelle	2
1.2 Chloroplastidäre Transitpeptide	3
1.2.1 Einfache Transitpeptide	3
1.2.2 Zusammengesetzte Transitpeptide.....	4
1.3 Mechanismen des Proteintransports an der Thylakoidmembran.....	4
1.3.1 Insertion von Proteinen in die Thylakoidmembran	6
1.3.1.1 „Spontane“ Proteininsertion	6
1.3.1.2 SRP-abhängige Proteininsertion.....	6
1.3.2 Translokation von Proteinen über die Thylakoidmembran	7
1.3.2.1 Sec-abhängiger Proteintransport.....	8
1.3.2.2 Tat-abhängiger Proteintransport.....	9
1.4 Das chimäre 16/23 Protein ermöglicht die Analyse einzelner Translokationsschritte	12
1.5 Zielstellung	14
2 Ergebnisse	15
2.1 Übersicht über Publikationen und Manuskripte dieser Arbeit	16
2.2 Das Passagierprotein ist an der Membranbindung als ersten Schritt des Tat-abhängigen 16/23 Proteintransports beteiligt.....	17
2.2.1 Zusammenfassung	17
2.2.2 Artikel	19
2.2.3 Ergänzende Ergebnisse	27
2.2.3.1 Bestimmung der Ti-1 Membrantopologie mittels AMS	27
2.2.3.2 Bestimmung der Ti-1 Membrantopologie mittels MalPEG ₅₀₀₀	30
2.2.3.3 Bestimmung der Ti-1 Membrantopologie mittels EGFP-SulfoSMCC.....	35
2.2.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Bestimmung der Ti-1 Membrantopologie.....	37
2.3 Die TatBC-Rezeptorbindung als Schlüsselschritt des Tat-abhängigen Proteintransports.....	38

2.3.1 Zusammenfassung	38
2.3.2 Manuskript.....	40
2.3.3 Ergänzende Ergebnisse	56
2.3.3.1 Untersuchungen zur Konformation des 23 kDa Passagierproteins	56
2.3.3.2 Weiterführende Untersuchungen zur TatBC-Rezeptorbindung in Abhängigkeit vom Passagierprotein	57
2.3.3.3 Untersuchungen zum Einfluss des Passagierproteins auf die TatA- Funktion	58
2.3.3.4 Untersuchungen zum Einfluss der terminalen Prozessierung auf die TatA-Funktion.....	62
2.4 Quantifizierung des TatA-Bedarfs während des Tat-abhängigen Proteintransports	64
2.4.1 Zusammenfassung	64
2.4.2 Artikel	66
2.4.3 Ergänzende Ergebnisse	76
2.4.3.1 Untersuchungen zur Dissoziation des 16/23 Proteins vom TatBC- Komplex nach Zugabe von überexprimiertem TatA	76
3 Diskussion	80
3.1 Zur Membraninteraktion des 16/23 Proteins	81
3.1.1 Membraninsertion versus Membranassoziation: Topologiestudien zum Ti-1	81
3.1.2 Einfluss des Passagierproteins auf die Ausbildung des Ti-1	85
3.2 Zur TatBC-Rezeptorbindung unterschiedlicher Tat-Substrate	88
3.2.1 Die TatBC-Bindung als entscheidender Schritt des Tat-abhängigen Proteintransports.....	88
3.2.2 Stöchiometrische Zusammensetzung des TatBC-Substratkomplexes.....	90
3.3 Zur Rolle des TatA Proteins während des Translokationsschrittes.....	92
3.3.1 Rekonstitution des Tat-Transports mittels überexprimiertem und gereinigtem TatA	92
3.3.2 TatA-induzierte Dissoziation des Substrats vom TatBC-Komplex	95
3.4 Modifiziertes Modell des Tat-abhängigen Proteintransports.....	98
4 Literaturverzeichnis	100
5 Anhang.....	113
5.1 Abkürzungsverzeichnis	114
5.2 Publikationsliste	118

Abbildungsverzeichnis

Abb.1	Schematische Darstellung chloroplastidärer Transitpeptide.....	3
Abb.2	Schematische Darstellung des posttranslationalen Transports von kerncodierten Proteinen im Chloroplasten	5
Abb.3	Untereinheiten des Tat-Apparats.....	11
Abb.4	Modell zur Tat-abhängigen Translokation des 16/23 Proteins über die Thylakoidmembran.....	13
Abb.5	Entstehung des Ti-1 Fragments	17
Abb.6	Mögliche Konformation des Ti-1 an der Thylakoidmembran	27
Abb.7	Cysteinmodifikation von 16/23 Derivaten mittels des thiol-spezifischen Reagens AMS	28
Abb.8	Cysteinmodifikation von 16/23 Derivaten mittels des thiol-spezifischen Reagens MalPEG ₅₀₀₀	31
Abb.9	Ti-1 Fragmentmodifikation von Cysteinmutanten des 16/23 Proteins mittels MalPEG ₅₀₀₀	32
Abb.10	Membranlokalisierung von Cysteinen mittels liposomal eingeschlossenem MalPEG ₅₀₀₀	33
Abb.11	Generierung und funktionale Charakterisierung des thiolreaktiven <i>crosslinker</i> -Konstrukts EGFP-SulfoSMCC.....	35
Abb.12	Cysteinmodifikation von Derivaten des 16/23 und CF ₀ II/CF ₀ II Proteins mittels EGFP-SulfoSMCC.....	36
Abb.13	Untersuchungen zur Trypsinresistenz des Passagierproteins.....	56
Abb.14	Untersuchungen zur TatBC-Bindung von Tat-Substratproteinen in Abhängigkeit vom Passagierprotein.....	58
Abb.15	Untersuchungen zur TatA-induzierten Membrantranslokation von Tat-Substratproteinen in Abhängigkeit vom Passagierprotein	59
Abb.16	Untersuchungen zur TatA-induzierten Dissoziation von Tat-Substratproteinen vom TatBC-Rezeptor in Abhängigkeit vom Passagierprotein	61
Abb.17	Untersuchungen zur TatA-Funktion in Abhängigkeit von der finalen Prozessierung .	63

Abb.18	Aufgereinigtes <i>Arabidopsis thaliana</i> -TatA ermöglicht die Dissoziation des 16/23 Proteins vom TatBC-Rezeptorkomplex.....	77
Abb.19	Kinetik der TatA-vermittelten Dissoziation des 16/23 Proteins vom TatBC-Rezeptorkomplex	78
Abb.20	Quantifizierung des TatA-Bedarfs für die Dissoziation des 16/23 Proteins vom TatBC-Rezeptorkomplex	79
Abb.21	Spektroskopischer Nachweis des effizienten Einschusses von aktivem α -Chymotrypsin in Lipidvesikel.....	84
Abb.22	Untersuchungen zum Transport- und Membraninteraktionsverhalten der C-terminalen Substitutionsmutante 16/23C242S	87
Abb.23	Modifiziertes Modell des Tat-abhängigen 16/23 Proteintransports.....	98

1 Einleitung

1.1 Kompartimentierung der eukaryontischen Zelle

Der Zusammenschluss von hydrophoben Lipiden zu selektiv permeablen Membranen sowie die Integration von Proteinen in deren Lipiddoppelschicht stellten Meilensteine in der Evolution des frühen Lebens auf der Erde dar und bildeten die Basis für dessen heutige Diversität. Biomembranen ermöglichen es der Zelle, als grundlegende Einheit des Lebens, das stete Wechselspiel zwischen unterschiedlichen Kompartimenten, das vor allem in einem regulierten Austausch von Ionen, Proteinen und Stoffwechselmetaboliten besteht, zu kontrollieren. Darüber hinaus sind Membranen in Abhängigkeit von proteinogenen Bestandteilen sowie von der Lipidzusammensetzung lokal konzentrierte Reaktionsräume für essentielle biochemische Prozesse wie oxidative Phosphorylierung, Photosynthese oder Signaltransduktion und ermöglichen unter anderem die transiente Energiespeicherung in Form von elektrochemischen Potenzialgradienten.

Während die Plasmamembran eine selektive Permeabilitätsbarriere gegenüber der äußeren Umwelt bildet (Singer und Nicolson, 1972), unterteilen zusätzliche Lipiddoppelschichten die Zellen von eukaryontischen Organismen in strukturell sowie funktionell distinkte subzelluläre Kompartimente wie Endoplasmatisches Retikulum (ER), Dictyosomen des Golgi-Apparats, Nukleus, Lysosomen, Peroxysomen, Mitochondrien und in pflanzlichen Zellen Chloroplasten. Jedes dieser Kompartimente beinhaltet dabei einen bestimmten Satz an Proteinen, die für dessen Funktion essentiell sind, wobei ein Großteil davon im Cytosol synthetisiert wird und dementsprechend nachfolgend in das Kompartimentlumen transportiert bzw. in die Kompartimentmembran integriert werden muss (Martin und Herrmann, 1998). Im Gegensatz zu allen anderen Kompartimenten weisen Mitochondrien und Plastiden als semiautonome Organellen zwei Hüllmembranen auf, die das Cytosol von der Organellmatrix separieren und zudem durch einen Intermembranraum voneinander getrennt sind. Aufgrund ihres endosymbiontischen Ursprungs (Schimper, 1883; Mereschkowsky, 1905; Margulis, 1970; Gray und Doolittle, 1982) besitzen diese Organellen noch eigene, wenn auch stark reduzierte, Genome von denen im Laufe der Evolution ein Großteil der Organellgene in das Kerngenom des eukaryontischen Wirtes transferiert wurde (Leister, 2003; Brown, 2003). Demnach liegt der Hauptanteil an organellspezifischen Proteinen im Kern kodiert vor und wird nach erfolgter Synthese in Form von Vorläuferproteinen vom Cytosol zum entsprechenden Organell dirigiert. Ermöglicht wird dies durch die im Vorläuferprotein enthaltenen Transitpeptide, die spezifisch mit membranständigen Transportapparaturen des jeweiligen Organells interagieren (Schatz und Dobberstein, 1996).

Im Fall von Chloroplasten, bei denen sich im Stroma in Form von Thylakoiden ein weiteres Membransystem befindet, das eine Vielzahl an Proteinen wie zum Beispiel die meisten Komponenten des Photosyntheseapparats beherbergt, bedarf es für den Transport und die

Integration der entsprechenden thylakoidalen Proteine zusätzlicher Erkennungssequenzen sowie spezifischer Sortiermechanismen.

1.2 Chloroplastidäre Transitpeptide

Ermöglicht wird der organellgerichtete Transport der im Cytosol synthetisierten Proteine durch die Existenz eines Transitpeptides, das sich am N-Terminus des jeweiligen Vorläuferproteins befindet (McFadden, 1999; Bruce, 2000) und häufig durch eine große Anzahl an den beiden polaren Aminosäuren Serin und Threonin gekennzeichnet ist (von Hejine *et al.*, 1989; Schatz und Dobberstein, 1996). Dabei kann bei kerncodierten chloroplastidären Proteinen zwischen einfachen und zusammengesetzten Transitpeptiden unterschieden werden.

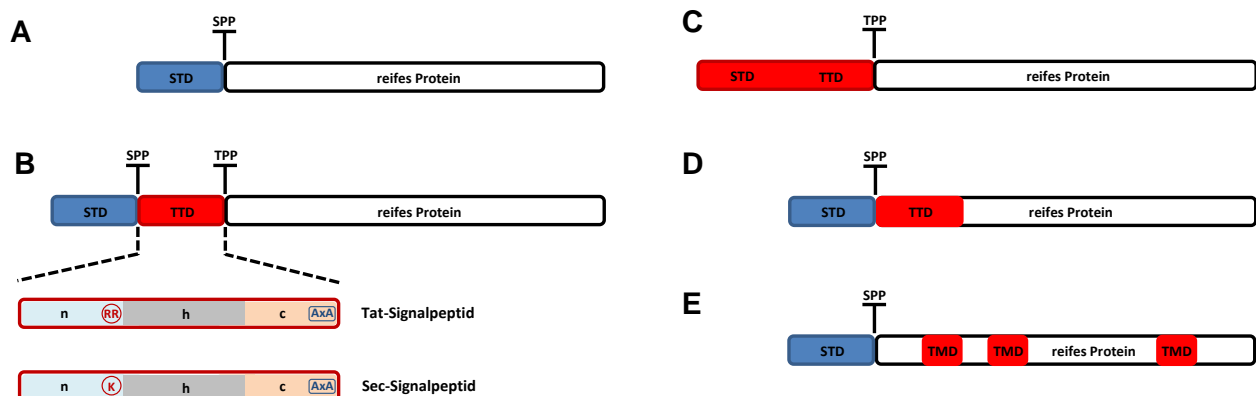


Abb.1 Schematische Darstellung chloroplastidärer Transitpeptide. A) Stomales Protein mit einfachem Transitpeptid, das nur aus der STD besteht. **B)** Protein mit zusammengesetztem Transitpeptid bestehend aus stromadirigierender (STD; blaues abgerundetes Rechteck) und thylakoidirigierender Domäne (TTD; rotes abgerundetes Rechteck). Bei den Sec- und Tat-Substratproteinen kann die TTD (auch als Signalpeptid bezeichnet) in die positiv geladene n-Region, die hydrophobe h-Region und die c-Region unterteilt werden. Das für den Tat-Transport essentielle Zwillingargininmotiv wird separat gezeigt (RR). An gleicher Stelle befindet sich im Sec-Signalpeptid ein Lysin (K). Ebenso wurde die Spaltstelle der Thylakoidprozessierungspeptidase (TPP) dargestellt (AxA). **C)** Protein mit zusammengesetztem Transitpeptid, das keine Spaltstelle für die stromale Prozessierungspeptidase (SPP) aufweist. **D)** Protein mit einfachem Transitpeptid in Form einer STD. Zudem besitzt es im N-terminalen Bereich des reifen Proteins eine nicht abspaltbare TTD. **E)** Polytopes Membranprotein mit einfachem Transitpeptid in Form einer STD. Im reifen Teil befinden sich mehrere Transmembrandomänen (TMD). Für weitere Details, siehe Text.

1.2.1 Einfache Transitpeptide

Kerncodierte stromale Proteine wie die kleine Untereinheit der RuBisCO (SSU) oder das Ferredoxin weisen als Vorläuferproteine nur ein einfaches Transitpeptid in Form einer stromadirigierenden Domäne (STD) auf (Abb.1A). Diese ermöglicht in Abhängigkeit von Nukleosidtriphosphaten den Transport der Vorläuferproteine über die beiden Hüllmembranen des Chloroplasten mittels der TOC (*translocon of the outer envelope of chloroplasts*)- und TIC (*translocon of the inner envelope of chloroplasts*)-Komplexe (Theg *et al.*, 1989; Perry und Keegstra, 1994; Young *et al.*, 1999) in das Chloroplastenstroma und wird dort anschließend

durch die stromale Prozessierungspeptidase (SPP) vom reifen Protein abgespalten (Robinson und Ellis, 1984).

1.2.2 Zusammengesetzte Transitpeptide

Die meisten kerncodierten Chloroplastenproteine, deren endgültiger Bestimmungsort entweder im Thylakoidlumen oder in der Thylakoidmembran liegt, besitzen hingegen ein zusammengesetztes Transitpeptid, bei dem sich eine thylakoiddirigierende Domäne (TTD), die auch als Signalpeptid bezeichnet wird, direkt C-terminal der STD anschließt (Smeekens *et al.*, 1986; Ko und Cashmore, 1989; Hageman *et al.*, 1990). Nach erfolgtem Transport in das Stroma und anschließender Abspaltung der STD durch die SPP werden die entsprechenden Proteine unter anderem durch Interaktion des Signalpeptids mit der Membran oder mit spezifischen Translokasen in die Membran integriert bzw. über diese transloziert. Insbesondere die Translokasespezifität der zu transportierenden Thylakoidproteine wird dabei im Wesentlichen durch Primärsequenzunterschiede innerhalb des Signalpeptids bestimmt, auf die im Abschnitt 1.3 genauer eingegangen wird (siehe auch Abb.1B). Nach erfolgter Translokation über die Thylakoidmembran wird im Allgemeinen das Signalpeptid mittels der Membran-assoziierten Thylakoidprozessierungspeptidase (TPP) abgespalten und das reife Protein somit in das Thylakoidlumen entlassen (Hageman *et al.*, 1986; Kirwin *et al.*, 1987, 1988).

Die beiden Proteine CF₀II (Untereinheit II der ATP-Synthase) und PsaN (Untereinheit N des Photosystems I) bilden hiervon jedoch eine Ausnahme, da ihre zweigeteilten Transitpeptide aufgrund des Fehlens einer SPP-Spaltstelle erst nach deren Integration in die Membran abgespalten werden (Michl *et al.*, 1994; Nielsen *et al.*, 1994) (Abb.1C). Darüber hinaus befinden sich in einigen thylakoidalen Proteinen die thylakoiddirigierenden Sequenzen innerhalb des reifen Teils (Viitanen *et al.*, 1988; Madueno *et al.*, 1994). So ist die TTD des Rieske Fe/S-Proteins am N-Terminus des reifen Teils lokalisiert und fungiert nach Abspaltung der STD als Membrananker für den ins Lumen weisenden hydrophilen Anteil des Proteins (Abb.1D). Hingegen weisen die LHCP Proteine (Apoproteine des LHCII-Komplexes) sowie das CP24 Apoprotein (Bestandteil des Chlorophyll a/b Antennenkomplexes CP24 assoziiert mit Photosystem II) mehrere hydrophobe Bereiche im jeweiligen reifen Proteinteil auf, die zusammen eine Integration der Proteine in die Thylakoidmembran ermöglichen (Kühlbrandt und Wang, 1991; Auchincloss *et al.*, 1992) (Abb.1E).

1.3 Mechanismen des Proteintransports an der Thylakoidmembran

Eine Vielzahl an kerncodierten Chloroplastenproteinen werden nach erfolgtem Transport über die beiden chloroplastidären Hüllmembranen, der unter anderem mittels der TOC- und

TIC-Komplexe ermöglicht wird, aus dem Stroma in die Thylakoidmembran integriert oder über diese in das Thylakoidlumen transloziert. Realisiert werden diese Prozesse in Abhängigkeit vom Bestimmungsort und Faltungszustand des jeweiligen Substratproteins mittels vier verschiedener Transportwege, die im Folgenden beschrieben sind (siehe auch Abb.2).

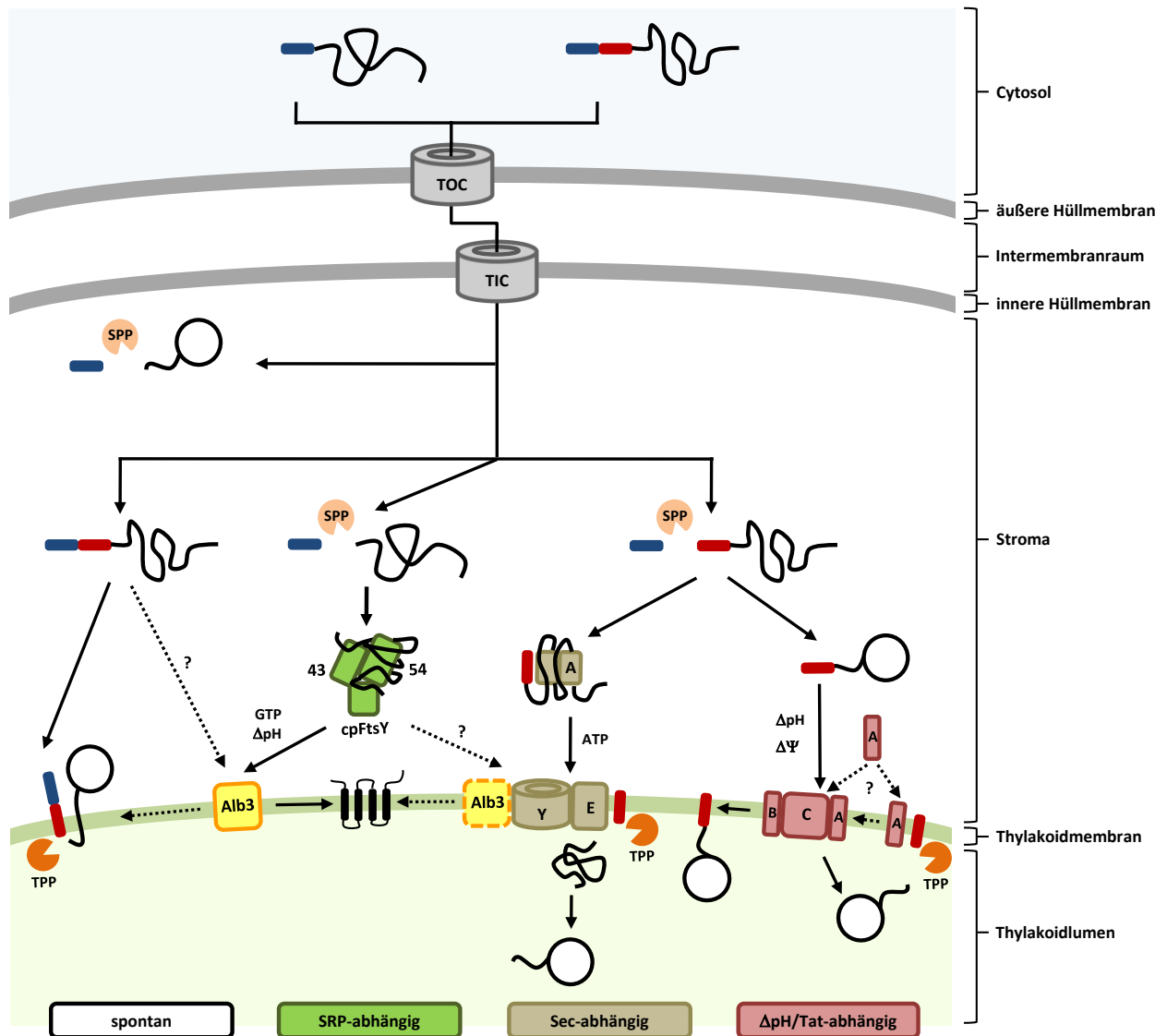


Abb.2 Schematische Darstellung des posttranslationalen Transports von kerncodierten Proteinen im Chloroplasten – modifiziert nach Gutensohn *et al.*, 2006. Neben den Toc- und Tic-Komplexen der beiden Hüllmembranen sind die vier Transportwege über die Thylakoidmembran sowie die benötigten stromalen und thylakoidalen Faktoren vereinfacht dargestellt. Stromadirigierende Importdomänen sind als dunkelblaue und thylakoiddirigierende Domänen als dunkelrote, abgerundete Rechtecke gezeigt. Ebenso sind die stromale und thylakoidale Prozessierungspeptidase als hell- bzw. dunkelorange, offene Kreise dargestellt. Für jeden Transportweg sind die entsprechenden Energiequellen gezeigt. Für weitere Details, siehe Text. (SRP, *signal recognition particle*; cpFtsY; chloroplastidärer SRP-Rezeptor FtsY; Tat, *twin arginine translocation*; SPP, stromale Prozessierungspeptidase; TPP, Thylakoidprozessierungspeptidase)

1.3.1 Insertion von Proteinen in die Thylakoidmembran

Die Thylakoidmembran beherbergt um die 140 Membranproteine, von denen eine Vielzahl kerncodiert vorliegt (Celedon und Cline, 2012). Für die Integration dieser Membranproteine, die sich häufig in supramolekularen Komplexen wiederfinden, existieren in Abhängigkeit von der Natur des jeweiligen Proteins unterschiedlichste Mechanismen. So sind alle vier bis dato bekannten Transportwege in der Lage die Integration von Proteinen in die Thylakoidmembran zu vermitteln, wobei der Hauptteil der Proteininsertion über den „spontanen“ und SRP-abhängigen Weg erfolgt.

1.3.1.1 „Spontane“ Proteininsertion

Eine Anzahl an Thylakoidproteinen mit einer oder zwei α -helikaler Transmembrandomänen ist in der Lage auch in Abwesenheit von proteinogenen Rezeptoren bzw. Translokatoren sowie von jeglichen Energiequellen wie Nukleosidtriphosphaten oder einem Membranpotential in die Thylakoidmembran zu inserieren (Knott und Robinson, 1994; Robinson *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1998). Dieser als spontane oder direkte Insertion bezeichnete Prozess (Schleiff und Klösgen, 2001) wurde erstmals für die kerncodierte CF₀II Untereinheit der ATP-Synthase beschrieben (Michl *et al.*, 1994). Die Membranintegration dieses Proteins wird dabei wie bei den drei Photosystem II-Untereinheiten PsbW, PsbX und PsbY (Lorkovic *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1998; Thompson *et al.*, 1999) durch ein abspaltbares hydrophobes Signalpeptid ermöglicht. Darüber hinaus sind die Translokase-Untereinheiten SecE (Steiner *et al.*, 2002) sowie TatA und TatB (Fincher *et al.*, 2003) auch ohne ein solches Signalpeptid in der Lage spontan in die Thylakoidmembran zu inserieren, wobei allen bisher beschriebenen Proteinen gemein ist, dass sie nur durch eine einzelne membrandurchspannende Helix verankert sind (Michl *et al.*, 1994; Thompson *et al.*, 1999). Dem gegenüber stehen mit PsaG und PsaK Proteine, die mit zwei hydrophoben α -Helices die Membran durchspannen und dabei ein kurzes hydrophiles Fragment flankieren, das im Lumen exponiert vorliegt (Michl *et al.*, 1994, 1999; Gutensohn *et al.*, 2006). Die Beteiligung von proteinogenen Membranbestandteilen am Insertionsprozess kann dennoch nicht ganz ausgeschlossen werden. So konnten Samuelson *et al.* (2001) nachweisen, dass die vormals als spontan deklarierte Insertion des M13 *procoat*-Proteins in die *E. coli*-Membran (Kuhn *et al.*, 1986) durch das polytope Membranchaperon YidC vermittelt wird, von dem mit Alb3 auch ein homologes Protein in der Thylakoidmembran existiert (Sundberg *et al.*, 1997; Bellafiore *et al.*, 2002).

1.3.1.2 SRP-abhängige Proteininsertion

Während die Insertion von Proteinen mit einer oder gar zwei Transmembran-Helices noch durch eine spontane Insertion vermittelt werden kann, erfolgt die posttranslationelle Integration

von polytopen Membranproteinen wie den abundanten LHC Proteinen (LHCP) über den chloroplastidären SRP (*signal recognition particle*)-Weg. Obwohl unter anderem durch das Vorhandensein des cpSRP54 Proteins Homologien zum bakteriellen SRP-System vorliegen, unterscheidet sich das chloroplastidäre SRP54 Protein von allen anderen Systemen insbesondere durch das Fehlen einer assoziierten RNA sowie durch die Existenz einer zusätzlichen stromal lokalisierten Komponente, dem cpSRP43 Protein (Franklin und Hoffman, 1993; Li *et al.*, 1995; Schönemann *et al.*, 1998; Kogata *et al.*, 1999). Des Weiteren fungiert der cpSRP-Weg im Gegensatz zum cytosolischen Gegenpart in Bakterien hauptsächlich posttranslational, wobei auch eine Beteiligung des cpSRP54 Proteins in der co-translationalen Integration des PsbA Proteins gezeigt werden konnte (Voelker und Barkan, 1995). Dabei wird angenommen, dass das cpSRP54 Protein durch seine Bindung an das am Ribosomen vorliegende Substrat dessen Transport an das SecYE-Translokon vermittelt, welches wiederum die laterale Insertion der hydrophoben Transmembrandomänen ermöglicht (Nilsson *et al.*, 1999).

Hingegen erfolgt die posttranslationelle Integration von thylakoidalen Membranproteinen durch die Ausbildung eines im Stroma vorliegenden ternären cpSRP54/43-Substratkomplexes (Li *et al.*, 1995; Eichacker und Henry, 2001), dessen nachfolgende Interaktion mit dem membranständigen Rezeptorprotein, cpFtsY, sowie die finale Insertion und vollständige Assemblierung der Transmembrandomänen durch das Membranchaperon Alb3 (Yi und Dalbey, 2005). Sowohl die über das cpSRP54 Protein vermittelte Bindung des ternären Komplexes an cpFtsY, als auch die Weitergabe des Proteins an Alb3, benötigt GTP als Energiequelle (Schönemann *et al.*, 1999; Kogata *et al.*, 1999), wobei sowohl ATP als auch ein an der Thylakoidmembran befindlicher Protonengradient einen stimulierenden Effekt auf diese Prozesse aufweisen (Schönemann, 2007). Darüber hinaus konnte mittels *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten auch eine direkte, über das cpSRP43 Protein vermittelte, Interaktion zwischen dem cpSRP-System und der Alb3-Integrase gezeigt werden (Lewis *et al.*, 2010; Falk und Sinning, 2010; Dünschede *et al.*, 2011).

1.3.2 Translokation von Proteinen über die Thylakoidmembran

Während die Insertion von Thylakoidmembranproteinen vor allem durch den cpSRP-abhängigen und „spontanen“ Transportweg vermittelt wird, dienen sowohl der chloroplastidäre Sec- als auch der Tat-abhängige Transportweg zur posttranslationalen Translokation der ca. 80 bis 100 kerncodierten Lumenproteinen über die Thylakoidmembran (Peltier *et al.*, 2002; Schubert *et al.*, 2002). Dabei werden die Substratproteine der jeweiligen Transportwege durch eine in ihrer Struktur durchaus einheitlichen Signalpeptidsequenz zu den jeweiligen membranständigen Translokasen dirigiert (Albiniak *et al.*, 2012). Nach erfolgtem Transport des

Passagierproteins in das Thylakoidlumen erfolgt schließlich die N-terminale Abspaltung des hydrophoben Signalpeptids durch die Thylakoidprozessierungspeptidase (TPP).

1.3.2.1 Sec-abhängiger Proteintransport

Mittels Sec-spezifischer Signalpeptide werden lumenale Proteine wie das Plastocyanin und das 33 kDa Protein des Wasserspaltungsapparats (OEC33) (Hulford *et al.*, 1994; Yuan und Cline, 1994) zur chloroplastidären Sec-Translokase dirigiert und dort in ungefalteter Form über die Thylakoidmembran transloziert. Das an ihrem N-Terminus befindliche Signalpeptid weist dabei eine Drei-Domänen-Struktur auf, indem es aus einer positiv geladenen aminoterminalen Region (N-Domäne), gefolgt von einem hydrophoben Kernbereich (H-Domäne) und einer polaren carboxyterminalen Region (C-Domäne) zusammengesetzt ist (Jarvis und Robinson, 2004). Darüber hinaus befindet sich bei vielen Sec-Substraten im Übergangsbereich zwischen N- und H-Domäne ein typischer Lysinrest.

Im Allgemeinen weist das chloroplastidäre Sec-Transportsystem starke Homologien zum gut charakterisiertem bakteriellen System auf (Mitra *et al.*, 2006). So besteht auch die pflanzliche Sec-Translokase aus den membranständigen cpSecY und cpSecE Proteinen, die im Zusammenspiel mit dem cpSecA Protein die Translokation des ungefalteten Substrats vermitteln. SecA stellt eine membranassoziierte ATPase dar, die durch mehrere Zyklen der ATP-Bindung und Hydrolyse stufenweise den Transport des Peptids durch die cpSecYE-Pore ermöglicht (Yuan und Cline, 1994; Robinson *et al.*, 1994; Berghöfer *et al.*, 1995; Laidler *et al.*, 1995; Berghöfer und Klösigen 1996; Schuenemann *et al.*, 1999; Jarvis und Robinson, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass ein Protonengradient über der Thylakoidmembran zwar für diesen Prozess nicht essentiell ist, aber dennoch einen stimulierenden Einfluss auf die Sec-abhängige Translokation einiger Proteine haben kann (Mant *et al.*, 1995).

Um eine entfaltete Konformation der Substrate zu gewährleisten, die eine strikte Voraussetzung für deren erfolgreichen Transport darstellt (Endo *et al.*, 1994; Hynds *et al.*, 1998; Marques *et al.*, 2004), besitzen gram-negative Bakterien wie *E. coli* mit SecB ein als Chaperon fungierendes Protein, das im Cytoplasma lokalisiert ist (Manting und Driessen, 2000). Da sich kein homologes Protein zu SecB in Chloroplasten nachweisen lässt, ist noch unklar, ob auch die chloroplastidären Sec-abhängigen Substratproteine mittels anderer stromaler Chaperone vor dem Transport über die Thylakoidmembran in einem entfaltetem Zustand gehalten werden. Des Weiteren existieren in Bakterien und Archaeen noch weitere Sec-Untereinheiten, wie das SecG Protein, das eine zusätzliche Komponente der bakteriellen Translokase darstellt, oder der SecDF-Komplex, bei dem es sich möglicherweise um eine Art membranintegriertes Chaperon handelt, das auch unabhängig von ATP die Proteintranslokation bewirkt (Tsukazaki *et al.*, 2011).

1.3.2.2 Tat-abhängiger Proteintransport

Im Gegensatz zum Sec-abhängigen Proteintransport zeichnet sich der Tat-abhängige Proteintranslokationsweg, der ebenfalls in der Cytoplasmamembran von Bakterien und Archaeen sowie in der Thylakoidmembran von Pflanzen vorzufinden ist (Müller und Klösgen, 2005), durch seine einzigartige Fähigkeit aus Proteine in vollständig gefalteter Form über eine ionendichte Membran zu translozieren (Clark und Theg, 1997; Hynds *et al.*, 1998; Santini *et al.*, 1998; Sargent *et al.*, 1998; Marques *et al.*, 2003, 2004). Im Chloroplasten werden dabei vermutlich bis zu 50% der lumenal lokalisierten Proteine über den Tat-abhängigen Transportweg transportiert (Schubert *et al.*, 2002). Ermöglicht wird der Transport durch ein Signalpeptid, was in seiner Struktur dem Signalpeptid von Sec-Substratproteinen ähnelt, sich jedoch von diesem durch eine etwas geringere Hydrophobizität in der H-Domäne sowie durch ein charakteristisches und zugleich namensgebendes Zwillingpaar an Argininresten (Tat = *twin arginine translocation*) am Ende der positiv geladenen N-Domäne unterscheidet (Chaddock *et al.*, 1995) (siehe Abb.1B). Im Falle von Gram-negativen Bakterien wie *E. coli* liegt das Argininpaar in der relativ konservierten Sequenz SRRxFLK vor, bei der die Position des x häufig von einer polaren Aminosäure eingenommen wird (Berks, 1996; Stanley *et al.*, 2000).

Das Tat-Signalpeptid kann hierbei nicht nur den Transport von einzelnen gefalteten Passagierproteinen ermöglichen, sondern auch von zwei unabhängig voneinander gefalteten Proteinen, ungeachtet dessen, ob diese Bestandteil einer durchgehenden Polypeptidkette sind (Fan *et al.*, 2010) oder sich mittels Protein-Protein-Interaktion in Form eines Heterooligomers befinden (Rodrigue *et al.*, 1999). Vor allem im bakteriellen System wird die Faltung von Co-Faktor-enthaltenden Passagierproteinen als eine Grundvoraussetzung für deren Translokation angesehen (Weiner *et al.*, 1998; Sargent *et al.*, 1998; Santini *et al.*, 1998, 2001; Berks *et al.*, 2000; Palmer und Berks, 2003), wenngleich auch gezeigt werden konnte, dass ungefaltete oder falsch gefaltete Proteine durchaus vom Tat-Translokation akzeptiert werden (Hynds *et al.*, 1998) wenn keine größeren hydrophoben Bereiche auf ihrer Oberfläche exponiert vorliegen (Richter *et al.*, 2007).

Ein weiterer wesentlicher Unterschied zum Sec-abhängigen Proteintransport besteht darin, dass der Tat-Transportweg nicht von stromalen Faktoren und Nukleosidtriphosphaten abhängig ist (Mould und Robinson, 1991; Cline *et al.*, 1992; Klösgen *et al.*, 1992; Nielsen *et al.*, 1994), sondern ausnahmslos von einem Membranpotential, aufgebaut durch einen Protonengradienten (ΔpH) und/oder einem elektrochemischen Gradienten ($\Delta\Psi$), angetrieben wird (Finazzi *et al.*, 2003; Theg *et al.*, 2005). Während im pflanzlichen System mittels Importstudien an isolierten Chloroplasten und Thylakoiden gezeigt werden konnte, dass gleichwohl beide Gradienten zur Energetisierung der Tat-abhängigen Translokation von Proteinen beitragen können (Jarvis und Robinson, 2004; Braun *et al.*, 2007), verweisen

Analysen im bakteriellen System eher auf den elektrochemischen Gradienten ($\Delta\Psi$) als alleinig treibende Kraft (Bageshwar und Musser, 2007).

Neben dem Vorhandensein eines Membranpotentials wird die Translokation des gefalteten Passagierproteins vor allem durch einen membranständigen Tat-Apparat ermöglicht, der sowohl in Chloroplasten als auch in Gram-negativen Bakterien aus drei Protein-Untereinheiten mit den Bezeichnungen TatA, TatB und TatC besteht. Im pflanzlichen System werden diese Untereinheiten bezugnehmend auf deren Entdeckungshistorie häufig auch als Tha4, Hcf106 und cpTatC bezeichnet (Mori *et al.*, 1999; Walker *et al.*, 1999; Mori *et al.*, 2001). In *E. coli* findet sich neben den drei beschriebenen Tat-Untereinheiten mit TatE eine weitere funktionelle Tat-Komponente (Baglieri *et al.*, 2012), die eine starke Homologie zu TatA aufweist (Wu *et al.*, 2000) und vermutlich als Produkt einer kryptischen Genduplikation von dieser Untereinheit angesehen werden kann (Jack *et al.*, 2001). Darüber hinaus existiert in den meisten Gram-positiven Bakterienstämmen eine minimierte Tat-Translokase, die nur aus den Untereinheiten TatA und TatC besteht, wobei verschiedenste Studien darauf hinweisen, dass dieser Minimal-Transportapparat in ähnlicher Weise die Translokation von Tat-Substraten vermittelt wie die TatABC-Translokase von Gram-negativen Bakterien (Jongbloed *et al.*, 2006; Robinson *et al.*, 2011). Es wird vermutet, dass TatA in diesen Systemen bi-funktional agiert, indem es die Funktionen von TatA und TatB übernimmt (Jongbloed *et al.*, 2006). Von *Bacillus subtilis* ist sogar bekannt, dass zwei Tat-Translokasen parallel fungieren, die in Abhängigkeit von verschiedenen Bedingungen selektiv die Sekretion von speziellen Tat-Substraten ermöglichen. Während die TatAyCy-Translokase unter sämtlichen Bedingungen exprimiert wird, scheint der TatAdCd-Transportapparat nur unter Phosphatmangel in der Membran vorzuliegen (Jongbloed *et al.*, 2000; Pop *et al.*, 2002; Nicolas *et al.*, 2012). Interessanterweise produziert diese Spezies mit TatAc noch eine dritte TatA-Variante, die mit den TatCd- und TatCy-Untereinheiten aktive Translokasen bilden kann (Monteferrante *et al.*, 2012). Ein weiteres Indiz dafür, dass dem Transport mittels TatAC-Translokasen auch in Abwesenheit von TatB ein ähnlicher Mechanismus zugrunde liegt wie dem Pendant in Gram-negativen Bakterien, besteht in der Fähigkeit von TatAdCd das *E. coli*-eigene TatABC-System funktionell zu ersetzen (Barnett *et al.*, 2008).

Erst seit kurzem sind auch die genauen Strukturen von TatA aus *B. subtilis* (Hu *et al.*, 2010) und *E. coli* (Rodriguez *et al.*, 2013) sowie von TatC aus dem hyperthermophilen Bakterium *Aquifex aeolicus* bekannt (Rollauer *et al.*, 2012; Ramasamy *et al.*, 2013). Während TatC wie schon durch vorherige Topologiestudien vermutet (Behrendt *et al.*, 2004) ein polytopes Protein mit sechs Transmembran-Helices und einer N-terminalen stromalen Domäne darstellt, weisen TatA und TatB eine bitope Membrantopologie mit einem einzelnen N-terminal lokalisierten Membrananker auf (Abb.3). Die Helices von TatC bilden eine „Handschuh“-artige Struktur mit einer Lipidexponierten Tasche, die laut *molecular dynamics* Berechnungen als

Bindestelle für das Signalpeptid von Tat-Substraten dienen könnte (Ramasamy *et al.*, 2013). Die mittels Kernspinresonanzspektroskopie erhaltenen Strukturen von TatA zeigen hingegen eine langgestreckte, vermutlich peripher an der Membran anliegende, amphipathische Helix, die nur durch einen kleinen *hinge* mit der Transmembrandomäne verbunden ist (Hu *et al.*, 2010; Rodriguez *et al.*, 2013). Diese Strukturen stehen dabei im Einklang mit vorherigen CD- und NMR-Strukturanalysen (Lange *et al.*, 2007; Müller *et al.*, 2007). Obwohl für TatB noch keine Strukturdaten zur Verfügung stehen, kann aufgrund der homologen Sequenzen von TatA und TatB stark davon ausgegangen werden, dass diese derjenigen von TatA ähnelt, auch wenn TatB einen längeren stromal bzw. cytoplasmatisch exponierten C-Terminus aufweist.

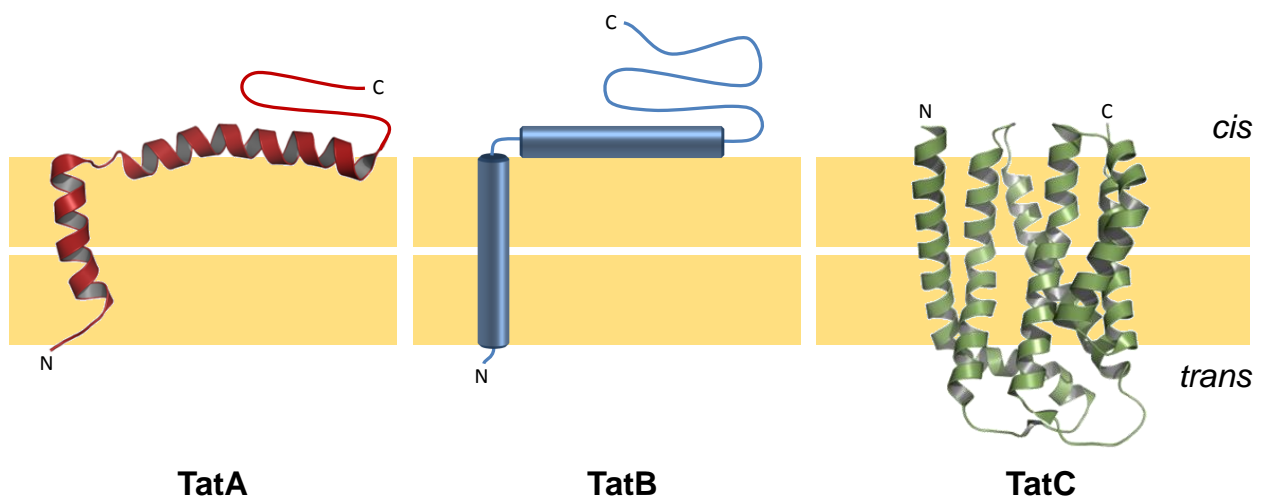


Abb.3 Untereinheiten des Tat-Apparats. Dargestellt sind die Strukturen von TatA nach (Rodriguez *et al.*, 2013; PDB code: 2LZR) aus *E. coli* und TatC (nach Rollauer *et al.*, 2012; PDB code: 4B4A) aus *Aquifex aeolicus* sowie das Schema von TatB, von dem noch keine genaue Struktur vorliegt. Die vorhergesagte Transmembranhelix und amphipathische Helix sind als Zylinder hervorgehoben. Die Lipiddoppelschicht ist als gelbe Schattierung visualisiert. Für weitere Details, siehe Beschreibung im Text.

Trotz aller Ähnlichkeiten zu TatB ist die Membrantopologie sowie die eigentliche Lokalisierung von TatA immer noch Gegenstand von Diskussionen. Unter anderem wird diskutiert, ob nicht auch die amphipathische Helix eine transmembrane Orientierung annehmen kann, sodass beide Termini auf der *trans*-Seite der Membran exponiert vorliegen (Gouffi *et al.*, 2004) oder gar das gesamte Protein eine inverse Topologie mit einem *cis*-orientierten N-Terminus aufweist (Chan *et al.*, 2007). Zudem konnte eine funktionelle lösliche Form von TatA im Chloroplastenstroma (Frielingsdorf *et al.*, 2008) sowie im Cytoplasma von einigen Bakterien (Pop *et al.*, 2003; De Keersmaecker *et al.*, 2005; Westermann *et al.*, 2006) identifiziert werden.

1.4 Das chimäre 16/23 Protein ermöglicht die Analyse einzelner Translokationsschritte

Unter anderem durch die Verwendung des chimären 16/23 Proteins (Clausmeyer, 1992), das aus dem Transitpeptid des 16 kDa Proteins (OEC16) sowie aus dem reifen Teil des 23 kDa Proteins (OEC23) vom Wasserspaltungsapparat aus Spinat besteht und aufgrund einer veränderten TPP-Schnittstelle ein verlangsamtes Transportverhalten aufweist, war es möglich, den Tat-abhängigen Proteintransport in einzelne Schritte zu untergliedern (Berghöfer und Klösgen, 1999; Hou *et al.*, 2006; Frielingsdorf und Klösgen, 2007). Aufgrund des relativ langsamen Translokationsprozesses lassen sich im Zuge von Organell- und Thylakoid-Transportexperimenten neben geringen Mengen an reifem Protein im Thylakoidlumen zeitabhängig auch Translokationsintermediate nachweisen, die an der Thylakoidmembran lokalisiert sind. Insbesondere für dieses chimäre Protein konnte mittels Liposomeninsertionsexperimenten gezeigt werden, dass das Vorläuferprotein unter Ausbildung des frühen Translokationsintermediats 1 (Ti-1) spontan mit Membranen interagieren kann, wobei bis dato nicht geklärt ist, ob diese Interaktion in einer Insertion des Proteins in die Lipiddoppelschicht oder in einer Assoziation an die *cis*-Seite der Membran besteht (Hou *et al.*, 2006, Schlesier und Klösgen, 2010). Dass dieser spontan ablaufende Prozess nicht nur auf das 16/23 Protein beschränkt ist, zeigen unter anderem Studien mit einigen bakteriellen Tat-Substraten, in denen eine von Membranproteinen unabhängige Bindung des Substrats an die Zielmembran als früher Translokationsschritt beschrieben werden konnte (Shanmugham *et al.*, 2006, Bageshwar *et al.*, 2009). Für einige bakterielle Proteine konnte darüber hinaus auch eine vollständige Insertion mit einem Periplasmaexponierten *loop*-Bereich nachgewiesen werden (Karlsson *et al.*, 2012).

In einem zweiten Schritt der Translokation binden potenzielle Tat-Substrate entweder direkt aus dem Stroma kommend oder im Fall des zuvor membrangebundenem 16/23 Proteins vermutlich in Ti-1 Konformation an den TatBC-Rezeptorkomplex (Cline und Mori, 2001; Richter und Brüser 2005). Die retardierte Translokation des chimären 16/23 Proteins führt dabei zu einer Akkumulation des Tat-Substrats am Rezeptor, was wiederum den Nachweis von zwei ternären TatBC-Substratkomplexen bei 560 und 620 kDa mittels *Blue-Native*-Polyacrylamidgelelektrophorese (*BN-PAGE*) ermöglicht (Berghöfer und Klösgen, 1999; Frielingsdorf und Klösgen, 2007; Jakob *et al.*, 2009). Sowohl im pflanzlichen als auch im bakteriellen System konnte zudem gezeigt werden, dass das Substrat mittels seines Signalpeptids dabei in einer für den Transport und die anschließende finale Prozessierung günstigen Position am Komplex assoziiert vorzuliegen scheint, bevor es zur Translokation des Passagierproteins kommt (Gérard und Cline, 2007; Fröbel *et al.*, 2012).

Für den eigentlichen Translokationsprozess des gefalteten reifen Proteinteils über die Membran bedarf es der Anwesenheit von funktionellem TatA, welches von einem Membranpotential abhängig transient mit dem ternären TatBC-Substratkomplex interagiert (Mori und Cline, 2002; Alami *et al.*, 2003; Frielingsdorf *et al.*, 2008; Aldridge *et al.*, 2014). Die Funktion, die TatA während dieses Prozesses einnimmt, ist dabei weitestgehend ungeklärt. So umspannen verschiedene Arbeitsmodelle für die Translokation von globulären Tat-Substraten unter anderem eine Porenbildung durch TatA-Oligomerisierung am ternären Komplex, eine TatA induzierte „Membranaufweichung“ oder eine TatA-vermittelte Translokation durch den TatBC-Komplex (Mori und Cline, 2002; Gohlke *et al.*, 2005; Cline und McCaffery, 2007; Natale *et al.*, 2008; Jakob *et al.* 2009). Obwohl TatA als ein Membranprotein mit bitopischer Topologie beschrieben wird, lassen jedoch divergente Daten zur TatA-Stöchiometrie in unterschiedlichen Spezies (Jack *et al.*, 2001; Jakob *et al.*, 2009; Celedon und Cline, 2012; Hauer *et al.*, 2013), der Nachweis von abundanten Mengen des Proteins im Stroma bzw. im Cytoplasma sowie dessen Fähigkeit membrangebundenes TatA nach äußerer Zugabe funktionell zu ersetzen (Dabney-Smith *et al.*, 2003; Frielingsdorf *et al.*, 2008) den Schluss zu, dass TatA eher ein ambivalentes Protein darstellt, das sich im steten Übergang zwischen Membran und löslicher Phase befindet. Die TatA-vermittelte Translokation über die Thylakoidmembran kann hierbei mittels des 16/23 Proteins durch die Detektion des zweiten Translokationsintermediats (Ti-2) nachvollzogen werden. In dessen Konformation liegt nur noch der N-Terminus exponiert im Stroma vor, während sich der reife Proteinteil auf der lumenalen Seite der Membran befindet.

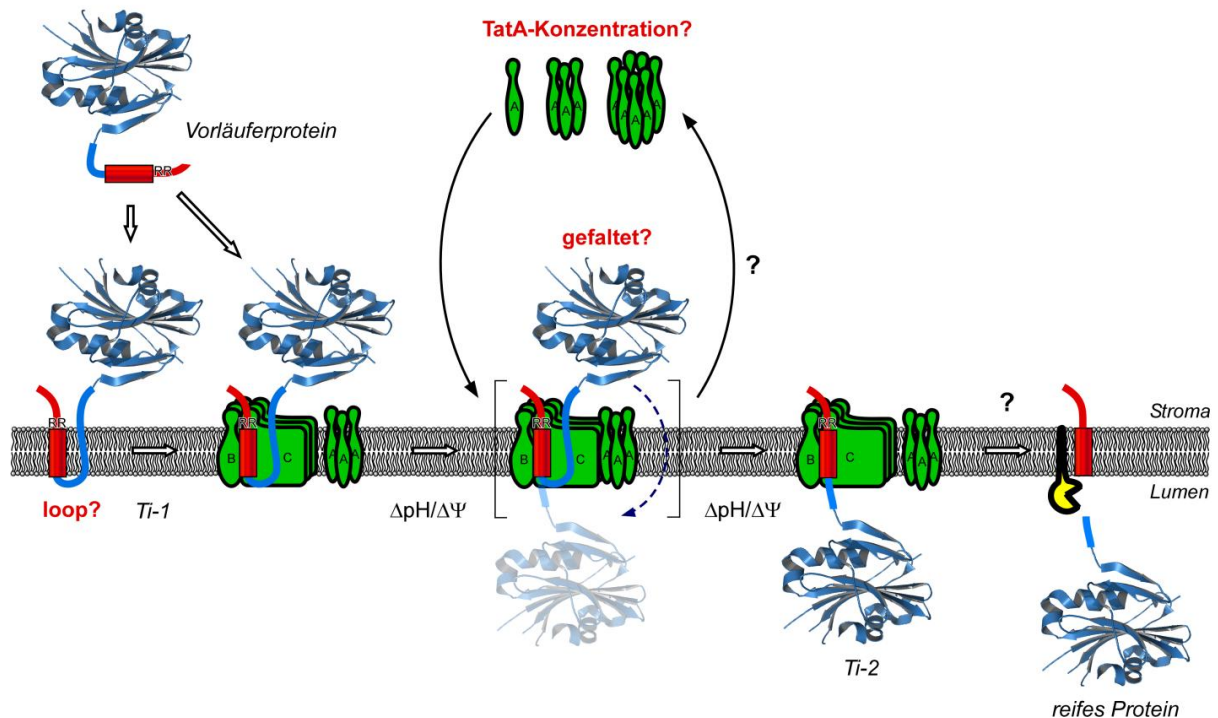


Abb.4 Modell zur Tat-abhängigen Translokation des 16/23 Proteins über die Thylakoidmembran. Einzelne Translokationsschritte, deren genaue Abläufe noch nicht vollständig geklärt sind, wurden mit einem Fragezeichen versehen. Rot unterlegt sind zudem Fragestellungen, die in dieser Arbeit Gegenstand näherer Untersuchungen sein sollten. Für weitere Details, siehe Beschreibung im Text.

Im letzten Schritt des gesamten Transportprozesses wird das translozierte Protein vermutlich in seiner Ti-2 Konformation durch Signalpeptidprozessierungspeptidasen vom Typ I final prozessiert, indem das Signalpeptid vom reifen Protein abgespalten wird. Im Falle des 16/23 Proteins als thylakoidales Tat-Substrat übernimmt diesen Prozess die Thylakoidprozessierungspeptidase (TPP), in dessen Folge das reife 23 kDa Protein ins Lumen entlassen wird (Halpin *et al.*, 1989). Es besteht jedoch noch Unklarheit darüber, ob die Substratproteine zum Zeitpunkt der Prozessierung an der Translokase gebunden vorliegen oder schon lateral in die Membran entlassen wurden. Einige Studien im bakteriellen und pflanzlichen System mit nicht-prozessierbaren Substraten könnten darauf hindeuten, dass dieser Prozess eher nach Dissoziation des Substrats vom TatBC-Komplex in die Membran erfolgt (Molik *et al.*, 2001; Frielingsdorf und Klösigen, 2007; Ren *et al.*, 2013).

Zur besseren Veranschaulichung sind die beschriebenen Schritte der Translokation für den Tat-abhängigen Proteintransport des chimären 16/23 Proteins in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

1.5 Zielstellung

Gegenstand dieser Arbeit war es mit Hilfe des chimären 16/23 Proteins weitere Kenntnisse über die Interaktion von Tat-Substraten sowohl mit der Thylakoidmembran als auch mit der Tat-Translokase sowie über den TatA-abhängigen Transportmechanismus zu erlangen.

So sollte zum einen untersucht werden, welche Anteile des 23 kDa Passagierproteins an der Bildung des Translokationsintermediates 1 (Ti-1) zu einem frühen Zeitpunkt des 16/23 Proteintransports beteiligt sind und zum anderen welche Topologie das Vorläuferprotein in Form dieses Intermediates an der Membran besitzt. Darüber hinaus sollte der Frage nachgegangen werden, inwiefern der Tat-abhängige Proteintransport durch C-terminale Verkürzungen des 23 kDa Passagierproteins in seiner Funktion beeinträchtigt wird und, damit einhergehend, welche Schritte der Translokation womöglich von der Konformation des reifen Proteinteils abhängig sind. Basierend auf früheren Studien, die zeigen konnten, dass stromales, lösliches TatA in der Lage ist, den Transport von TatA-defizienten Thylakoiden zu rekonstituieren (Dabney-Smith *et al.*, 2003; Frielingsdorf *et al.*, 2008), wurde abschließend beabsichtigt, den tatsächlichen TatA-Bedarf für den Transport des 16/23 Proteins sowie für dessen Dissoziation vom TatBC-Rezeptorkomplex quantitativ zu bestimmen, um somit weitere Hinweise auf die eigentliche Funktion des TatA Proteins während des Translokationsprozesses zu erhalten.

2 Ergebnisse

2.1 Übersicht über Publikationen und Manuskripte dieser Arbeit

Schlesier, R. and Klösgen, R.B. (2010) Twin arginine translocation (Tat)-dependent protein transport: the passenger protein participates in the initial membrane binding step. *Biol. Chem.*, **391**,1411-1417.

Eigenanteil: Planung, Durchführung und Auswertung aller Experimente.
Anfertigung des Manuskripts.

Schlesier, R. and Klösgen, R.B. (2014) C-terminal truncation of a Tat passenger protein affects its membrane translocation by interfering with receptor binding. Das Manuskript wurde am 12.09.2014 zur Veröffentlichung eingereicht.

Eigenanteil: Planung, Durchführung und Auswertung aller Experimente.
Anfertigung des Manuskripts.

Hauer, R.S., **Schlesier, R.**, Heilmann, K., Dittmar, J., Jakob, M., and Klösgen, R.B. (2013) Enough is enough: TatA demand during Tat-dependent protein transport. *Biochim. Biophys. Acta*, **1833**, 957-965.

(*) Both authors contributed equally to this work.

Eigenanteil: Planung, Durchführung und Auswertung folgender Experimente:
Kinetik des 16/23-Transports nach Zugabe von gereinigtem TatA,
die Hälfte der Thylakoidtransportexperimente zur genauen Bestimmung des
TatA- Bedarfs,
graphische Analyse des Verhältnisses zwischen Transportrate und TatA-
Konzentration mittels Hill-Plot
Bearbeitung des Manuskripts und der Abbildungen.

2.2 Das Passagierprotein ist an der Membranbindung als ersten Schritt des Tat-abhängigen 16/23 Proteintransports beteiligt

2.2.1 Zusammenfassung

Der erste Schritt des Tat-abhängigen Transports des chimären 16/23 Proteins über die Thylakoidmembran führt zu dem frühen Translokationsintermediat 1 (Ti-1), das durch die Bindung oder Insertion von Teilen des Vorläuferproteins an bzw. in die Thylakoidmembran entsteht. In dieser Konformation liegen sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus des Vorläuferproteins stromal exponiert vor. Aufgrund dessen können beide Termini durch eine extern zugegebene Protease wie Thermolysin gespalten werden, so dass nur ein ca. 14 kDa großes, proteasegeschütztes Ti-1 Fragment als Degradationsprodukt zurückbleibt (siehe Abb.5 und Hou *et al.*, 2006).

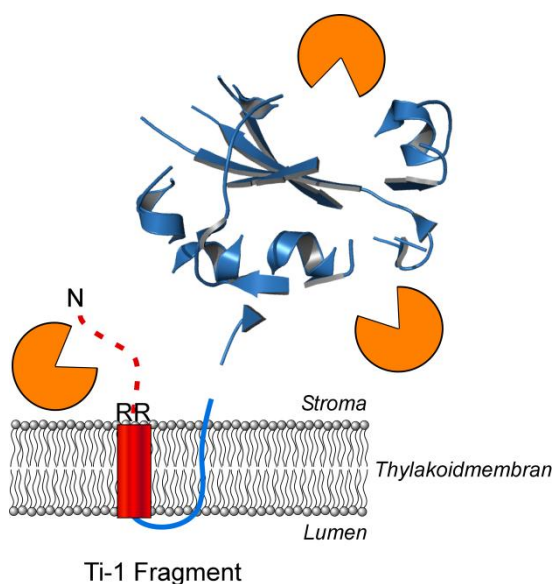


Abb.5 Entstehung des Ti-1 Fragments. N- und C-Terminus des 16/23 Vorläuferproteins liegen in der Konformation des Translokationsintermediats 1 (Ti-1) stromal exponiert vor und können durch Zugabe einer Protease (oranger Cartoon) degradiert werden. Nach Proteasebehandlung bleibt ein durch die Membran geschütztes, Ti-1 spezifisches 14 kDa Degradationsfragment zurück (Ti-1 Fragment). Das 16 kDa Transitpeptid sowie das 23 kDa Passagierprotein sind in rot bzw. blau dargestellt.

Es wurde vermutet, dass sowohl das Transitpeptid als auch das Passagierprotein an der Membraninteraktion und somit in der Ausbildung des Ti-1 beteiligt sind. Um dies zu überprüfen wurden die gegenüber Thermolysin geschützten Enden des Ti-1 Fragmentes mittels eines systematischen *cysteine scanning*-Ansatzes präzise lokalisiert. Zu diesem Zweck wurden einzeln ausgewählte Codons innerhalb der codierenden Sequenz des 16/23 Proteins durch Codons für Cystein mittels zielgerichteter Mutagenese ersetzt und die entsprechenden Mutanten nach erfolgter Translation in Anwesenheit von radioaktivem Cystein in Thylakoidtransportexperimenten eingesetzt. Da sich im unveränderten 16/23 Protein nur ein einzelnes Cystein in der Nähe des C-Terminus befindet, das ausschließlich nach einem vollständigen Transport des reifen Proteinteils über die Thylakoidmembran gegenüber

Thermolysin geschützt vorliegt, kann kein Ti-1 Fragment nachgewiesen werden, wenn das Protein mit radioaktivem ^{35}S -Cystein anstelle von ^{35}S -Methionin markiert wird. Liegt jedoch nun in den Cysteinderivaten des 16/23 Proteins der eingefügte Cysteinrest innerhalb des proteasegeschützten Ti-1 Fragments, so lässt sich dessen 14 kDa Bande im SDS-Gel detektieren.

Im Zuge dessen wurden die Mutanten S37C, A50C, S54C, S60C, S115C, S153C.S159C, S165C, A175C, G178C, S182C und S188C generiert und hinsichtlich ihres Transportverhaltens untersucht. Basierend auf Thylakoidtransportexperimenten, die parallel sowohl mit ^{35}S -Methionin- als auch ^{35}S -Cystein-Markierung der Mutanten durchgeführt wurden, konnte jeglicher Effekt der eingeführten Mutationen auf den Transportvorgang ausgeschlossen werden. Von allen untersuchten Vorläuferproteinen war nur bei den fünf ^{35}S -Cystein markierten Mutanten S37C, A50C, G178C, S182C und S188C kein Ti-1 Fragment in den proteasebehandelten Thylakoidfraktionen detektierbar. Demnach sind diese Positionen für Thermolysin nach Membraninteraktion des 16/23 Proteins zugänglich und somit nicht Teil des Ti-1 Fragmentes. Im Gegensatz dazu müssen sich alle anderen untersuchten Positionen, von S54C bis A175C, in diesem Fragment befinden, da bei den entsprechenden Mutanten dessen Bande deutlich detektierbar ist. Unter Verwendung dieser Ergebnisse sowie dem Vorhersageprogramm *Peptide Cutter* konnten die entsprechenden Thermolysinspaltstellen genau bestimmt werden: N-Terminal zwischen Gln52 und Val53, sowie C-Terminal zwischen Tyr176 und Phe177. Daraus ergibt sich für das proteasestabile Ti-1 Fragment eine Länge von 124 Aminosäuren und somit ein Molekulargewicht von ca. 13,5 kDa, welches mit dem beobachteten Laufverhalten des Fragments im denaturierenden Gel korreliert.

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass das 16/23 Protein im Zuge von Insertionsexperimenten spontan mit artifiziellen Membranen von Liposomen interagieren kann und dass nach Thermolysinbehandlung der Insertionsansätze ein Degradationsprodukt ähnlich dem Ti-1 detektierbar ist (Hou *et al.*, 2006). Dies führte zur Vermutung, dass der membrangeschützte Teil des 16/23 Proteins in beiden Fällen identisch ist. Um dies zu klären, wurden einige der generierten Cysteinderivate des 16/23 Proteins in Insertionsexperimenten mit Liposomen aus Phosphatidylcholin analysiert. Es stellte sich heraus, dass das Ti-1 Fragment ausschließlich mit den ^{35}S -Cystein-markierten Mutanten nachweisbar ist, die bereits im Zuge von Thylakoidtransportexperimenten eine eindeutige Ti-1 Fragmentbande gezeigt haben. Dies bedeutet nicht nur, dass das 16/23 Protein selbst in Abwesenheit von Membranproteinen in der Lage ist spontan an Membranen zu binden, sondern lässt ebenso vermuten, dass die Topologie des Proteins in oder an der Membran unabhängig von deren jeweiligen Lipidzusammensetzung ist.

Das wohl bemerkenswerteste Ergebnis dieser Studie ist, dass das proteasestabile Ti-1 Fragment nicht nur das hydrophobe Signalpeptid, sondern auch annähernd die Hälfte des

23 kDa Passagierproteins umfasst. Ein Vergleich der proteasegeschützten Region des 16/23 Proteins mit der Röntgenkristallstruktur des reifen 23 kDa Proteins zeigt eine prominente, amphipathische α -Helix am C-terminalen Ende des Ti-1 Fragments, die durchaus eine starke Membraninteraktion des Vorläuferproteins begünstigen könnte. Es bleibt jedoch unklar, ob es dabei zu einer partiellen Entfaltung bzw. Umlagerung innerhalb der Struktur des Passagierproteins kommt. Darüber hinaus bleibt zu klären, ob das Protein als Translokationsintermediat 1 eine Transmembrantopologie aufweist. Dies wäre möglich, wenn die amphipathische α -Helix zumindest temporär eine Transmembranorientierung annimmt und somit ein über 70 Reste langes, hydrophiles Fragment einschließt. Alternativ wäre aber auch denkbar, dass das 16/23 Protein nur partiell in die äußere Lipidschicht der Membran inseriert, wodurch das hydrophile Fragment in unbekannter Form proteasestabil auf der stromalen Seite verbleibt.

2.2.2 Artikel

Twin arginine translocation (Tat)-dependent protein transport: the passenger protein participates in the initial membrane binding step

René Schlesier and Ralf Bernd Klösigen*

Institute of Biology – Plant Physiology, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Weinbergweg 10, D-06120 Halle/Saale, Germany

*Corresponding author
e-mail: klosigen@pflanzenphys.uni-halle.de

Abstract

The initial step in twin arginine translocation (Tat)-dependent thylakoid transport of the 16/23 chimera is the interaction of the protein with the lipid bilayer. It results in the formation of the early translocation intermediate Ti-1, which is represented by a protease-protected fragment of 14 kDa. Cysteine scanning mutagenesis in combination with *in thylakoido* and liposome insertion assays was used to precisely map this membrane-interacting and protease-protected fragment within the 16/23 chimera. The fragment comprises 124 residues, which are provided both by the transit peptide (31 residues) and the mature protein (93 residues), demonstrating that the passenger protein directly participates in membrane binding. The implications of this finding on the mechanism of Tat-dependent protein transport are discussed.

Keywords: liposome; protein transport; site-directed mutagenesis; thylakoid membrane; translocation intermediate; twin arginine translocation (Tat).

Introduction

The twin arginine translocation (Tat) pathway operating at the thylakoid membrane of chloroplasts and at the plasma membranes of bacteria and archaea (Müller and Klösigen, 2005) is capable of translocating fully folded passenger proteins (Clark and Theg, 1997; Hynds et al., 1998; Santini et al., 1998; Sargent et al., 1998; Marques et al., 2003, 2004), although unfolded substrates are in principle also accepted (Hynds et al., 1998; Richter et al., 2007). It is specifically engaged by precursor proteins carrying signal peptides with a characteristic twin pair of arginine residues (Chaddock et al., 1995) and obtains its energy from the membrane potential, notably ΔpH and/or $\Delta\Psi$ (Theg et al., 2005; Bageshwar and Musser, 2007; Braun et al., 2007). Three membrane proteins, namely TatA, TatB, and TatC (in the thylakoid system also called Tha4, Hcf106, and cpTatC, respectively), are essential for Tat-dependent protein translocation (Settles et

al., 1997; Mori et al., 1999, 2001; Walker et al., 1999; Motohashi et al., 2001). TatC is a polytopic protein with six putative transmembrane helices, whereas TatA and TatB have a bitopic topology with a single N-terminal membrane anchor (Gouffi et al., 2004; Chan et al., 2007). In addition, soluble forms of either TatA, or TatA and TatB, have been identified in the chloroplast stroma (Frielingsdorf et al., 2008), as well as in the cytosol of several bacteria (Pop et al., 2003; De Keersmaecker et al., 2005; Westermann et al., 2006; Berthelmann et al., 2008).

Mechanistically, protein transport by the Tat pathway is divided into four consecutive steps: (i) unassisted binding of the Tat substrate to the target membrane (Hou et al., 2006; Shanmugham et al., 2006; Bageshwar et al., 2009), (ii) association of the membrane-bound substrate with the TatBC/receptor complex (Cline and Mori, 2001; Richter and Brüser, 2005), (iii) membrane translocation of the passenger protein, which depends on the transient interaction of TatA with the TatBC/substrate complex (Mori and Cline, 2002; Alami et al., 2003), and (iv) proteolytic removal of the signal peptide, which presumably takes place after release of the Tat substrate into the membrane (Frielingsdorf and Klösigen, 2007). The first step leads to an early translocation intermediate (termed Ti-1), which is assumed to develop an integral loop conformation within the lipid bilayer (Hou et al., 2006). It has been proposed that both the transit peptide and the passenger protein are involved in membrane insertion, but experimental evidence for this assumption is still missing. Therefore, the goal of this study was to precisely map the boundaries of the membrane-bound Ti-1 fragment making use of substitution mutants obtained by a cysteine scanning approach in combination with *in thylakoido* protein transport and liposome insertion experiments.

Results

Identification of the protease-protected Ti-1 fragment

Thylakoid transport of the chimeric Tat substrate 16/23, which consists of the transit peptide of the 16 kDa subunit and the mature part of the 23 kDa subunit, both from the oxygen-evolving system associated with photosystem II, is a relatively slow process. Only a small amount of mature 23 kDa protein accumulates in the thylakoid lumen in the course of thylakoid transport experiments, whereas most of

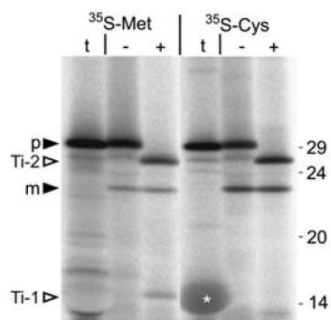


Figure 1 Thylakoid transport of the 16/23 chimera. Radiolabeled 16/23 precursor protein obtained by *in vitro* translation in the presence of either [^{35}S]-methionine (^{35}S -Met) or [^{35}S]-cysteine (^{35}S -Cys) was incubated with isolated pea thylakoids for 10 min at 25°C in light, washed with HM buffer and either treated with thermolysin (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 30 min on ice, lanes +) or mock-treated (lanes -). Stoichiometric amounts of each fraction corresponding to 15 μg of chlorophyll were separated on 10–17.5% SDS-polyacrylamide gradient gels and visualized by phosphorimaging. In lanes *t*, 1 μl of the respective *in vitro* translation assays were loaded. The precursor (p) and mature protein (m) are indicated by filled arrowheads, whereas open arrowheads point to the position of two degradation products indicative of translocation intermediates Ti-1 and Ti-2. The asterisk marks a globin band that is unspecifically labeled by [^{35}S]-cysteine.

the precursor protein remains bound to the membrane and is cleaved by externally added proteases such as thermolysin to two distinct degradation products of approximately 14 kDa and 26 kDa (Figure 1). In the presence of detergents such as Triton X-100, neither of these degradation products is observed, which rules out that they result from the lack of thermolysin cleavage sites within these fragments. In time-course experiments, the degradation products have been shown to represent two consecutive translocation intermediates, which were termed Ti-1 (Translocation intermediate-1) and Ti-2 (Berghöfer and Klösgen, 1999; Hou et al., 2006; Frielingsdorf and Klösgen, 2007). Whereas Ti-2 has a bitopic transmembrane topology with fully translocated passenger protein, the early translocation intermediate Ti-1 assumes a membrane-bound conformation exposing both its N- and C-terminus on the stromal face of the membrane. Consequently, Ti-1 cannot be detected if the experiment is performed with 16/23 precursor that is radiolabeled with [^{35}S]-cysteine instead of the usual [^{35}S]-methionine (Figure 1), because the single cysteine residue present in 16/23 chimera is located close to the C-terminus of the protein (Figure 2A) and thus protected against protease only after complete translocation of the passenger across the thylakoid membrane.

This structural condition allowed us to map the membrane-bound protein fragment of Ti-1 by a systematic cysteine scanning approach. For this purpose, selected codons within the coding sequence of the 16/23 chimera were individually replaced by codons for cysteine, which subsequently could be utilized for radioactive labeling by *in vitro* translation in the presence of [^{35}S]-cysteine. The result-

ing radiolabeled 16/23 derivatives were then subjected to *in thylakoido* protein transport experiments. To consider any influence of the mutagenesis on the transport process, the experiments were performed in parallel with all mutant precursor proteins labeled with [^{35}S]-methionine.

In the first round, three mutants were generated in which either of the serine residues at positions 37, 115, or 188 of the 16/23 chimera was replaced by cysteine (Figure 2A). *In thylakoido* analysis of these mutants (termed S37C, S115C, and S188C, respectively) after labeling with [^{35}S]-methionine showed that their transport characteristics were indistinguishable from those of the original 16/23 chimera (Figure 2B and data not shown), which rules out any effect of the substitutions on the transport behavior of the protein. Among the [^{35}S]-cysteine labeled precursors, however, a degradation fragment corresponding to Ti-1 could be detected only for mutant S115C, whereas it was absent from the protease-treated thylakoid fractions of the mutants S37C and S188C (Figure 2B). This demonstrates that the latter two positions are still accessible to thermolysin after membrane binding of the 16/23 chimera and can thus not be part of the membrane-embedded Ti-1 fragment.

The passenger protein participates in membrane interaction

To determine the boundaries of the protease-protected Ti-1 fragment with more accuracy, further single cysteine substitution derivatives of the 16/23 chimera were analyzed (Figure 3). In the area of the presumed N-terminal boundary, residues Ala50, Ser54, and Ser60 were individually replaced by cysteine, whereas cysteine substitution of Ser153, Ser159, Ser165, Ala175, Gly178, or Ser182 was executed to determine the C-terminal border of the protease protected fragment (Figure 2A). Again, the subsequent *in thylakoido* analysis was performed twice for each mutant, i.e., after radioactive labeling with either [^{35}S]-methionine or [^{35}S]-cysteine. Similar to the first set of mutants, neither of the new mutations led to an altered transport or binding behavior of the 16/23 chimera as determined from the analysis of the [^{35}S]-methionine-labeled proteins (Figure 3 and data not shown).

Protease-protected Ti-1 fragments could only be observed upon thylakoid transport of the [^{35}S]-cysteine-labeled 16/23 derivatives S54C, S60C, S153C, S159C, S165C, and A175C but not for the mutants A50C, G178C, and S182C (Figure 3), demonstrating that the N- and C-terminal borders of the protease-protected Ti-1 fragment must be located between Ala50/Ser54 and Ala175/Gly178, respectively. According to protease cleavage site prediction programs such as 'PeptideCutter' (ExpASY Proteomics Server), a single thermolysin cleavage site is present in each of these border regions, notably between residues Gln52 and Val53 in the N-terminal region and between Tyr176 and Phe177 in the C-terminal region (Figure 2A). The resulting fragment would thus have a size of 124 amino acid residues and a calculated molecular mass of 13.5 kDa, which corresponds well to the

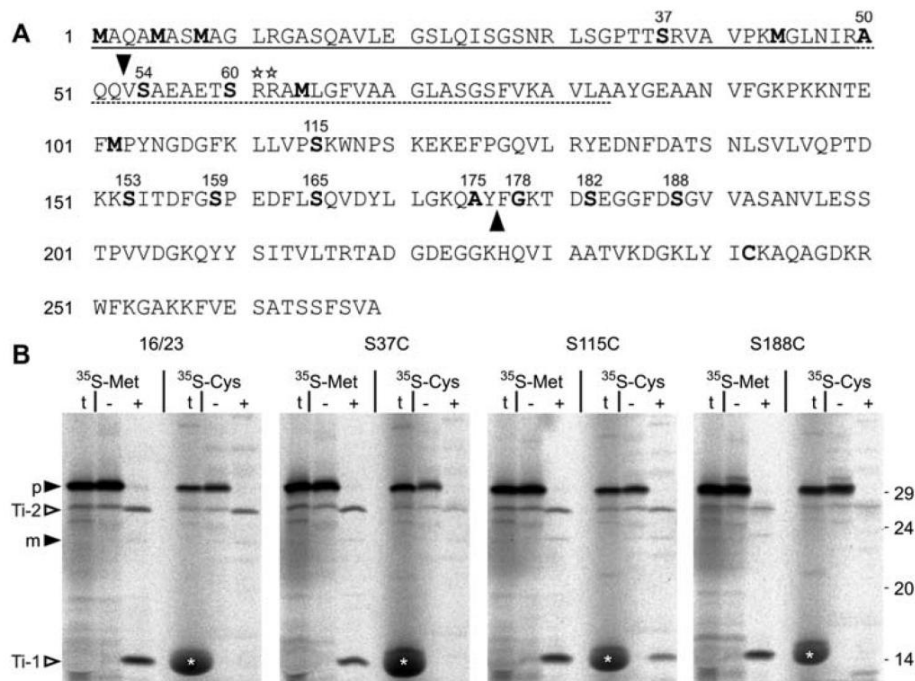


Figure 2 Site-directed mutagenesis of the 16/23 chimera.

(A) Representation of the amino acid sequence of the chimeric 16/23 protein given in the one letter code. The stroma targeting and thylakoid targeting domains of the transit peptide are underscored with solid and dashed lines, respectively. The twin pair of arginine residues indicative for Tat transport signals is emphasized by two asterisks. Methionine and cysteine residues present within the original sequence are shown in bold font. Residues that were substituted by cysteine upon site-directed mutagenesis are also highlighted in bold font and additionally numbered on top according to their position. Filled arrowheads indicate the presumed thermolysin cleavage sites flanking the protease-protected fragment representing Ti-1. (B) *In thylakoido* transport experiments analyzing the 16/23 chimera and its substitution derivatives S37C, S115C, and S188C. The import assays were performed as described in the legend to Figure 1, except that incubation was done at 4°C to retard the actual membrane translocation step, which leads to the formation of Ti-2 and mature protein, and to accumulate higher levels of Ti-1.

observed mobility of the Ti-1-specific fragment on SDS-polyacrylamide (SDS-PAA) gels (Figures 1 and 2B).

The 16/23 chimera interacts with artificial membranes

Earlier research has shown that the 16/23 chimera is able to interact also with artificial lipid bilayers as indicated by the appearance of a specific degradation product after protease treatment of such membrane vesicles (Hou et al., 2006). The size of this degradation product is similar to that obtained for Ti-1 after *in thylakoido* import (Figure 4A) and, like that, it is not detectable after protease treatment of the vesicles in the presence of Triton X-100 (Figure 4B). This suggests that the membrane-embedded part of the 16/23 chimera is identical in both instances. To check this assumption, several of the cysteine substitution mutants generated to determine the borders of the protease-protected Ti-1 fragment were analyzed with insertion experiments employing liposomes that are composed of phosphatidylcholine, a common model lipid to generate stable lipid bilayers (Walde and Ichikawa, 2001). In line with the results of the *in thylakoido* experiments described above, protease-protected degradation fragments of approximately 14 kDa are observed after [³⁵S]-cysteine

labeling only with those mutants possessing a cysteine residue within positions 54–175 of the 16/23 chimera (Figure 4C and data not shown). In all other instances, such a protease-protected fragment is detectable only after labeling with [³⁵S]-methionine which reconfirms that the mutagenesis did not significantly influence the membrane interaction properties of the protein. These results provide additional proof for the assumption that the 16/23 chimera is able to insert into lipid membranes in an unassisted manner and they furthermore suggest that the resulting topology of the protein within such membranes is independent of their lipid composition.

Discussion

In the present study, we aimed to precisely determine the borders of the protease-protected fragment representing the early translocation intermediate Ti-1 obtained upon Tat-dependent protein transport. By analyzing single cysteine substitution derivatives of the 16/23 chimera with *in thylakoido* protein transport experiments, we were able to show that the membrane-embedded and thus protease-protected protein fragment comprises 124 amino acid residues, which

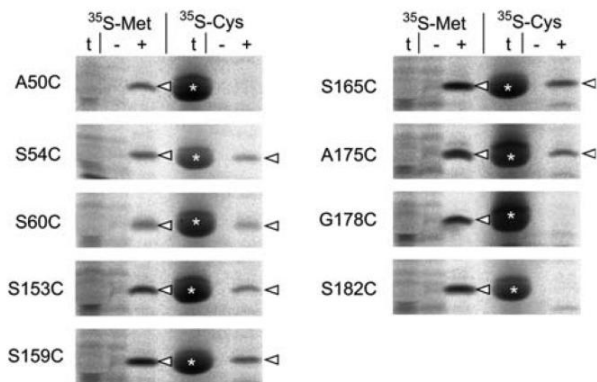


Figure 3 Fine-mapping of the Ti-1 fragment by *in thylakoid* transport experiments analyzing the 16/23 substitution mutants A50C, S54C, S60C, S153C, S159C, S165C, A175C, G178C, and S182C.

Only the region covering the 14 kDa degradation fragment representing Ti-1 is shown. The open arrowheads point to the appearance of the indicative Ti-1 fragments. For further details, see the legends to Figures 1 and 2.

include not only the thylakoid targeting signal peptide but also approximately half of the 23 kDa passenger protein (Figure 2A).

Although membrane binding of the hydrophobic targeting signal could have been expected, the participation of the N-

terminal region of the hydrophilic passenger protein in this process is certainly surprising. Moreover, it is observed not only with thylakoids but also with liposomes. In thylakoid vesicles, proteinaceous Tat machinery is available, which could serve as an interaction partner for the Tat substrate and might thus protect it from direct contact with the lipid bilayer. In line with this, the 16/23 chimera is associated with the presumed TatB/C-receptor complexes of approximately 560 kDa and 620 kDa during thylakoid transport (Berghöfer and Klösgen, 1999; Frielingsdorf and Klösgen, 2007; Frielingsdorf et al., 2008; Jakob et al., 2009). In contrast, the liposomes utilized here do not contain Tat machinery nor any other protein that might serve as a binding partner for the 16/23 chimera. Membrane interaction of the protein therefore implies intimate contact with the lipid bilayer, which in turn should make some demands on the composition of the polypeptide chain. Comparison of the protease-protected region of the 16/23 chimera with the crystal structure of the 23 kDa protein from spinach, which is available in the Brookhaven Protein Databank (Ristvejova et al., 2009), shows a prominent α -helix within this region (Figure 5A). Within the protease-protected fragment, this helix is situated at the C-terminal border. Helical wheel projection suggests that part of this α -helix has an amphipathic character (Figure 5B), which might explain its membrane-binding properties because amphipathic α -helices are known to be capable of interacting with lipid membranes (Roise et al., 1988). It can thus be speculated that on the one hand the hydrophobic core

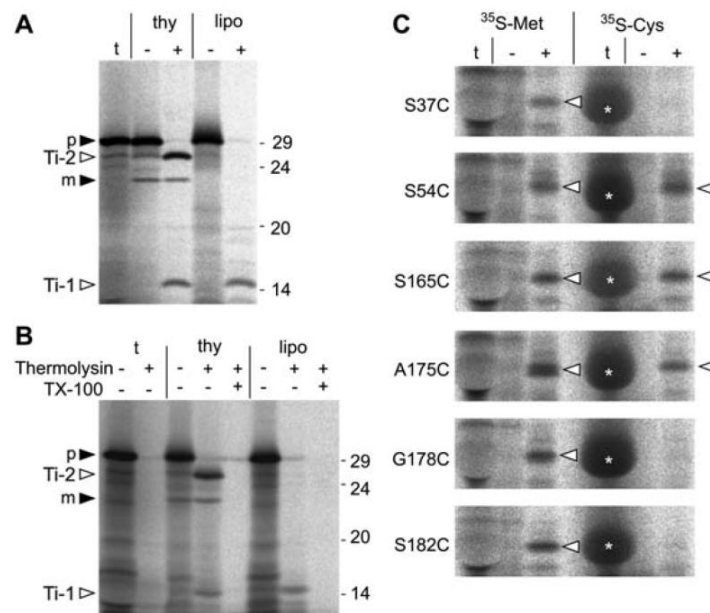


Figure 4 Spontaneous binding of the 16/23 protein to lipid membranes.

(A) Comparison of thylakoid transport and liposome interaction of the 16/23 chimera. 16/23 precursor protein radiolabeled with [35 S]-methionine was analyzed with either isolated pea thylakoids (thy) or artificial liposomes (lipo) as described in the legend to Figure 1. From the liposome fractions, aliquots corresponding to 75 μ g of lipids were loaded. (B) Protease sensitivity of Ti-1 after membrane solubilization. Prior to thermolysin treatment, aliquots of the thylakoid transport and liposome insertion experiments analyzing the 16/23 chimera were either incubated for 5 min on ice with 1% Triton X-100 (TX-100) or mock-treated, as indicated above the lanes. In lane t+, an aliquot of the *in vitro* translation assay treated with thermolysin was loaded. (C) Liposome insertion experiments performed with the substitution mutants S37C, S54C, S165C, A175C, G178C, and S182C of the 16/23 chimera. For further details, see the legend to Figure 3.

of the signal peptide and on the other hand the presumed amphipathic α -helix of the 23 kDa passenger protein trigger in a concerted manner the membrane interaction of the 16/23 chimera.

It remains unknown so far what the exact nature or topology of this membrane interaction is. The results of the 16/23 chimera are reminiscent to the early steps of the unassisted membrane insertion mechanism described for bitopic proteins such as CFo-II, which assume a temporary 'loop' or 'horseshoe' conformation within the membrane (Michl et al., 1994; Robinson et al., 1996; Kim et al., 1998). However, in case of the 16/23 chimera, such a topology would imply that the amphipathic α -helix can at least temporarily adopt a transmembrane orientation. Furthermore, the hydrophilic fragment in between the two proposed membrane segments is rather large (approximately 70 residues) and an unassisted membrane translocation similar to that of the short fragment in CFo-II (<10 residues; Michl et al., 1994) appears thermodynamically unlikely, although it is apparently not impossible (Brambillasca et al., 2006). Hence, it might well be that Ti-1 does not assume a true transmembrane topology but that it is only partially inserted into the membrane interfacial region leaving the hydrophilic segment in a yet unknown, protease-protected manner on the stromal side of the membrane. Experiments are underway to finally solve the conformation of Ti-1.

Irrespective of the true conformation of Ti-1, it must be concluded from the protease-protection assays that the 23 kDa passenger protein undergoes at least partial unfolding upon membrane binding to facilitate the interaction with the lipid bilayer. Interestingly, the part of the protein immediately adjacent to the amphipathic α -helix could not be resolved upon X-ray crystallography (Ristvejova et al., 2009), indicating a considerable degree of flexibility, which in turn could support the relocation of the amphipathic α -helix required upon membrane interaction. Together with the observed properties of Tat machinery to also accept misfolded or unfolded polypeptides as substrates (Hynds et al., 1998; Richter et al., 2007), these observations considerably challenge the proposed demand of complete substrate folding as a means of quality control upon Tat-dependent protein transport (Brüser and Sanders, 2003; DeLisa et al., 2003).

By contrast, membrane binding of Tat substrates as described here should in most instances necessitate significant conformational changes within the passenger polypeptide. Such conformational changes cannot be expected to be possible in all instances and it thus appears unlikely that unassisted membrane insertion is an obligatory step in Tat-dependent membrane transport. Instead, it is reasonable to assume that, depending on the properties of the Tat substrate, there are two alternative possibilities to initiate protein transport by the Tat pathway. If structurally feasible, the precursor protein will probably bind in an unassisted manner to the membranes, because this leads to an enrichment of the Tat substrate in the vicinity of the translocase complexes. If such membrane binding is not possible, the precursor protein will instead interact with the TatBC receptor structures exposed to the stromal phase of the thylakoid membrane.

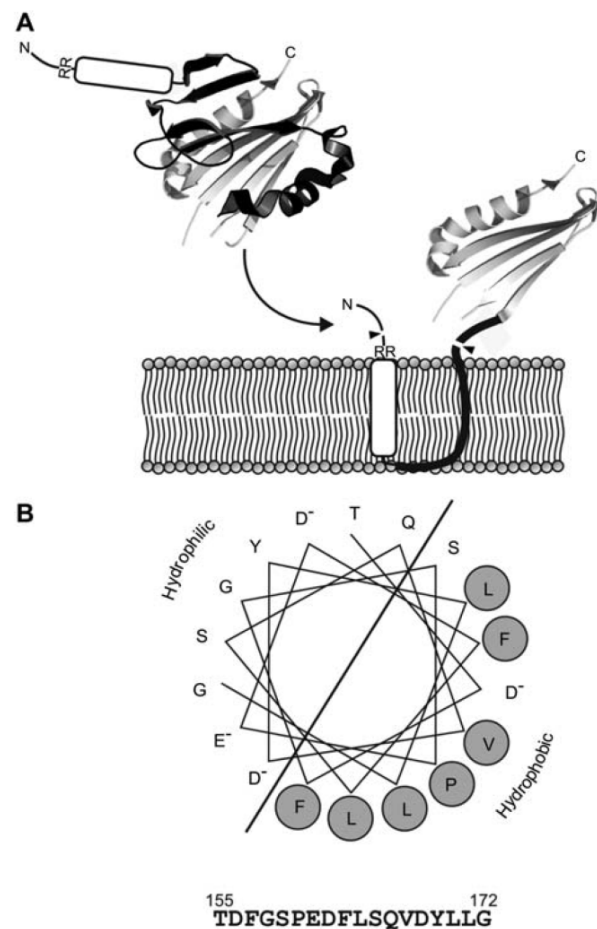


Figure 5 Conformational aspects concerning Ti-1.

(A) Schematic representation of the presumed binding process resulting in the formation of translocation intermediate Ti-1. The crystal structure of the mature 23 kDa protein from spinach was depicted according to Ristvejova et al. (2009) and modified such that those parts of the protein participating in membrane binding are highlighted in black. In the image representing Ti-1, these parts are only displayed as a line in bold font to illustrate the presumed partial unfolding of the passenger protein taking into account the lack of knowledge about the actual structure. The open ellipsoid represents the hydrophobic central core within the thylakoid targeting signal peptide, whereas RR points to the position of the twin arginine motif. Filled arrowheads indicate the critical thermolysin cleavage sites identified in this study. (B) Helical wheel projection of the presumed amphipathic α -helix. The projection of the amino acid sequence from position 155 to position 172 (see Figure 2A), which corresponds to the N-terminal α -helix identified in the crystal structure of the 23 kDa protein from spinach (Ristvejova et al., 2009), was performed by using the Helical Wheel Applet at <http://cti.itc.virginia.edu/~cmg/Demo/wheel/wheelApp.html>. Hydrophobic residues are circled and shaded in gray.

Materials and methods

Site-directed mutagenesis

Mutagenesis was carried out using the QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) and confirmed by

DNA sequencing. The following primers were used: (a) 16/23 S37C: 5'GCT TAG TGG GCC TAC TAC GTG CCG TGT TGC TGT CCC G3' and 5'CGG GAC AGC AAC ACG GCA CGT AGT AGG CCC ACT AAG C3'; (b) 16/23 A50C: 5'GCT TAAA CAT CCG ATG CCA GCA AGT GTC AGC TG3' and 5'CAG CTG ACA CTT GCT GGC ATC GGA TGT TTA AGC3'; (c) 16/23 S54C: 5'CCG AGC TCA GCA AGT GTG CGC TGA GGC TGA GAC TAG C3' and 5'GCT AGT CTC AGC CTC AGC GCA CAC TTG CTG AGC TCG G3'; (d) 16/23 S60C: 5'GCT GAG GCT GAG ACT TGC CGC CGA GCT ATG TTG G3' and 5'CCA ACA TAG CTC GGC GGC AAG TCT CCG ACT CAG C3'; (e) 16/23 S115C: 5'GGA TTC AAG TTG TTG GCA CCT TGC AAA TGG AAC CCA AGC AAA GAG3' and 5'CTC TTT GCT TGG GTT CCA TTT GCA AGG TAC CAA CAA CTT GAA TCC3'; (f) 16/23 S153C: 5'CAA CCC ACT GAC AAG AAA TGC ATC ACA GAC TTC GGT TCC3' and 5'GGA ACC GAA GTC TGT GAT GCA TTT CTT GTC AGT GGG TTG3'; (g) 16/23 S159C: 5'CCA TCA CAG ACT TCG GTT GCC CTG AAG ATT TCC TCT CC3' and 5'GGA GAG GAA ATC TTC AGG GCA ACC GAA GTC TGT GAT GG3'; (h) 16/23 S165C: 5'CCC CTG AAG ATT TCC TCT GCC AAG TGG ATT ACT TGT TGG3' and 5'CCA ACA AGT AAT CCA CTT GGC AGA GGA AAT CTT CAG GGG3'; (i) 16/23 A175C: 5'CTT GTT GGG TAA ACA ATG CTA CTT TGG AAA GAC TG3' and 5'CAG TCT TTC CAA AGT AGC ATT GTT TAC CCA ACA AG3'; (j) 16/23 G178C: 5'GTA AAC AAG CCT ACT TTT GCA AGA CTG ATT CTG AGG3' and 5'CCT CAG AAT CAG TCT TGC AAA AGT AGG CTT GTT TAC3'; (k) 16/23 S182C: 5'CCT ACT TTG GAA AGA CTG ATT GCG AGG GTG GTT TCG ATT CGG G3' and 5'CCG GAA TCG AAA CCA CCC TCG CAA TCA GTC TTT CCA AAG TAG G3'; (l) 16/23 S188C: 5'GAG GGT GGT TTC GAT TGC GGT GTT GCA AG3' and 5'CTT GCA ACA ACA CCG CAA TCG AAA CCA CCC TC3'.

Preparation of liposomes

Phosphatidylcholine dissolved in chloroform was evaporated under a stream of nitrogen and subsequently dried under vacuum for at least 1 h. The lipids were dissolved under rigorous vortexing in HM buffer (10 mM HEPES/KOH, pH 8.0; 5 mM MgCl₂) to a final concentration of 1 mM. Unilamellar liposomes were prepared from this lipid solution by 19-times extrusion through two layers of polycarbonate membranes with 100 nm pores (MacDonald et al., 1991) using a hand-held extruder (Avestin, Ottawa, Canada). The size distribution of the resulting liposomes was determined by dynamic light scattering in a Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK).

Protein transport and membrane insertion experiments

Isolation of chloroplasts and thylakoids from pea seedlings (*Pisum sativum* var. Feltham First) was carried out according to Hou et al. (2006). In thylakoid protein transport experiments with radiolabeled precursor proteins followed published protocols (Marques et al., 2003). Membrane insertion experiments were carried out as described previously (Hou et al., 2006).

Miscellaneous

Gel electrophoresis of proteins under denaturing conditions was carried out according to Laemmli (1970). The gels were exposed to phosphorimager screens and analyzed with the Fujifilm FLA-3000 (Fujifilm, Düsseldorf, Germany) using the software packages BAS-Reader (version 3.14) and AIDA (version 3.25; Raytest, Strauben-

hardt, Germany). All other methods followed published protocols (Sambrook and Russell, 2001).

Acknowledgments

This research was supported by grants from the state Sachsen-Anhalt (Exzellenzcluster Biowissenschaften – Research Cluster B/D) and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (KL 862/2-1).

References

- Alami, M., Luke, I., Deitermann, S., Eisner, G., Koch, H.G., Brunner, J., and Muller, M. (2003). Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in *Escherichia coli*. *Mol. Cell* 12, 937–946.
- Bageshwar, U.K. and Musser, S.M. (2007). Two electrical potential-dependent steps are required for transport by the *Escherichia coli* Tat machinery. *J. Cell Biol.* 179, 87–99.
- Bageshwar, U.K., Whitaker, N., Liang, F.C., and Musser, S.M. (2009). Interconvertibility of lipid- and translocon-bound forms of the bacterial Tat precursor pre-Sufl. *Mol. Microbiol.* 74, 209–226.
- Berghöfer, J. and Klösgen, R.B. (1999). Two distinct translocation intermediates can be distinguished during protein transport by the TAT (Δ pH)-pathway across the thylakoid membrane. *FEBS Lett.* 460, 328–332.
- Berthelmann, F., Mehner, D., Richter, S., Lindenstraus, U., Lunsdorf, H., Hause, G., and Bruser, T. (2008). Recombinant expression of tatABC and tatAC results in the formation of interacting cytoplasmic TatA tubes in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 283, 25281–25289.
- Brambillasca, S., Yabal, M., Makarow, M., and Borgese, N. (2006). Unassisted translocation of large polypeptide domains across phospholipid bilayers. *J. Cell Biol.* 175, 767–777.
- Braun, N.A., Davis, A.W., and Theg, S.M. (2007). The chloroplast Tat pathway utilizes the transmembrane electric potential as an energy source. *Biophys. J.* 93, 1993–1998.
- Brüser, T. and Sanders, C. (2003). An alternative model of the twin arginine translocation system. *Microbiol. Res.* 158, 7–17.
- Chaddock, A.M., Mant, A., Karnachov, I., Brink, S., Herrmann, R.G., Klösgen, R.B., and Robinson, C. (1995). A new type of signal peptide: central role of a twin-arginine motif in transfer signals for the Δ pH-dependent thylakoidal protein translocase. *EMBO J.* 14, 2715–2722.
- Chan, C.S., Zlomislic, M.R., Tieleman, D.P., and Turner, R.J. (2007). The TatA subunit of *Escherichia coli* twin-arginine translocase has an N-in topology. *Biochemistry* 46, 7396–7404.
- Clark, S.A. and Theg, S.M. (1997). A folded protein can be transported across the chloroplast envelope and thylakoid membranes. *Mol. Biol. Cell* 8, 923–934.
- Cline, K. and Mori, H. (2001). Thylakoid Δ pH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport. *J. Cell Biol.* 154, 719–729.
- De Keersmaecker, S., Van Mellaert, L., Schaerlaekens, K., Van Desel, W., Vrancken, K., Lammertyn, E., Anne, J., and Geukens, N. (2005). Structural organization of the twin-arginine translocation system in *Streptomyces lividans*. *FEBS Lett.* 579, 797–802.
- DeLisa, M.P., Tullman, D., and Georgiou, G. (2003). Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin-arginine translocation pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 6115–6120.

- Frielingsdorf, S. and Klösgen, R.B. (2007). Prerequisites for terminal processing of thylakoidal Tat substrates. *J. Biol. Chem.* 282, 24455–24462.
- Frielingsdorf, S., Jakob, M., and Klösgen, R.B. (2008). A stromal pool of TatA promotes Tat-dependent protein transport across the thylakoid membrane. *J. Biol. Chem.* 283, 33838–33845.
- Gouffi, K., Gerard, F., Santini, C.L., and Wu, L.F. (2004). Dual topology of the *Escherichia coli* TatA protein. *J. Biol. Chem.* 279, 11608–11615.
- Hou, B., Frielingsdorf, S., and Klösgen, R.B. (2006). Unassisted membrane insertion as the initial step in Δ pH/Tat-dependent protein transport. *J. Mol. Biol.* 355, 957–967.
- Hynds, P.J., Robinson, D., and Robinson, C. (1998). The sec-independent twin-arginine translocation system can transport both tightly folded and malformed proteins across the thylakoid membrane. *J. Biol. Chem.* 273, 34868–34874.
- Jakob, M., Kaiser, S., Gutensohn, M., Hanner, P., and Klösgen, R.B. (2009). Tat subunit stoichiometry in *Arabidopsis thaliana* challenges the proposed function of TatA as the translocation pore. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 388–394.
- Kim, S.J., Robinson, C., and Mant, A. (1998). Sec/SRP-independent insertion of two thylakoid membrane proteins bearing cleavable signal peptides. *FEBS Lett.* 424, 105–108.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- MacDonald, R.C., MacDonald, R.I., Menco, B.P., Takeshita, K., Subbarao, N.K., and Hu, L.R. (1991). Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1061, 297–303.
- Marques, J.P., Dudeck, I., and Klösgen, R.B. (2003). Targeting of EGFP chimeras within chloroplasts. *Mol. Genet. Genomics* 269, 381–387.
- Marques, J.P., Schattat, M.H., Hause, G., Dudeck, I., and Klösgen, R.B. (2004). In vivo transport of folded EGFP by the Δ pH/TAT-dependent pathway in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 55, 1697–1706.
- Michl, D., Robinson, C., Shackleton, J.B., Herrmann, R.G., and Klösgen, R.B. (1994). Targeting of proteins to the thylakoids by bipartite presequences: CfoII is imported by a novel, third pathway. *EMBO J.* 13, 1310–1317.
- Mori, H. and Cline, K. (2002). A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid Δ pH/Tat translocase. *J. Cell Biol.* 157, 205–210.
- Mori, H., Summer, E.J., Ma, X., and Cline, K. (1999). Component specificity for the thylakoidal Sec and Δ pH-dependent protein transport pathways. *J. Cell Biol.* 146, 45–56.
- Mori, H., Summer, E.J., and Cline, K. (2001). Chloroplast TatC plays a direct role in thylakoid Δ pH-dependent protein transport. *FEBS Lett.* 501, 65–68.
- Motohashi, R., Nagata, N., Ito, T., Takahashi, S., Hobo, T., Yoshida, S., and 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*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 10499–10504.
- Müller, M. and Klösgen, R.B. (2005). The Tat pathway in bacteria and chloroplasts. *Mol. Membr. Biol.* 22, 113–121.
- Pop, O.I., Westermann, M., Volkmer-Engert, R., Schulz, D., Lemke, C., Schreiber, S., Gerlach, R., Wetzker, R., and Müller, J.P. (2003). Sequence-specific binding of prePhoD to soluble TatAd indicates protein-mediated targeting of the Tat export in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 278, 38428–38436.
- Richter, S. and Brüser, T. (2005). Targeting of unfolded PhoA to the TAT translocon of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 280, 42723–42730.
- Richter, S., Lindenstrauss, U., Lucke, C., Bayliss, R., and Brüser, T. (2007). Functional Tat transport of unstructured, small, hydrophilic proteins. *J. Biol. Chem.* 282, 33257–33264.
- Ristvejova, R., Lapkouski, M., Kopecky Junior, V., Hofbauerova, K., Sofova, Z., Gonzalez-Perez, S., Kuta Smatanova, I., Revuelta, J.L., Arellano, J.B., and Etrich, R. (2009). Structure of PsbP protein from *spinacea oleracea* at 1.98 Å resolution. Brookhaven Protein Database, PDB code: 2VU4.
- Robinson, D., Karnauchov, I., Herrmann, R.G., Klösgen, R.B., and Robinson, C. (1996). Protease-sensitive thylakoidal import machinery for the Sec- Δ pH- and signal recognition particle-dependent protein targeting pathways, but not for Cfo-II integration. *Plant J.* 10, 149–155.
- Roise, D., Theiler, F., Horvath, S.J., Tomich, J.M., Richards, J.H., Allison, D.S., and Schatz, G. (1988). Amphiphilicity is essential for mitochondrial presequence function. *EMBO J.* 7, 649–653.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Santini, C.L., Ize, B., Chanal, A., Müller, M., Giordano, G., and Wu, L.F. (1998). A novel sec-independent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 17, 101–112.
- Sargent, F., Bogsch, E.G., Stanley, N.R., Wexler, M., Robinson, C., Berks, B.C., and Palmer, T. (1998). Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. *EMBO J.* 17, 3640–3650.
- Settles, A.M., Yonetani, A., Baron, A., Bush, D.R., Cline, K., and Martienssen, R. (1997). Sec-independent protein translocation by the maize Hcf106 protein. *Science* 278, 1467–1470.
- Shanmugham, A., Wong Fong Sang, H.W., Bollen, Y.J., and Lill, H. (2006). Membrane binding of twin arginine preproteins as an early step in translocation. *Biochemistry* 45, 2243–2249.
- Theg, S.M., Cline, K., Finazzi, G., and Wollman, F.A. (2005). The energetics of the chloroplast Tat protein transport pathway revisited. *Trends Plant Sci.* 10, 153–154.
- Walde, P. and Ichikawa, S. (2001). Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications. *Biomol. Eng.* 18, 143–177.
- Walker, M.B., Roy, L.M., Coleman, E., Voelker, R., and Barkan, A. (1999). The maize tha4 gene functions in sec-independent protein transport in chloroplasts and is related to hcf106, tatA, and tatB. *J. Cell Biol.* 147, 267–276.
- Westermann, M., Pop, O.I., Gerlach, R., Appel, T.R., Schlormann, W., Schreiber, S., and Müller, J.P. (2006). The TatAd component of the *Bacillus subtilis* twin-arginine protein transport system forms homo-multimeric complexes in its cytosolic and membrane embedded localisation. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 443–451.

Received June 11, 2010; accepted August 11, 2010

2.2.3 Ergänzende Ergebnisse

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob das 16/23 Protein eine integrale *loop*-Topologie innerhalb der Membran annimmt (siehe Abb.6) oder ob es nur partiell in die äußere Lipidschicht inseriert bzw. lediglich von außen der Membran anhängt, in einer Konformation jedoch, die einen kompletten proteolytischen Abbau verhindert. Ziel war es somit, hydrophile, stromal exponierte und mögliche lumenal lokalisierte Regionen innerhalb des 16/23 Proteins genauer zu bestimmen.

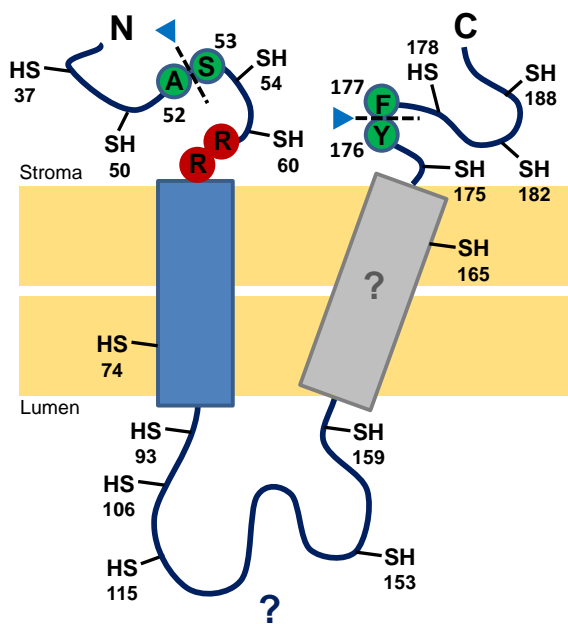


Abb.6 Mögliche Konformation des Ti-1 an der Thylakoidmembran. Schematische Darstellung einer Ti-1 Konformation an der Thylakoidmembran (gelb), wie sie in Schlesier und Klösger (2010) diskutiert wird. Cysteinreste (-SH), die zur Bestimmung der Ti-1 Fragmentgröße und Membrantopologie im Verlauf dieser Arbeit in das 16/23 Protein eingefügt wurden, sind entsprechend ihrer Positionen innerhalb der Primärsequenz nummeriert. Die Positionen der Thermolysinspaltung sind gesondert markiert (blaue Pfeilköpfe). Zudem sind das Doppelarginin-Motiv (RR) und die nachfolgende hydrophobe Helix des Tat-Signalpeptids rot bzw. blau hervorgehoben. Ein zweite, transmembrane Helix (grau) sowie ein möglicher lumenaler *loop* (dunkel blau) stehen zur Diskussion und sind mit einem Fragezeichen gekennzeichnet. Für weitere Details, siehe Text.

Ein etablierter Ansatz zur genauen Untersuchung von Membrangrenzen und Membranproteintopologien ist die chemische Modifikation von Cysteinseitenketten, genannt *SCAM* (*substituted cysteine accessibility method*) (zusammengefasst in Bogdanov *et al.*, 2005). Diese Methode beruht dabei auf der Verwendung von thiolmodifizierenden Reagenzien wie AMS (4-Azetamido-4'-Maleimidylstilben-2,2'-disulfonsäure) oder MalPEG₅₀₀₀ (Methoxypolyethylenglykolmalimid) (Chan *et al.*, 2007; Koch *et al.*, 2012), die freie Cysteinreste unter Ausbildung einer stabilen Thioether-Verbindung modifizieren.

2.2.3.1 Bestimmung der Ti-1 Membrantopologie mittels AMS

Zunächst sollte analysiert werden, inwiefern AMS in der Lage ist die Cysteine sowohl im unveränderten 16/23 Protein als auch in dessen Cysteinsubstitutionsmutanten, die vormals für die Lokalisierung des Ti-1 Fragmentes benutzt wurden (Schlesier and Klösger, 2010), in Lösung zu modifizieren. Für diesen Versuch wurde jeweils ein Aliquot der entsprechenden radioaktiven *in vitro*-Translationen der Mutanten, versetzt mit HM-Puffer, mit AMS inkubiert. Wie in Abbildung 7A zu sehen, weisen alle Cysteinmutanten des 16/23 Proteins einen leichten

Banden-*shift* des Vorläuferproteins (p) auf. Dieses Experiment zeigt, dass alle eingeführten Cysteine mittels AMS modifiziert werden können, wohingegen das C-terminale Cystein des unveränderten 16/23 Proteins zumindest in löslicher Phase nicht zugänglich für das Reagens zu sein scheint.

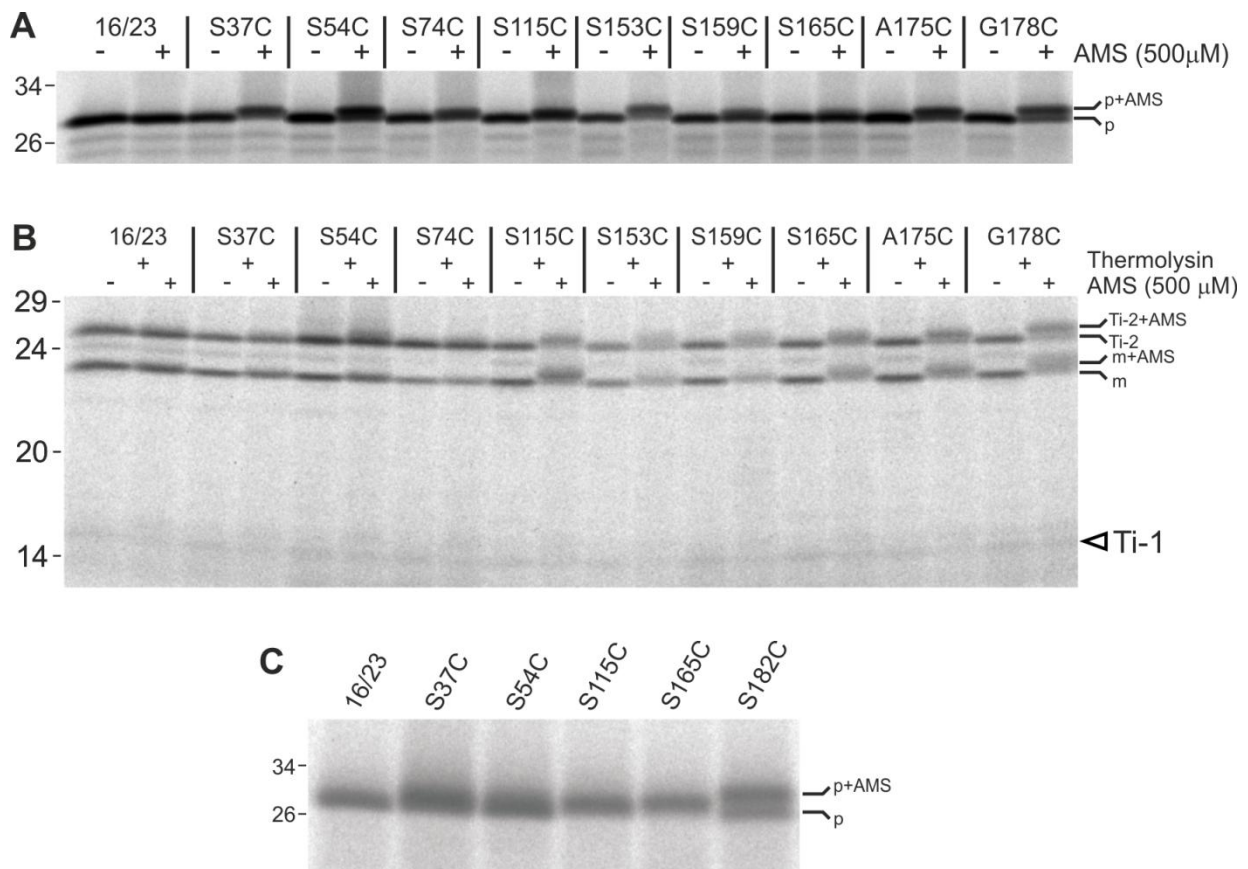


Abb.7 Cysteinmodifikation von 16/23 Derivaten mittels des thioispezifischen Reagens AMS. (A) Aliquots der *in vitro* Translationen der aufgeführten Cysteinmutanten des 16/23 Proteins wurden für 30 min bei 30°C mit 500 μ M AMS in HM-Puffer inkubiert. Die eingesetzten Vorläuferproteine sowie AMS *crosslinking*-Produkte (p+AMS) sind markiert. **(B)** Nach Inkubation der Thylakoide mit den 16/23 Derivaten für 10 min bei 25°C wurden die Transportansätze in zwei Fraktionen aufgeteilt. Beide Fraktionen wurden mit Thymolysin für 30 min bei 4°C behandelt und anschließend, nach dem Abstoppen der proteolytischen Degradation, für weitere 30 min bei 30°C mit HM-Puffer oder 500 μ M AMS inkubiert. Die Banden der Translokationsintermediate 1 und 2 (Ti-1 und Ti-2), des reifen Proteins (m) sowie der AMS *crosslinking*-Produkte (Ti-2+AMS, m+AMS) sind angezeigt. **(C)** Liposomen, bestehend aus Phosphatidylcholin, wurden mit den beschriebenen Cysteinmutanten des 16/23 Proteins für 5 min bei 4°C inkubiert und nach einem Waschriff mit HM-Puffer für 30 min bei 30°C mit 500 μ M AMS versetzt. Für weitere Details, siehe **(A)**. Sämtliche Proben wurden auf einem 10-17,5%igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt und die radioaktiven Signale mittels *Phosphorimager* sichtbar gemacht.

In einem nächsten Schritt wurde diese Methode auf Thylakoidtransportexperimente mit den jeweiligen Cysteinsubstitutionsmutanten des 16/23 Proteins angewendet (Abb.7B). Da AMS laut Literatur nicht in der Lage ist Membranen zu passieren (Chan *et al.*, 2007), wurde davon ausgegangen, dass nur diejenigen Mutanten modifiziert werden sollten, die ein Cysteinrest innerhalb eines stromal exponierten Proteinbereiches beherbergen. Nach erfolgter

Inkubation der einzelnen Mutanten unter Thylakoidtransportbedingungen wurden die jeweiligen Ansätze proteasebehandelt und erst anschließend mit AMS versetzt, um eine weitere Translokation der potentiell modifizierten 16/23 Derivate zu verhindern. Es wurde angenommen, dass nur diejenigen Ti-1 Fragmente einen Banden-*shift* von ca. 500 Da aufweisen sollten, die auch ein AMS-zugängliches Cystein beinhalten. Betrachtet man zunächst die translokationsspezifischen Banden (Ti-2 und reifes Protein), so erkennt man, dass die S37C Mutante wie erwartet keine Modifikation aufweist, da deren N-terminales Cystein nach Thermolysinbehandlung abgespalten wurde. Interessanterweise wies auch die S74C Mutante, bei der sich ein zusätzliches Cystein im hydrophoben Signalpeptid befindet, keine detektierbare Modifikation auf.

Es stellte sich jedoch heraus, dass nach Proteasebehandlung die Thylakoidmembran für AMS passierbar ist, was sich im Falle der Mutanten S115C, S153C, S159C, S165C, A175C und G178C in einer Modifikation von bereits translozierten Proteinbereichen (reifes Protein und Ti-2) widerspiegelt. Normalerweise sollten sich diese Bereiche vor AMS geschützt im Thylakoidlumen befinden. Von den N-terminalen Cysteinmutanten zeigte im Vergleich zur Negativkontrolle (16/23) nur das S54C Protein einen schwachen *shift* der Ti-2 Bande. Darüber hinaus waren nach erfolgter Proteasebehandlung und anschließender Inkubation der Ansätze mit HM-Puffer oder AMS so gut wie keine Ti-1 Fragmentbanden detektierbar, sodass eine Aussage über eine erfolgte Modifizierung der Ti-1 Fragmente einzelner Cysteinmutanten nicht möglich war.

Aufgrund dieser Einschränkungen, wurden weitere AMS-Untersuchungen mit Liposomen anstelle von Thylakoiden durchgeführt. Solche artifiziellen Vesikel haben den Vorteil, dass sie keinen funktionellen Tat-Translokationsapparat beinhalten und es somit nach Zugabe des Proteins unweigerlich zu dessen Akkumulation in Ti-1 Konformation kommt. Unter Verwendung von Liposomeninsertionsexperimenten wurden nun im Detail jene Mutanten analysiert, die ein Cystein in der Nähe der vormals bestimmten N- und C-terminalen Enden des Ti-1 Fragmentes besitzen (S37C, S54C, S165C, S182C) (Abb.6C). Dabei wurde die S115C Mutante als Negativkontrolle verwendet, da angenommen wurde, dass diese Position in der Mitte des Ti-1 Fragmentes lokalisiert ist. Wie erwartet zeigen die Mutanten S37C und S182C nach externer Zugabe von AMS schwache Banden-*shifts*, die für eine spezifische Thiolmodifikation sprechen. Im Gegensatz dazu zeigen alle anderen Mutanten auf dem ersten Blick keine erkennbaren Unterschiede im Vergleich zum unveränderten 16/23 Protein. Jedoch lässt vor allem ein Vergleich zwischen den S165C und S182C Proteinen hinsichtlich des Laufverhaltens ihrer Banden erahnen, dass der markante Banden-*shift* bei der S182C Mutante möglicherweise auf einer Modifizierung sowohl des eingebrachten Cysteins als auch des C-terminal vorliegenden beruht. Hingegen zeigt die S165C Bande ein Laufverhalten, das zwischen denen des nicht modifizierten und des mutmaßlich zweifach modifizierten S182C Proteins liegt, was

wiederum für eine einfache Modifizierung dieser Mutante spricht. Demnach lässt sich mittels dieser Methode eine Modifikation der Positionen 115 und 165 nicht eindeutig ausschließen.

2.2.3.2 Bestimmung der Ti-1 Membrantopologie mittels MalPEG₅₀₀₀

Obwohl gezeigt werden konnte, dass das thiolreaktive Reagens AMS durchaus in der Lage ist die Cysteinreste der jeweiligen 16/23 Mutanten zu modifizieren, stellte sich dennoch heraus, dass die detektierbaren Banden-*shifts* der modifizierten Proteine nur sehr geringfügig sind und somit potentielle Modifikationen schwierig festzustellen sind. Zudem weisen die vorherigen Ergebnisse darauf hin, dass das 500 Da kleine AMS nach erfolgter Thermolysinbehandlung das Thylakoidlumen erreichen kann und somit auch Proteinbereiche auf der *trans*-Seite der Thylakoidmembran modifiziert. Demnach wäre eine eindeutige Lokalisierung der Cysteinreste im Ti-1 Fragment, ob lumenal oder stromal exponiert, mit AMS nicht möglich. Um diese Probleme zu umgehen, kam in den folgenden Experimenten zur Bestimmung der Ti-1 Topologie mit MalPEG₅₀₀₀ ein weiteres thiolreaktives Reagens mit einem Molekulargewicht von ca. 5 kDa zum Einsatz.

Erst vor Kurzem konnte gezeigt werden, dass MalPEG₅₀₀₀ in der Lage ist effektiv Proteine von bakteriellen Membranen zu modifizieren (Koch *et al.*, 2012). Basierend auf dessen relativ großem Molekulargewicht bestand die Vermutung, dass eine MalPEG₅₀₀₀-Modifikation der jeweiligen 16/23 Mutanten besser zu unterscheiden ist, als eine Modifikation die mittels AMS durchgeführt wurde. Zunächst sollte abermals untersucht werden, ob auch dieses Reagens in der Lage ist, die Cysteine des originalen 16/23 Proteins sowie der verwendeten Mutanten in löslicher Phase zu modifizieren. Auch hierzu wurde das thiolreaktive Reagens zu einem Aliquot der entsprechenden *in vitro*-Translation in HM-Puffer gegeben und für 30 min bei 25°C inkubiert (Abb.8A).

Da eine Thermolysinbehandlung die Thylakoidmembran für AMS durchlässig macht, wurde als nächstes mittels Thylakoidtransportexperimenten der Mutanten S54C, S115C und G178C untersucht, ob auch der Einsatz von MalPEG₅₀₀₀ zu einer Modifikation von bereits translozierten Proteinbereichen nach erfolgter Proteasebehandlung führt. Die Ergebnisse in Abbildung 8B zeigen jedoch, dass im Gegensatz zu den AMS-Experimenten keines der verwendeten Proteine bezüglich Ti-2 und reifem Protein detektierbare Banden-*shifts* aufweist. Dennoch lässt sich auch hier erkennen, dass nach Proteasebehandlung und anschließender Inkubation mit MalPEG₅₀₀₀ die Ti-1 Fragmentbanden nur als schwache Signale auftreten. Dies wiederum erlaubt abermals keine Rückschlüsse auf eine mögliche Modifikation der jeweiligen Positionen im Ti-1 Fragment.

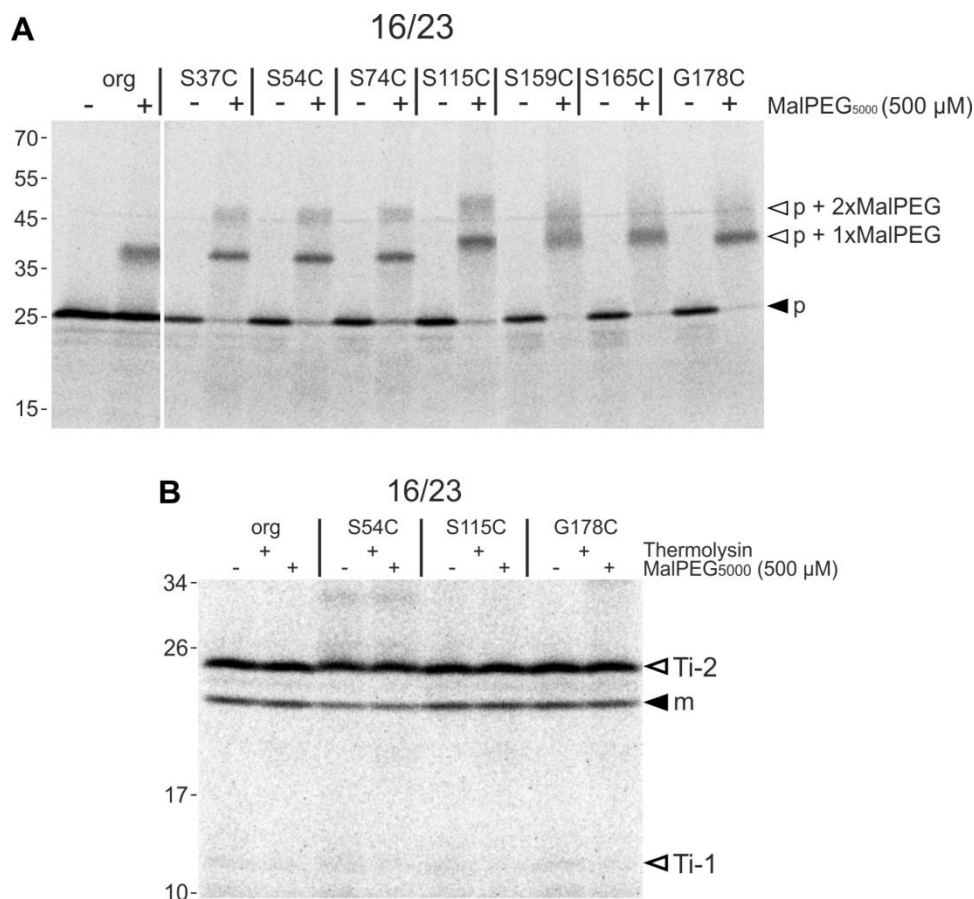


Abb.8 Cysteinmodifikation von 16/23 Derivaten mittels des thiol-spezifischen Reagens MalPEG₅₀₀₀. (A) Aliquots der *in vitro*-Translationen der aufgeführten Proteine wurden für 30 min bei 25°C mit 500 μM MalPEG₅₀₀₀ in HM-Puffer inkubiert. Die eingesetzten Vorläuferproteine sowie MalPEG₅₀₀₀ crosslinking Produkte (p+MalPEG) sind markiert. (B) Nach Inkubation der Thylakoide mit den 16/23 Derivaten für 10 min bei 25°C wurden die Transportansätze in zwei Fraktionen aufgeteilt. Beide Fraktionen wurden mit Thermolysin für 30 min bei 4°C behandelt und anschließend, nach dem Abstoppen der proteolytischen Degradation, für weitere 30 min bei 25°C mit HM-Puffer oder 500 μM MalPEG₅₀₀₀ inkubiert. Für weitere Details, siehe Abb.7.

Um stärkere Signale der Ti-1 Fragmentbanden zu erhalten, wurden die weiteren Analysen mit transportinkompetenten Thylakoiden durchgeführt. Es konnte vormalig gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung von Thylakoiden mit Antikörper gegen TatA zu einer vollständigen Inhibierung des Transports von Tat-Substraten wie dem 16/23 Protein führt, was wiederum in einer Akkumulation des Vorläuferproteins in Ti-1 Konformation resultiert (Hauer *et al.*, 2013). Darüber hinaus wurden im Gegensatz zu den bisherigen Transportexperimenten die substratbeladenen Thylakoide zunächst mit MalPEG₅₀₀₀ inkubiert und erst anschließend nach einem Waschschriff mit Thermolysin behandelt. Das in Abbildung 9A gezeigte Ergebnis aus diesem Experiment, bestätigt hierbei nicht nur die Akkumulation des Ti-1, sondern auch die Modifikation des entsprechenden Fragments von einigen Cysteinmutanten. Wie angenommen, zeigen das ursprüngliche 16/23 Protein und dessen G178C Mutante kein Ti-1 Banden-*shift* in den entsprechenden MalPEG₅₀₀₀-Ansätzen, da deren Cysteine zu weit C-Terminal lokalisiert sind und durch Thermolysin abgespalten werden. Im Gegensatz dazu weisen alle anderen

Mutanten der Reste 54 bis 175 eine Modifikation ihrer Ti-1 Fragmente auf. Interessanterweise zeigen die beiden N-Terminalen Cysteinmutanten S54C und S74C nur eine sehr schwache *crosslinking*-Bande bei ca. 20 kDa, was darauf hindeutet, dass diese Reste nicht so einfach zugänglich für dieses Reagens sind, da sie möglicherweise zum großen Teil in der Membran eingebettet sind. Das wohl überraschendste Ergebnis dieses Experiments war jedoch die deutliche Modifikation des Ti-1 Fragments der Cysteinmutanten S115C, S153C und S165C. Diese Reste sind gegenüber einer Proteasebehandlung geschützt, was vormalig zu der Vermutung führte, dass sie Teil eines möglichen luminalen *loops* des Ti-1 sind. Jedoch verweist dieses Resultat auf eine Anlagerung des Vorläuferproteins von der stromalen Seite an die Thylakoidmembran, sodass diese Reste, wenn auch nicht für Thermolysin, zumindest aber für das kleinere MalPEG₅₀₀₀ zugänglich sind.

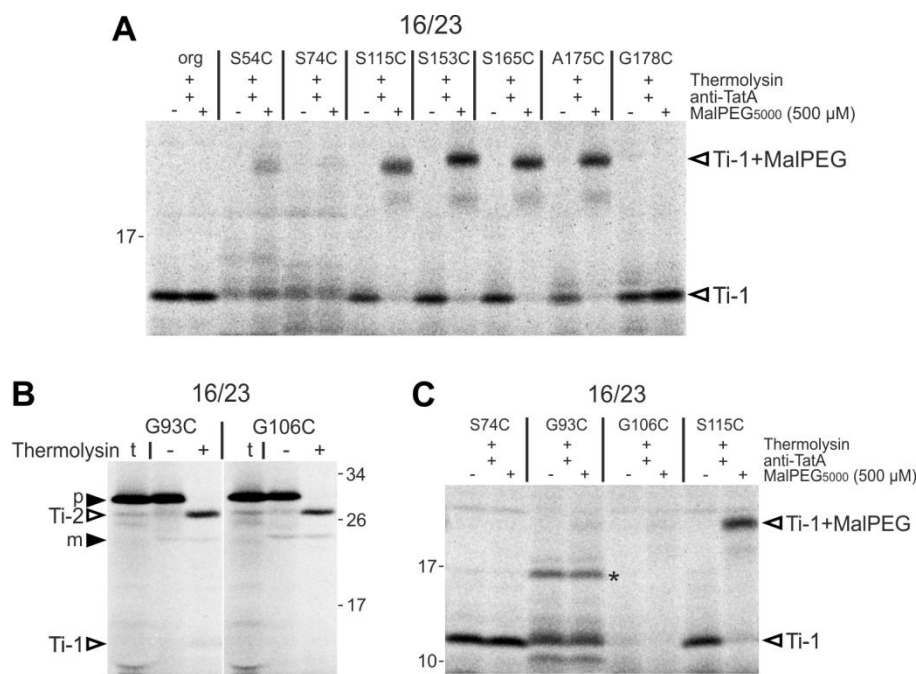


Abb.9 Ti-1 Fragmentmodifikation von Cysteinmutanten des 16/23 Proteins mittels MalPEG₅₀₀₀. (A) Anti-TatA vorbehandelte Thylakoide wurden für 10 min bei 25°C mit den beschriebenen Cysteinmutanten des 16/23 Proteins inkubiert. Die entsprechenden Ansätze wurden anschließend in zwei Fraktionen aufgeteilt und nachfolgend entweder mit HM-Puffer oder 500 μM MalPEG₅₀₀₀ für 30 min bei 30°C inkubiert. Nach einmal Waschen mit HM-Puffer wurden alle Fraktionen mit Thermolysin für 30 min bei 4°C behandelt. Die Banden des Ti-1 und der MalPEG₅₀₀₀-*crosslinking*-Produkte (Ti-1+MalPEG) sind markiert. (B) Thylakoidtransportexperiment mit 15-minütiger Inkubation bei 25°C unter Verwendung der Cysteinmutanten G93C und G106C. In den Spuren (t) wurden je 1 μl der jeweiligen *in vitro*-Translation aufgetragen. (C) MalPEG₅₀₀₀-Modifikationsexperiment mit anti-TatA vorbehandelten Thylakoiden. Unspezifische Degradationsbanden sind mit einem Stern markiert. Für weitere Details, siehe (A) und Abb.7.

Als Nächstes sollte im Detail die Region zwischen den Positionen 74 und 115 untersucht werden. Aus diesem Grund wurden zwei weitere Cysteinsubstitutionen in den Positionen 93 und 106 in der Primärsequenz des 16/23 Proteins durchgeführt. Beide Mutationen zeigen dabei im Verlauf eines Thylakoidtransportexperiments keinen Effekt auf den Membrantransport des

jeweiligen Proteins, mit der Ausnahme, dass für die G106C Mutante kein Ti-1 Fragment detektierbar ist (Abb.9B). Weiterhin lässt sich auch bei Verwendung von transportinkompetenten Thylakoiden keine Akkumulation von Ti-1 nachweisen (Abb.9C), was somit stark darauf hindeutet, dass dieser Rest eine wichtige Rolle in der Stabilisierung der Ti-1 Konformation des Vorläuferproteins in oder an der Membran spielt. Im Gegensatz dazu lässt sich bei der G93C Mutante durchaus ein Ti-1 Signal detektieren, das jedoch keinerlei Modifikation in seiner Bande nach MalPEG₅₀₀₀-Behandlung aufweist. Zusammen mit den Modifikationsansätzen der anderen Cysteinmutanten implizieren diese Ergebnisse, dass ein möglicher luminaler *loop* wesentlich kleiner sein muss, als vorher vermutet, oder anders ausgedrückt, dass nur ein geringer Teil des Ti-1 nicht stromal exponiert vorliegt.

Um nun zu bestimmen, ob einer der Reste, die gegen extern zugeführtes MalPEG₅₀₀₀ geschützt vorliegen, das Vesikellumen erreicht, wurden Insertionsexperimente mit den jeweiligen Cysteinmutanten unter Verwendung von MalPEG₅₀₀₀-beladenen Liposomen durchgeführt (Abb.10A). Im Zuge dieses Experiments sollten, so die Vermutung, nur Reste, die im Lumen exponiert vorliegen, durch das eingeschlossene thiolreaktive Reagens modifiziert werden. Jedoch zeigte sich, dass nicht nur die Mutanten S115C und S165C, bei denen vorab keine Modifikation durch internes MalPEG₅₀₀₀ erwartet wurde, sondern auch die Mutanten S74C und G93C keinen detektierbaren Banden-*shift* des Vorläuferproteins aufweisen. Dennoch ermöglichen diese Ergebnisse keine eindeutige Aussage darüber, ob Teile des Vorläuferproteins das Liposomenlumen erreichen oder nicht, da hier nicht ausgeschlossen werden kann, dass das Fehlen von möglichen *crosslinking*-Banden auch auf einer Inaktivierung des MalPEG₅₀₀₀ während der Einschlussprozedur beruht.

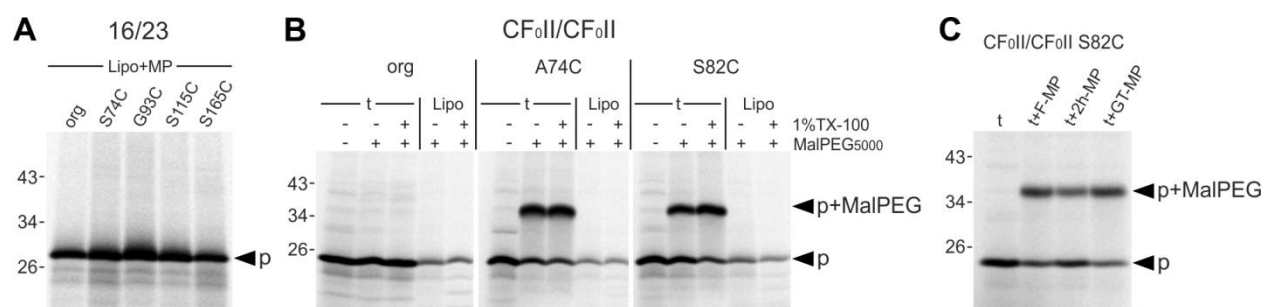


Abb.10 Membranlokalisierung von Cysteinen mittels liposomal eingeschlossenem MalPEG₅₀₀₀. (A) Liposomeninsertionsexperiment mit MalPEG₅₀₀₀-beladenen Lipidvesikeln (Lipo+MP). Die Proben wurden für 30 min bei 30 °C mit den aufgeführten Cysteinmutanten inkubiert. (B) Aliquots der *in vitro*-Translation des originalen CF₀II Vorläuferproteins sowie von zwei Cysteinsubstitutionsmutanten wurden mit HM-Puffer oder 500 µM MalPEG₅₀₀₀ für 30 min bei 30 °C inkubiert, wobei jeweils ein Ansatz 1% Triton X-100 enthielt (t). Gleichzeitig wurden mit den gleichen Proteinen Liposomeninsertionsexperimente wie in (A) beschrieben durchgeführt (Lipo). In jeweils einem Insertionsansatz wurde das Liposomensediment vor der Inkubation mit Triton X-100-haltigen HM-Puffer (1% im Ansatz) resuspendiert und der Überstand nach Ultrazentrifugation mit Aceton gefällt. (C) Kontrollexperimente zur Untersuchung der MalPEG₅₀₀₀-Aktivität. Aliquots der *in vitro*-Translation der S82C Mutante des CF₀II-Vorläuferproteins wurden für 30 min bei 30 °C mit je 500 µM an frisch angesetzten MalPEG₅₀₀₀ (F-MP), zwei Stunden auf Eis stehendem MalPEG₅₀₀₀ (2h-MP) und durch Gefrier-Tau-Zyklen behandelten MalPEG₅₀₀₀ (GT-MP: -195°C und 65°C) inkubiert. Für weitere Details, siehe Abb.7 und 8.

Zur Klärung, ob das eingeschlossene Reagens noch aktiv ist, sollten zunächst Insertionsexperimente mit einem Kontrollprotein, das nachweisbar in die Membran inseriert, durchgeführt werden. Zu diesen Proteinen gehört unter anderem das CF₀II Vorläuferprotein (CF₀II/CF₀II), von dem gezeigt werden konnte, dass es zwei Transmembranbereiche aufweist, die durch einen kurzen lumenal exponierten *loop* miteinander verbunden sind (Michl *et al.*, 1994). Da das CF₀II Protein aus Spinat in seiner ursprünglichen Sequenz kein Cystein aufweist, wurden für die Insertionsexperimente mit MalPEG₅₀₀₀-beladenen Liposomen zusätzlich zwei Cysteinsubstitutionsmutanten eingesetzt, deren Cysteinreste sich entweder im vorhergesagten hydrophilen *loop* (A75C) und oder N-terminal am zweiten Transmembranbereich (S82C; Schinke, 2008) befinden. Wie in Abbildung 10B zu sehen, können beide Reste durch das Reagens zumindest in wässriger Phase effektiv modifiziert werden, wobei auch die Anwesenheit von 1% Triton X-100 keinen erkennbaren Einfluss auf die Modifizierungseffizienz zu haben scheint. Während sich die *in vitro*-Translationen von beiden Cysteinmutanten gut modifizieren lassen, fehlt bei den entsprechenden Insertionsexperimenten mit diesen Proteinen jegliche *crosslinking*-Bande, die für eine Insertion des Vorläuferproteins in die Membran und einer damit einhergehenden Exposition des jeweiligen Cysteinrestes im Liposomenlumen sprechen würde. Selbst eine Solubilisierung der Vesikelmembranen durch Triton X-100, die eine Freisetzung des eingeschlossenen Reagens bewirken sollte, führt zu keiner detektierbaren Proteinmodifikation. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde vermutet, dass durch die harsche Prozedur des MalPEG₅₀₀₀-Einschlusses in die Vesikel, die mehrere Gefrier-Tau-Zyklen umfasst, möglicherweise das Reagens zerstört werden könnte. Aus diesem Grund wurden in einem nachfolgenden Experiment Aliquots der *in vitro*-Translation des CF₀II/CF₀II S82C Proteins mit unterschiedlich behandelten MalPEG₅₀₀₀-Lösungen inkubiert und die entsprechenden Ansätze hinsichtlich der Modifizierungsaktivität des Reagens überprüft (Abb.10C). Es zeigte sich, dass im Vergleich zu einer frisch angesetzten Reagenslösung nicht nur eine längere Inkubation auf Eis, sondern auch mehrere Gefrier-Tau-Zyklen zu keiner erkennbaren Aktivitätsabnahme des thiolreaktiven Reagens führen.

Da nun mittels der beschriebenen Experimentieransätze ausgeschlossen werden kann, dass die Einschlussprozedur zu einer Inaktivierung des MalPEG₅₀₀₀ führt, bleibt die Frage bestehen, warum sich zumindest die Mutanten des CF₀II Vorläuferproteins nicht modifizieren lassen. Obwohl in früheren Studien eine Insertion des CF₀II Vorläuferproteins in die Thylakoidmembran eindeutig nachgewiesen werden konnte (Michl *et al.*, 1994), lässt sich dennoch nicht gänzlich ausschließen, dass das Protein nicht vollständig in die Lipiddoppelschicht der Liposomen inserieren kann. Weitaus plausibler erscheint jedoch die Vermutung, dass die Einschlusseffizienz des Reagens zu gering ist und somit keine erkennbare Modifizierung der jeweiligen Proteine stattfinden kann (siehe hierzu Diskussion im Abschnitt 3.1).

2.2.3.3 Bestimmung der Ti-1 Membrantopologie mittels EGFP-SulfoSMCC

Um den Einschluss eines thiolreaktiven Reagens in die Liposomen besser verfolgen zu können, wurde ein weiterer komplementärer Ansatz zur Topologiebestimmung des Ti-1 in Betracht gezogen. Dieser basiert auf dem löslichen EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*), das thiolreaktive *crosslinker* an seiner Oberfläche kovalent gebunden hat. Hierfür wurde heterolog überexprimiertes und gefaltetes EGFP im Verlauf einer NHS-Ester Kopplungsprozedur an einigen seiner 20 oberflächenexponierten Lysinreste unter Verwendung des heterobifunktionalen *crosslinkers* SulfoSMCC (Sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidoethyl) cyclohexan-1-carboxylat) modifiziert. Zur Verhinderung einer Oligomerisierung der veränderten EGFP Moleküle wurden die zwei Cysteinreste des Proteins vor der eigentlichen SulfoSMCC-Modifikation mittels Iodacetamid blockiert (Abb.11A). *Crosslinking*-Experimente, in denen das reaktive EGFP-SMCC (Emal) mit BSA (*bovine serum albumine*) inkubiert wurde, ließen durch das Erscheinen eines *crosslinking*-Produktes (Emal-BSA) auf die Funktionalität der eingefügten Thiolreaktiven Gruppen des EGFP Derivats schließen (Abb.11B). Sowohl die beschriebene NHS-Kopplungsprozedur als auch der Funktionalitätstest wurden freundlicherweise von Dr. Mario Jakob durchgeführt.

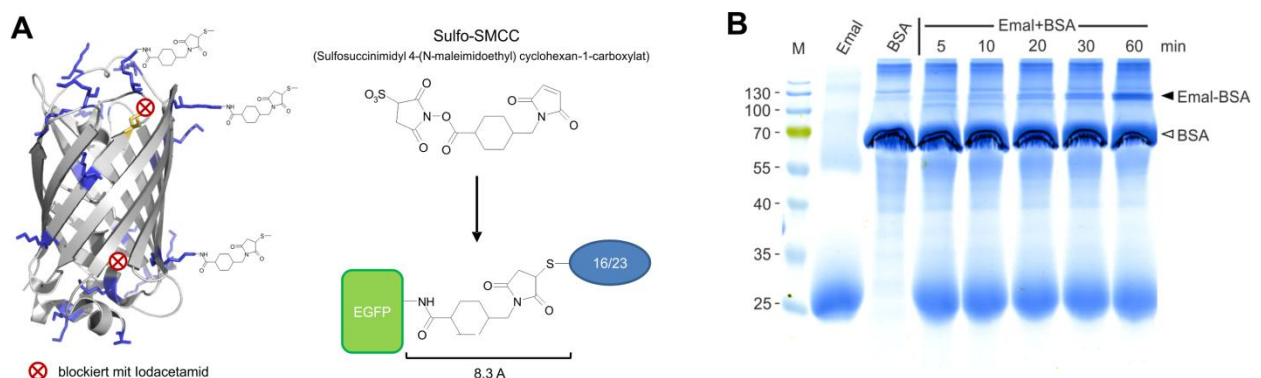


Abb.11 Generierung und funktionale Charakterisierung des thiolreaktiven *crosslinker*-Konstrukts EGFP-SulfoSMCC (Emal). (A) Schematische Zusammenfassung der Herstellung des Emal-Konstruktes. Der bifunktionale *crosslinker* SulfoSMCC wird kovalent an Lysinseitenketten des EGFP-Moleküls gekoppelt und interne Cysteinreste mittels Iodacetamid blockiert (*linke Seite*). Nach Kopplung des Reagens mit EGFP steht dessen thiolreaktive Gruppe zur Reaktion mit Cysteinresten anderer Proteine (wie BSA oder 16/23) zur Verfügung (*rechte Seite*). Für weitere Details, siehe Text. (B) Zur Funktionsbestimmung des Emal-Konstrukts wurde eine konstante Menge an BSA mit dem EGFP Derivat für verschiedene Zeiten bei 25°C inkubiert. Das *crosslinking*-Produkt ist nach 60 minütiger Inkubation deutlich zu detektieren (Emal-BSA). Die Abbildung 10B wurde freundlicherweise von Dr. Mario Jakob zur Verfügung gestellt.

Im Gegensatz zu dem ersten Funktionalitätstest mit BSA, zeigten entsprechende Experimente mit den *in vitro*-Translationen der Cysteinmutanten des 16/23 Proteins keine sichtbaren *crosslinking*-Produkte (Abb.12A). Es wurde vermutet, dass in den Translationsansätzen noch zu viel reduzierendes Reagens (4 mM DTT) vorliegt, welches mit den Thiolgruppen des Emal reagieren könnte und somit eine kovalente Bindung an die

proteininternen Cysteinreste der Mutanten inhibiert. Da im Zuge von Insertionsexperimenten überschüssiges DTT vor der eigentlichen Modifikation mit dem thiolreaktiven Reagens weg gewaschen werden sollte, wurden entsprechende Experimente mit den Cysteinmutanten und Emal durchgeführt. Hierfür wurden zunächst Liposomen mit dem originalen 16/23 Protein und dessen Cysteinmutanten inkubiert und nach einem Waschschrift von außen mit Emal versetzt (Abb.12B). Obwohl in allen Emal-Ansätzen die Banden der entsprechenden Vorläuferproteine schwächer wurden, ließen sich keine *crosslinking*-Banden detektieren. Es scheint, als ob die Membranbindung der Proteine durch die externe Zugabe von Emal geschwächt wird.

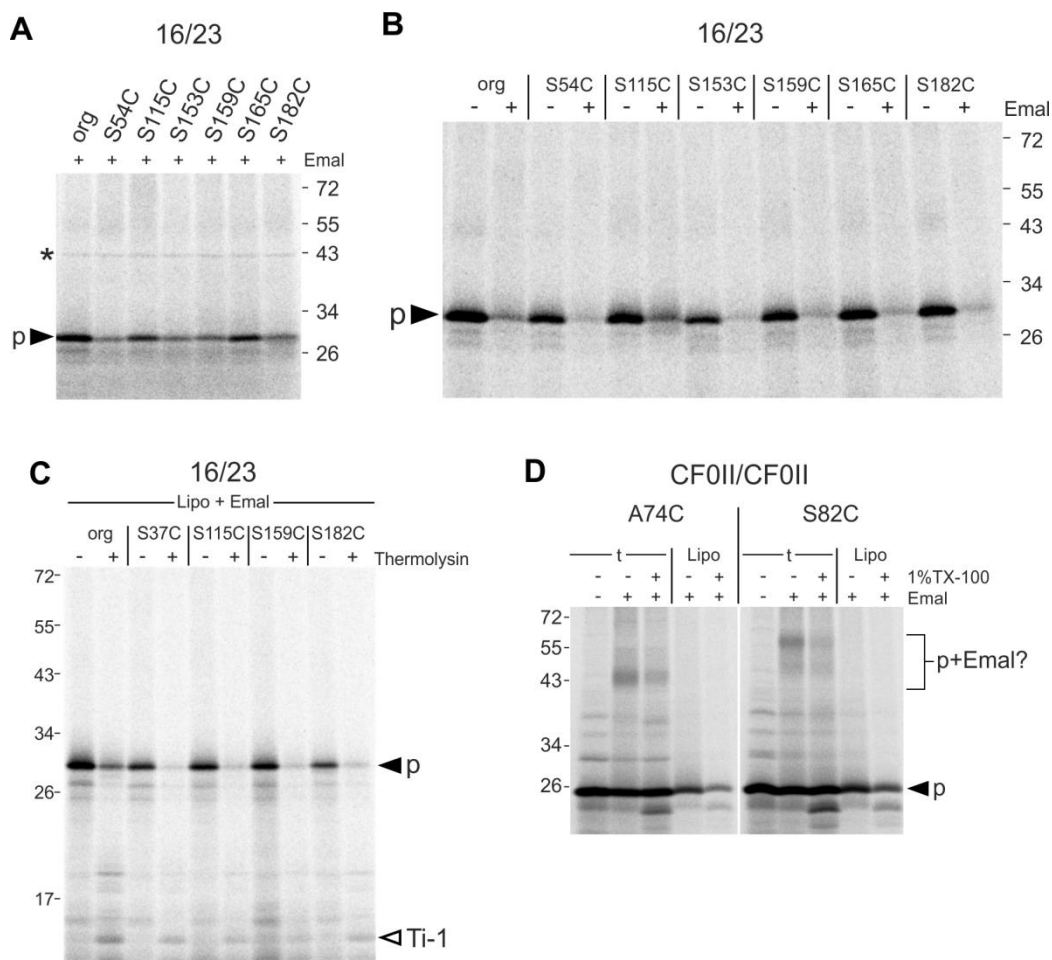


Abb.12 Cysteinmodifikation von Derivaten des 16/23 und CF₀II/CF₀I Proteins mittels EGFP-SulfoSMCC. (A) Aliquots der *in vitro*-Translationen der aufgeführten Proteine wurden für 30 min bei 30°C mit 500 µM Emal in HM-Puffer inkubiert. Unspezifische Translationsbanden sind mit einem Stern markiert. **(B)** Liposomen wurden mit den aufgeführten Proteinen für 5 min bei 4°C inkubiert und nach einem Waschschrift mit HM-Puffer für 30 min bei 30°C mit 500 µM Emal versetzt. Für weitere Details, siehe Abb.5. **(C)** Liposomeninsertionsexperiment mit Emal-beladenen Lipidvesikeln (Lipo+Emal). Die Proben wurden für 30 min bei 25 °C mit den aufgeführten Proteinen inkubiert. Ein Ansatz wurde anschließend mit Thermolysin behandelt. **(D)** Aliquots von den *in vitro*-Translationen der zwei Cysteinsubstitutionsmutanten A75C und S82C des CF₀II Vorläuferproteins wurden mit HM-Puffer oder 500 µM MalPEG₅₀₀₀ für 30 min bei 25 °C inkubiert, wobei jeweils ein Ansatz 1% Triton X-100 enthielt. Gleichzeitig wurden mit den gleichen Proteinen Liposomeninsertionsexperimente wie in (C) und Abb.10 beschrieben durchgeführt (Lipo). Für weitere, Details, siehe Abb.7 und 8.

Des Weiteren wurden Emal-beladene Liposomen, bei denen zumindest rein optisch ein Einschluss des EGFP Derivats in das Vesikellumen zu erkennen war, für Insertionsexperimente eingesetzt (Abb.12C). Aber auch bei diesen Experimenten konnten weder eine Modifizierung der jeweiligen Vorläuferproteine in den unbehandelten Fraktionen noch *crosslinking*-Produkte, bestehend aus den Ti-1 Fragmenten und dem EGFP Derivat, in den thermolysinbehandelten Fraktionen nachgewiesen werden. Wie in Abbildung 12D zu sehen, geben auch Insertionsexperimente mit Emal-beladenen Liposomen und den Cysteinmutanten A75C und S82C des CF₀II Vorläuferproteins keine Hinweise auf eine Modifikation der Proteine, selbst wenn die Vesikelmembranen mittels Triton X-100 vor Inkubation der Ansätze unter Reaktionsbedingungen solubilisiert wurden.

Im Gegensatz zu den Cysteinmutanten des 16/23 Proteins, lassen sich in den mit Emal-versetzten Translationen der CF₀II Derivate diffuse Banden zwischen 40 und 60 kDa nachweisen, die möglicherweise auf Modifikationen dieser Proteine mit dem reaktiven Emal zurückzuführen sind. Die fehlende oder nur schwache *crosslinking*-Effizienz des Emal in den beschriebenen Experimenten könnte darauf hindeuten, dass das EGFP-Derivat zu groß ist, um mit seinem 8 Å langen SMCC-*crosslinker* an die jeweiligen Cysteinmutanten zu binden (siehe Abb.11A).

2.2.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Bestimmung der Ti-1 Membrantopologie

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse zur Bestimmung der Ti-1 Membrantopologie unter Verwendung verschiedener thiolreaktiver Substanzen lassen sich wie folgt zusammenfassen: (1) AMS ist zwar in der Lage Cysteinreste im 16/23 Protein zu modifizieren, jedoch sind die resultierenden *crosslinking*-Produkte aufgrund des geringen Molekulargewichts des thiolreaktiven Reagens nur schwer vom nicht modifizierten Protein zu unterscheiden. (2) Das wesentlich größere EGFP-SulfoSMCC hingegen scheint zwar in Lösung mit Cysteinmutanten des CF₀II Vorläuferproteins *crosslinking*-Produkte zu bilden, jedoch nicht mit den Cysteinderivaten des 16/23 Proteins. (3) Im Gegensatz zu den beiden anderen thiolreaktiven Substanzen, führt die Verwendung von MalPEG₅₀₀₀ bei allen eingesetzten Cysteinmutanten zu großen, unterscheidbaren *shifts* in den entsprechenden Banden der Vorläuferproteine. Darüber hinaus ist dieses Reagens in der Lage, einen Großteil der Cysteinreste an den proteasegeschützten Positionen des Ti-1 Fragments an der stromalen Seite der Thylakoidmembran zu modifizieren, was wiederum die Größe des tatsächlich in die Membran eingebetteten Bereichs und somit auch die Länge eines möglichen lumenalen *loops* stark reduziert. (4) Keine der verwendeten reaktiven Substanzen konnte funktionell in Liposomen eingeschlossen werden, so dass weder bei den Cysteinmutanten des 16/23 Proteins noch bei den CF₀II Derivaten eine Membraninsertion mit einem lumenalen *loop* eindeutig nachgewiesen werden konnte.

2.3 Die TatBC-Rezeptorbindung als Schlüsselschritt des Tat-abhängigen Proteintransports

2.3.1 Zusammenfassung

Das frühe Translokationsintermediat Ti-1 des 16/23 Proteintransports resultiert aus der Bindung des Vorläuferproteins von der stromalen Seite an die Thylakoidmembran in einer Topologie, die einen großen Bereich des Proteins resistent gegenüber extern zugegebenen Proteasen macht. Mittels *cysteine scanning*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass dieses proteasegeschützte Fragment nicht nur das Tat-Signalpeptid, sondern auch die N-terminale Hälfte des 23 kDa Passagierproteins umfasst (Schlesier and Klösgen, 2010). Dennoch war nicht bekannt, ob diese Resistenz gegenüber extern zugeführten Proteasen aus einer Insertion in die Membran in Form einer *loop*-Konformation resultiert wie es bei einigen bakteriellen Tat-Substraten gezeigt werden konnte (Karlsson *et al.*, 2012), oder ob er vielmehr auf eine Bindung des Proteins an die stromal exponierte Lipidschicht der Membran in einer proteasegeschützten Form zurückzuführen ist.

Um die Transporteigenschaften eines Vorläuferpolypeptides, welches nur das proteasegeschützte Fragment des Ti-1 umfasst, zu untersuchen, wurde mittels zielgerichteter Mutagenese am ursprünglichen 16/23 Protein das verkürzte Derivat Δ C88 generiert. Die Akkumulation eines 13 kDa großen Prozessierungsproduktes im Thylakoidlumen sowie das Erscheinen einer dem Ti-2 ähnlichen Fragmentbande im Zuge von Transportexperimenten mit isolierten Thylakoiden verweisen auf einen effektiven Membrantransport, wobei die Verlangsamung des finalen Prozessierungsschrittes auch bei diesem verkürzten Derivat erhalten bleibt. Darüber hinaus konnte unter Verwendung von Thylakoiden, deren Transportkompetenz mittels antiTatA-Antikörper blockiert wurde, gezeigt werden, dass Transport und Prozessierung des Δ C88 Proteins durch externe Zugabe von löslichem TatA wieder rekonstituiert werden können.

Aufgrund dieser strikten TatA-Abhängigkeit des Δ C88 Membrantransports, die nicht notwendigerweise nach einer möglichen Membraninsertion des korrespondierenden proteasegeschützten Fragments zu erwarten war, wurde erneut die Topologie des Ti-1 mittels eines unabhängigen experimentellen Ansatzes bestimmt. Dieser Ansatz beruht auf der spezifischen Modifikation von einzelnen Cysteinresten durch das membranimpermeable thiolreaktive Reagenz MalPEG₅₀₀₀, die sich wiederum in einem molekularen *shift* des Proteins von 5 kDa widerspiegelt. Im Zuge dieser Topologiestudien wurden einzelne Cysteinreste an verschiedenen Positionen des 16/23 Proteins eingeführt. Diese liegen sowohl innerhalb (S74, G93, S115, S165, A175) als auch außerhalb (G178) des proteasegeschützten Fragments. Nachfolgende Analysen des Ti-1 Fragments mittels SDS-Gelelektrophorese zeigen, dass weder

das originale 16/23, das ein einzelnes Cystein an Position 242 besitzt, noch sein G178C Derivat einen entsprechenden *shift* aufweisen. Dies steht im Einklang mit der Tatsache, dass beide Reste in Ti-1 Konformation zugänglich für Proteasen sind und sich somit außerhalb des proteasegeschützten Fragments befinden. Obwohl die Positionen 74 und 93 innerhalb dieses Fragments vorliegen, weisen auch deren Derivate (S74C, G93C) ebenfalls keine Ti-1 Modifikation auf, was wiederum darauf hindeutet, dass beide Reste in der Thylakoidmembran lokalisiert sind. Im Gegensatz dazu werden Cysteinreste, die in den proteasegeschützten Positionen 115, 153, 165 und 175 eingeführt wurden, effektiv in Ti-1 Konformation durch MalPEG₅₀₀₀ modifiziert. Dies widerspricht den früheren Topologiestudien mittels Proteasebehandlung und lässt eine Ti-1 Topologie vermuten, in der der membraneingebettete Bereich wesentlich kleiner ist als angenommen. Zudem impliziert dieses Ergebnis, dass ein Großteil des korrespondierenden Verkürzungsderivats iΔC88 nach erfolgter Bindung an den TatBC-Rezeptor stromal exponiert vorliegt, was wiederum erklären könnte warum TatA für dessen Transport benötigt wird.

Obwohl das iΔC88 Polypeptid das komplette proteasegeschützte Fragment umfasst, kann in Thylakoidtransportexperimenten keine entsprechende Ti-1 Bande detektiert werden. Um mögliche störende Effekte von Bestandteilen der Thylakoidmembran auf die Membranbindung des Derivats auszuschließen, wurden Liposomeninsertionsexperimente durchgeführt. Jedoch ließ sich auch in diesen Experimenten keine Ti-1 Fragmentbande nachweisen, was zu der Annahme führt, dass die Membranbindung des 16/23 Vorläuferproteins noch von anderen Bereichen als nur dem proteasegeschützten Fragment selbst abhängig ist. Um zu untersuchen, welche zusätzlichen Reste für die Membranbindung benötigt werden, wurde der C-Terminus des iΔC88 Polypeptids schrittweise verlängert und die resultierenden Verkürzungsderivate (iΔC60, iΔC40 und iΔC20) in Liposomeninsertionsexperimenten analysiert. Da jedoch auch keine dieser Derivate in der Lage war, an Liposomen in einer Ti-1 Topologie zu binden, lässt sich schlussfolgern, dass der komplette 23 kDa Passagier für die Membraninteraktion benötigt wird.

Darüber hinaus zeigen Thylakoidtransportexperimente mit den einzelnen Verkürzungsderivaten, dass ebenso deren Tat-abhängiger Membrantransport durch die Länge des verkürzten Passagierpolypeptids beeinflusst wird, indem die Transporteffizienz mit C-terminaler Verlängerung abnimmt. Um zu untersuchen, ob auch die Bindung des Tat-Substrats an den TatBC-Rezeptorkomplex durch die C-terminale Verkürzung des Passagiers beeinflusst wird, wurden nach erfolgtem Thylakoidtransport der Derivate jeweils die Intensitäten der TatBC-Substratkomplexe bei 620 und 560 kDa mittels *Blue-Native-Gelelektrophorese* analysiert. Im Zuge dessen konnte gezeigt werden, dass mit Ausnahme vom iΔC88 Polypeptid alle Verkürzungsderivate eine geringere Bindungseffizienz zum TatBC-Rezeptor aufweisen als das i16/23 Protein, bei dem der komplette Passagier vorliegt. Insbesondere bei Verwendung

von antiTatA-blockierten Thylakoiden wurde deutlich, dass die Bindungseffizienz der Derivate an den TatBC-Rezeptor mit zunehmender C-terminaler Verkürzung des Passagiers ansteigt. Demnach besteht eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der TatBC-Bindung der verschiedenen Derivate und deren jeweiligen Transporteffizienzen. Dies führt zu der Vermutung, dass ein verringerter Membrantransport von langen ungefalteten oder teilweise gefalteten Proteinen nicht unbedingt aus einer Inhibierung des eigentlichen Translokationsschrittes resultiert, sondern vielmehr auf eine beeinträchtigte Rezeptorbindung zurückzuführen ist und diese somit den umsatzbestimmenden Schritt im Translokationsprozess darstellen könnte.

2.3.2 Manuskript

C-terminal truncation of a Tat passenger protein affects its membrane translocation by interfering with receptor binding

René Schlesier and Ralf Bernd Klösger*

Institute of Biology – Plant Physiology, Martin Luther University Halle-Wittenberg,
Weinbergweg 10, 06120 Halle/Saale, Germany

(*) corresponding author: Ralf Bernd Klösger

phone: ++49 - 345 - 55 26 200

Fax: ++49 - 345 - 55 27 285

e-mail: klosger@pflanzenphys.uni-halle.de

Running title: Tat transport of truncated passenger proteins

Abstract

During thylakoid transport of the chimeric model Tat substrate 16/23 two consecutive translocation intermediates with different membrane topology are observed. The early translocation intermediate Ti-1 is firmly bound to or even inserted into the membrane such that almost half of the passenger protein is protected against proteolysis. Here we have studied thylakoid transport of a 16/23 truncation derivative corresponding to this protease-protected fragment. It behaves like a typical Tat substrate in its dependency on a fully functional Tat machinery for membrane transport but it has lost the property of the original 16/23 chimera to interact directly with lipid membranes. Such unassisted lipid binding apparently requires the fully folded passenger protein, since it was not observed also with 16/23 truncation mutants lacking the C-terminal 20, 40, or 60 residues. Furthermore, with increasing size of the truncated passenger polypeptide these mutants show progressively reduced membrane transport and TatBC receptor interaction properties suggesting that in this case receptor binding, which is apparently impaired by extended unfolded or misfolded passenger polypeptides, is the rate limiting step of Tat-dependent membrane transport.

keywords: twin arginine translocation, Tat pathway, Tat-dependent protein transport; TatBC-receptor; thylakoid membrane

Introduction

The twin-arginine translocation (Tat) pathway, which operates at the plasma membranes of bacteria and archaea as well as at the thylakoid membrane of chloroplasts, is unique with respect to its property to transport proteins in a fully folded, or even malformed, conformation across ion-tight membranes (for recent reviews see Hou and Brüser, 2011; Fröbel *et al.*, 2012; Palmer and Berks, 2012; Celedon and Cline, 2013). It is engaged by precursor proteins carrying signal peptides with a characteristic twin-arginine motif (Chaddock *et al.*, 1995) and driven by the membrane potential which can be ΔpH and/or $\Delta\Psi$ (Theg *et al.*, 2005; Bageshwar and Musser, 2007; Braun *et al.*, 2007). The Tat translocon consists of three essential subunits, namely TatA, TatB, and TatC (in the thylakoid system also called Tha4, Hcf106, and cpTatC, respectively) (Settles *et al.*, 1997; Mori *et al.*, 1999, 2001; Walker *et al.*, 1999; Motohashi *et al.*, 2001). TatB and TatC form an oligomeric receptor complex in the membrane, which binds Tat substrates prior to transport (Cline and Mori 2001; Richter and Brüser, 2005), while TatA catalyzes substrate translocation after joining the TatBC/substrate complex in a ΔpH -dependent manner (Mori and Cline, 2002; Alami *et al.*, 2003, Aldridge *et al.*, 2014).

Membrane transport by the Tat pathway is divided into distinct steps, (i) binding of the substrate to the TatBC receptor complex (Berghöfer and Klösgen, 1999; Cline and Mori, 2001; Richter and Brüser, 2005), with substrates being delivered from either the soluble or the lipid phase (Brüser *et al.*, 2003; Hou *et al.*, 2006; Shanmugham *et al.* 2006; Bageshwar *et al.*, 2009), (ii) translocation of the passenger protein across the membrane which requires both TatA and the membrane potential (Mori and Cline, 2002; Alami *et al.*, 2003; Frielingsdorf *et al.*, 2008), and (iii) proteolytic removal of the signal peptide and release of the substrate (Frielingsdorf and Klösgen, 2007). In case of the chimeric model Tat substrate 16/23 in which the transit peptide of OEC16 is combined with the OEC23 passenger protein, both being subunits of the oxygen evolving system associated with photosystem II, these steps are characterized by two consecutive translocation intermediates (Ti-1, Ti-2), which represent the unprocessed precursor protein before (Ti-1) or after (Ti-2) the actual membrane translocation step (Hou *et al.*, 2006). Ti-1 and Ti-2 are characterized by protease-protected fragments of 14 kDa and 26 kDa, respectively, which comprise the OEC16 thylakoid transport signal plus either the N-terminal half (Ti-1) or the entire (Ti-2) OEC23 passenger protein (Schlesier and Klösgen, 2010). While formation of Ti-2 is strictly depending on a fully functional Tat machinery, membrane binding of the 16/23 chimera leading to Ti-1 formation can be observed even in the complete absence of Tat components, e.g. with liposomes (Hou *et al.*, 2006). Such direct lipid interaction of the substrate protein is not a unique feature of the 16/23 chimera but has been described for a number of Tat substrates in both chloroplasts and bacteria (Hou *et al.*, 2006; Shanmugham *et*

al., 2006; Bageshwar *et al.*, 2009; Karlsson *et al.*, 2012) and it was suggested that it might result in the enrichment of the substrate in the vicinity of the translocase supporting its rapid delivery to the TatBC receptor (Schlesier and Klösigen, 2010). On the other hand, lipid binding is not an obligatory step in Tat-dependent membrane translocation because it is not found for all Tat substrates.

Here, we have characterized the membrane transport properties of C-terminal truncation derivatives of the 16/23 chimera including one which corresponds to the protease-protected 14 kDa fragment that is indicative of Ti-1. Considering that embedding of the entire protease-protected fragment of Ti-1 into the membrane was suggested (Hou *et al.*, 2006), it was interesting to find out if membrane transport of such a truncated passenger still depends on a fully functional Tat machinery. Our results show that C-terminal truncation of the OEC23 passenger protein does not fundamentally alter the transport mechanism but that it affects various steps of Tat-dependent membrane translocation to different degrees.

Results

Thylakoid transport of a truncated precursor protein corresponding to the protease-protected 14 kDa fragment of Ti-1

Upon thylakoid transport of the chimeric model Tat-substrate 16/23 two translocation intermediates, termed Ti-1 and Ti-2, can be observed which are characterised by protease-protected fragments of 14 kDa and 26 kDa, respectively (Figure 1A). The early translocation intermediate Ti-1 results from binding of the precursor protein from the stromal side to the thylakoids in a topology that makes a central part of it resistant to externally added proteases like thermolysin, trypsin, and proteinase K (Hou *et al.*, 2006). Cystein-scanning experiments demonstrated that the protease-protected fragment comprises not only the Tat-signal peptide but in addition also the N-terminal half of the passenger protein (Schlesier and Klösigen, 2010). It is not known though if protease-protection results from insertion into the membrane in a loop conformation, as suggested from recent topology studies of several bacterial Tat-substrates (Karlsson *et al.*, 2012), or rather from binding to the membrane in a protease-protected manner.

In order to determine the transport characteristics of a precursor polypeptide comprising solely the protease-protected 14 kDa fragment representing Ti-1, we constructed the corresponding truncation derivative of the 16/23 chimera by site-directed mutagenesis of the “original” 16/23 clone. To facilitate differentiation of membrane binding in a protease-protected manner and true membrane translocation, five residues exceeding the protease-protected fragment were retained at the C-terminus. Incubation of this truncated precursor protein (termed Δ C88,

Figure 1A) with isolated thylakoids leads to the accumulation of a processing product of 13 kDa in the thylakoid fractions (Figure 1B) which apparently results from removal of the transport signal by thylakoidal processing peptidase (TPP). This processing product, which comprises the five additional residues, is fully resistant to externally added protease demonstrating its localisation in the thylakoid lumen. To clarify if the formation of the 13 kDa processing product requires a functional Tat machinery, thylakoid vesicles were pretreated with antiTatA antibodies according to Hauer *et al.* (2013) to block intrinsic TatA activity. Under these conditions, thylakoid transport of $\Delta C88$ is inhibited and the protein is completely degraded by externally added protease (Figure 1C). If the transport assays are additionally supplemented with soluble TatA though, thylakoid transport of $\Delta C88$ and processing by TPP are recovered demonstrating that TatA is needed for membrane translocation even of the truncated passenger protein.

In addition to the “mature” 13 kDa protein, a degradation product is observed after protease treatment of the thylakoids that is slightly smaller than the precursor polypeptide (Figure 1A). It is only detectable in those assays comprising active TatA and it appears earlier than the “mature” protein in time-course experiments (Figure 1D), i.e. its occurrence resembles that of translocation intermediate Ti-2 during 16/23 transport (Berghöfer and Klösgen, 1999). Since Ti-2 accumulation results from retarded TPP processing after membrane transport of the OEC23 passenger protein (Frielingsdorf and Klösgen, 2007), such retardation of the terminal processing step is apparently retained in the truncation derivative $\Delta C88$. In contrast, a protease-protected fragment indicative of Ti-1 formation could not be observed in these experiments (see also below).

The protease-protected Ti-1 fragment of the 16/23 chimera harbors a stromally exposed passenger domain

The strict dependency of $\Delta C88$ membrane transport on the presence of TatA, which could not necessarily be expected considering the proposed membrane insertion of the corresponding protease-protected 14 kDa fragment (Hou *et al.*, 2006), prompted us to reexamine the topology of Ti-1 with an independent approach that does not rest on protease protection assays. It relies instead on the specific modification of cysteine residues by the membrane-impermeable thiol-reactive reagent MalPEG₅₀₀₀ (reviewed in Bogdanov *et al.*, 2005) and was recently used to determine the topological arrangement of bacterial TatA and TatB in the membrane (Koch *et al.*, 2012). Each cysteine-modification results in an increase of the molecular weight of the protein by approximately 5 kDa, which can be traced as mobility shift upon SDS-PAGE.

In order to realize such topology studies, single cysteine residues were introduced by site-directed mutagenesis at various positions of the 16/23 precursor, both within (S74, G93, S115,

S153, S165, A175) and outside (G178) of the 14 kDa fragment (Figure 2A). All these residues are principally accessible to MalPEG-modification, as demonstrated by incubation of the respective *in vitro*-translation products with MalPEG₅₀₀₀ which in all instances results in the expected mobility shift of the precursor band upon SDS-PAGE (data not shown). To analyse if the cysteines are accessible also after membrane binding of the 16/23 Protein, the 16/23 derivatives were incubated with thylakoid vesicles that had been pretreated with antiTatA antibodies to accumulate the proteins in Ti-1 topology. Then, the assays were supplemented with MalPEG₅₀₀₀ and treated after incubation with protease to generate the protease-protected fragment indicative of Ti-1. Subsequent analysis of these Ti-1 fragments by SDS-PAGE demonstrated that neither the original 16/23 chimera, which carries a single cysteine residue at position 242 of the precursor (Figure 2A), nor its G178C derivative show any mobility shift on such gels (Figure 2B). This result confirms that both residues are accessible to protease in Ti-1 conformation, i.e. they are located outside of the protease-protected fragment (Schlesier and Klösgen, 2010). Also the mobility of the 16/23 derivatives S74C and G93C is unaffected by MalPEG-treatment. These residues are part of the protease-protected 14 kDa fragment though, i.e. in this case lack of modification results from their inaccessibility to MalPEG from the stromal side, confirming their localization within the thylakoid membrane. In contrast, the cysteine residues introduced at positions 115, 153, 165, and 175 of the 16/23 Protein, which are likewise part of the protease-protected fragment of Ti-1 (Figure 2A), are modified by MalPEG₅₀₀₀ also in Ti-1 conformation (Figure 2B), i.e. they remain accessible from the stromal side even after membrane binding. This contradicts the results of the former protease-protection analyses and suggests a topology of Ti-1 in which the membrane-embedded region is much smaller than previously assumed. In fact, in addition to the signal peptide only between 10 to 30 residues of the passenger polypeptide are shielded by the membrane from MalPEG-modification (Figure 2C), while at least 60 residues of the protease-resistant 14 kDa fragment remain exposed to the stroma in Ti-1 topology. This implies that also a substantial proportion of the corresponding truncation derivative iΔC88 remains stromally exposed after receptor binding which explains why TatA is required for its membrane transport. It is yet unclear though why the stromally exposed segment is protected against all proteases tested (trypsin, thermolysin, and proteinase K; Hou *et al.*, 2006), even though it comprises a large number of potential cleavage sites for these proteases (data not shown).

Unassisted membrane binding of the 16/23 chimera requires the complete passenger protein

A characteristic feature of the 16/23 Protein is its property to bind to membranes in an unassisted manner, i.e. independently from any proteinaceous component (Hou *et al.*, 2006). Such binding which again can be traced by the appearance of the 14 kDa fragment after

protease treatment, was not observed though for i Δ C88 in thylakoid transport experiments (Figure 1) despite the fact that it comprises the complete 14 kDa fragment. To rule out any potentially disturbing effect of thylakoidal components on membrane binding of the i Δ C88 derivative, liposome insertion experiments according to Schlesier and Klösigen (2010) were performed. While in the experiments with the 16/23 chimera the 14 kDa fragment can clearly be detected after protease treatment, no such fragment is detectable in the corresponding assays analysing i Δ C88 (Figure 3A). Thus, membrane binding of the 16/23 chimera depends on the presence of parts of the precursor protein exceeding those of the actual protease-protected fragment.

To examine which residues are additionally required for membrane binding, we extended the C-terminal border of the i Δ C88 derivative stepwise up to the length of the entire 23 kDa passenger and analysed the resulting truncation derivatives (called i Δ C60, i Δ C40, and i Δ C20; Figure 1A) with liposome insertion assays. Unexpectedly, neither of the truncated proteins was able to bind to liposomes in a topology corresponding to Ti-1. Solely for the i16/23 Protein, which comprises the entire 23 kDa passenger protein, the indicative 14 kDa fragment could be detected after thermolysin treatment (Figure 3B). Not even smaller fragments that could have been indicative of membrane binding of smaller regions of the precursors were found demonstrating that the complete OEC23 passenger is required for lipid interaction.

Non-native passenger polypeptides affect membrane transport by interfering with receptor binding

Also the efficiency of Tat-dependent membrane transport is influenced by the length of the truncated passenger polypeptide. While for the i Δ C20 derivative only marginal membrane translocation can be observed, the shortest truncation derivative, i Δ C88, is as efficiently transported as i16/23 comprising the complete passenger. In fact, with increasing size of truncated passenger polypeptide the rate of thylakoid transport decreases (Figure 4A). This reconfirms earlier observations that Tat-transport becomes less efficient with increasing length of unfolded passenger polypeptides, whereas both completely folded and particularly small passengers are efficiently translocated (Richter *et al.*, 2007).

In order to analyse if binding of the transport substrate to the TatBC receptor complex is likewise affected by C-terminal truncation, Blue-Native gel electrophoresis was performed after thylakoid transport of the 16/23 derivatives. In each case, two complexes of approximately 560 and 620 kDa, which are indicative of binding to the TatBC receptor (Berghöfer and Klösigen, 1999; Jakob *et al.*, 2009), can be detected. The strengths of the respective signals are again divergent for the various precursor proteins (Figure 4B). While for i16/23 strongly labelled

complexes are found (Figure 4B), binding of the derivatives i Δ C20, i Δ C40, and i Δ C60 to the TatBC-receptor is considerably lower. Solely the i Δ C88 polypeptide shows an extent of TatBC-binding that is comparable to that of the i16/23 chimera. Such influence of the length of the truncated passenger polypeptide on TatBC binding becomes even more evident when the experiment is performed with antiTatA-treated thylakoid vesicles. In case of the i16/23 chimera this results in even stronger labelling of the 560/620 kDa complexes whereas only marginal binding is detectable for the i Δ C20 mutant (Figure 4C). Binding of the other truncation derivatives to the TatBC-receptor becomes increasingly efficient with reduced size of the passenger polypeptide and the signals observed for i Δ C88 are again comparable to those of the i16/23 chimera. Thus, the degree of TatBC-binding of the different truncation derivatives correlates well with the respective membrane transport efficiency (Figure 4A) suggesting that binding to the receptor is the rate-limiting step in the translocation process.

Discussion

It was the initial goal of this study to analyse the membrane transport of a truncation derivative of the chimeric Tat substrate 16/23, termed i Δ C88, which basically corresponds to the protease-protected 14 kDa fragment indicative of translocation intermediate Ti-1. In spite of its drastically reduced passenger polypeptide, thylakoid transport of i Δ C88 strongly resembles that of the "original" 16/23 chimera in terms of receptor binding and TatA dependency (Figures 1 and 4). Solely the unassisted lipid binding, which is characteristic for the 16/23 chimera (Hou *et al.*, 2006), is not preserved in the i Δ C88 polypeptide despite the fact that it comprises the entire protease-protected segment assumed to be involved in membrane interaction. Remarkably, unassisted membrane interaction is strictly dependent on the presence of the entire 23 kDa passenger protein because it is not observed for any of the C-terminal truncation derivatives, irrespective of the extent of truncation (Figure 3). This might be indicative of a requirement for a folded passenger to facilitate lipid interaction but this conclusion is still speculative.

The impact of size and folding status of the passenger polypeptide on Tat-dependent thylakoid transport becomes even more evident when transport efficiency is analysed. We could show that stepwise C-terminal truncation of the OEC23 passenger affects both receptor binding and membrane transport of this model Tat substrate. Remarkably, the transport rates decrease with increasing size of the passenger protein, in line with the results of *in organello* import studies conducted by Roffey and Theg (1996). However, while for all our C-terminal truncation derivatives translocation into the thylakoid lumen is detectable, though to different degrees, terminal processing products indicative of thylakoid transport have not been found in the

in organello experiments of Roffey and Theg (1996), presumably due to proteolytic degradation in the thylakoid lumen.

The transport efficiencies of our truncation derivatives correlate well with the observed binding to the TatBC-receptor, suggesting that in this case receptor binding is the rate limiting step in the transport process. This is consistent with former studies analyzing small, unstructured, hydrophilic peptides or passenger proteins, which likewise show a decrease in transport efficiency with increasing length of the passenger (Richter *et al.*, 2007; Cline and McCaffery, 2007). However, an arrest of the substrate protein within the membrane, as described in these studies, was not detectable in our experiments. Therefore, we propose that the decrease of membrane transport of long unfolded or partially folded proteins results not necessarily from an inhibition of the actually membrane translocation step but rather from impaired receptor binding.

Materials and Methods

Generation of truncation mutants

DNA fragments comprising the coding region for the i16/23 polypeptide, which lacks the N-terminal chloroplast import signal of the 16/23 Protein, or its C-terminal truncation derivatives iΔC20, iΔC40, iΔC60, iΔC88 (Figure 1A) were amplified from the chimeric 16/23 cDNA (Clausmeyer *et al.*, 1993), cloned with the pBAT vector (Annweiler *et al.*, 1991), verified by DNA sequencing, and subjected to *in vitro* transcription/translation as described by Marques *et al.* (2003).

Protein transport and liposome insertion assays

Isolation of thylakoids from pea seedlings (*Pisum sativum* var. Feltham First) was carried out according to Hou *et al.* (2006). *In thylakoido* protein transport experiments with radiolabelled precursor proteins were performed as described (Marques *et al.*, 2003). The inhibition of Tat-dependent protein transport with affinity-purified antibodies against TatA as well as the reconstitution of Tat transport with externally added TatA were carried out according to Hauer *et al.* (2013). Preparation of liposomes and liposome insertion experiments followed published protocols (Hou *et al.*, 2006; Schlesier and Klösgen, 2010).

Miscellaneous

Gel electrophoresis of proteins under denaturing conditions was carried out according to Laemmli (1970) and Schägger (2006). Blue-Native electrophoresis followed protocols of Berghöfer and Klösgen (1999). The gels were exposed to phosphorimager screens and analysed with the Fujifilm FLA-3000 (Fujifilm, Düsseldorf, Germany) using the software

packages BASReader (version 3.14) and AIDA (version 3.25; Raytest, Straubenhardt, Germany). All other methods followed published protocols (Sambrook and Russell, 2001).

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (KL 862/5-1).

References

- Alami, M., Luke, I., Deitermann, S., Eisner, G., Koch, H.G., Brunner, J. and Müller, M. (2003). Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in *Escherichia coli*. *Mol. Cell* *12*, 937-946.
- Aldridge, C., Ma, X., Gerard, F. and Cline, K. (2014). Substrate-gated docking of pore subunit Tha4 in the TatC cavity initiates Tat translocase assembly. *J. Cell Biol.* *205*, 51-65.
- Annweiler, A., Hipkind, R.A. and Wirth, T. (1991). A strategy for efficient in vitro translation of cDNAs using the rabbit beta-globin leader sequence. *Nucleic Acids Res.* *19*, 3750.
- Bageshwar, U.K. and Musser, S.M. (2007). Two electrical potential-dependent steps are required for transport by the *Escherichia coli* Tat machinery. *J. Cell Biol.* *179*, 87-99.
- Bageshwar, U.K., Whitaker, N., Liang, F.C. and Musser, S.M. (2009). Interconvertibility of lipid- and translocon-bound forms of the bacterial Tat precursor pre-Sufl. *Mol. Microbiol.* *74*, 209-226.
- Berghöfer, J. and Klösgen, R.B. (1999). Two distinct translocation intermediates can be distinguished during protein transport by the TAT (Deltaph) pathway across the thylakoid membrane. *FEBS Lett.* *460*, 328-332.
- Bogdanov, M., Zhang, W., Xie, J. and Dowhan, W. (2005). Transmembrane protein topology mapping by the substituted cysteine accessibility method (SCAM(TM)): application to lipid-specific membrane protein topogenesis. *Methods* *36*, 148-171.
- Braun, N.A., Davis, A.W. and Theg, S.M. (2007). The chloroplast Tat pathway utilizes the transmembrane electric potential as an energy source. *Biophys. J.* *93*, 1993-1998.
- Brüser, T., Yano, T., Brune, D.C. and Daldal, F. (2003). Membrane targeting of a folded and cofactor-containing protein. *Eur. J. Biochem.* *270*, 1211-1221
- Celedon, J.M. and Cline, K. (2013). Intra-plastid protein trafficking: how plant cells adapted prokaryotic mechanisms to the eukaryotic condition. *Biochim. Biophys. Acta* *1833*, 341-351.
- Chaddock, A.M., Mant, A., Karnauchov, I., Brink, S., Herrmann, R.G., Klösgen, R.B. and Robinson, C. (1995). A new type of signal peptide: central role of a twin-arginine motif in transfer signals for the delta pH-dependent thylakoidal protein translocase. *Embo J.* *14*, 2715-2722.
- Clausmeyer, S., Klösgen, R.B. and Herrmann, R.G. (1993). Protein import into chloroplasts. The hydrophilic luminal proteins exhibit unexpected import and sorting specificities in spite of structurally conserved transit peptides. *J. Biol. Chem.* *268*, 13869-13876.

- Cline, K. and McCaffery, M. (2007). Evidence for a dynamic and transient pathway through the TAT protein transport machinery. *Embo J.* 26, 3039-3049.
- Cline, K. and Mori, H. (2001). Thylakoid DeltapH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport. *J. Cell Biol.* 154, 719-729.
- Frielingsdorf, S. and Klösgen, R.B. (2007). Prerequisites for terminal processing of thylakoidal Tat substrates. *J. Biol. Chem.* 282, 24455-24462.
- Frielingsdorf, S., Jakob, M. and Klösgen, R.B. (2008). A stromal pool of TatA promotes Tat-dependent protein transport across the thylakoid membrane. *J. Biol. Chem.* 283, 33838-33845.
- Fröbel, J., Rose, P. and Müller, M. (2012). Twin-arginine-dependent translocation of folded proteins. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 367, 1029-1046.
- Hauer, R.S., Schlesier, R., Heilmann, K., Dittmar, J., Jakob, M. and Klösgen, R.B. (2013). Enough is enough: TatA demand during Tat-dependent protein transport. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 957-965.
- Hou, B. and Brüser, T. (2011). The Tat-dependent protein translocation pathway. *BioMol. Concepts* 2, 507-523.
- Hou, B., Frielingsdorf, S. and Klösgen, R.B. (2006). Unassisted membrane insertion as the initial step in DeltapH/Tat-dependent protein transport. *J. Mol. Biol.* 355, 957-967.
- Jakob, M., Kaiser, S., Gutensohn, M., Hanner, P. and Klösgen, R.B. (2009). Tat subunit stoichiometry in *Arabidopsis thaliana* challenges the proposed function of TatA as the translocation pore. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 388-394.
- Karlsson, A.J., Lim, H.K., Xu, H., Rocco, M.A., Bratkowski, M.A., Ke, A. and DeLisa, M.P. (2012). Engineering antibody fitness and function using membrane-anchored display of correctly folded proteins. *J. Mol. Biol.* 416, 94-107.
- Koch, S., Fritsch, M.J., Buchanan, G. and Palmer, T. (2012). *Escherichia coli* TatA and TatB proteins have N-out, C-in topology in intact cells. *J. Biol. Chem.* 287, 14420-14431.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Marques, J.P., Dudeck, I. and Klösgen, R.B. (2003). Targeting of GFP chimeras within chloroplasts. *Mol. Genet. Genomics* 269, 381-387.
- Mori, H. and Cline, K. (2002). A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid [Delta]pH/Tat translocase. *J. Cell Biol.* 157, 205-210.
- Mori, H., Summer, E.J. and Cline, K. (2001). Chloroplast TatC plays a direct role in thylakoid (Delta)pH-dependent protein transport. *FEBS Lett.* 501, 65-68.
- Mori, H., Summer, E.J., Ma, X. and Cline, K. (1999). Component specificity for the thylakoidal Sec and Delta pH-dependent protein transport pathways. *J. Cell Biol.* 146, 45-56.
- Motohashi, R., Nagata, N., Ito, T., Takahashi, S., Hobo, T., Yoshida, S. and Shinozaki, K. (2001). An essential role of a TatC homologue of a Delta pH- dependent protein transporter in thylakoid membrane formation during chloroplast development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 10499-10504.

- Palmer, T. and Berks, B.C. (2012). The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nat. Rev. Microbiol.* *10*, 483-496.
- Richter, S. and Brüser, T. (2005). Targeting of unfolded PhoA to the TAT translocon of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *280*, 42723-42730.
- Richter, S., Lindenstrauß, U., Lücke, C., Bayliss, R. and Brüser, T. (2007). Functional Tat transport of unstructured, small, hydrophilic proteins. *J. Biol. Chem.* *282*, 33257-33264.
- Roffey, R.A. and Theg, S.M. (1996). Analysis of the Import of Carboxyl-Terminal Truncations of the 23-Kilodalton Subunit of the Oxygen-Evolving Complex Suggests That Its Structure Is an Important Determinant for Thylakoid Transport. *Plant Physiol.* *111*, 1329-1338.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory manual*. 3rd Edition. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratories.
- Schägger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* *1*, 16-22.
- Schlesier, R. and Klösgen, R.B. (2010). Twin arginine translocation (Tat)-dependent protein transport: the passenger protein participates in the initial membrane binding step. *Biol. Chem.* *391*, 1411-1417.
- Settles, A.M., Yonetani, A., Baron, A., Bush, D.R., Cline, K. and Martienssen, R. (1997). Sec-independent protein translocation by the maize Hcf106 protein. *Science* *278*, 1467-1470.
- Shanmugham, A., Wong Fong Sang, H.W., Bollen, Y.J. and Lill, H. (2006). Membrane binding of twin arginine preproteins as an early step in translocation. *Biochemistry* *45*, 2243-2249.
- Theg, S.M., Cline, K., Finazzi, G. and Wollman, F.A. (2005). The energetics of the chloroplast Tat protein transport pathway revisited. *Trends Plant Sci.* *10*, 153-154.
- Walker, M.B., Roy, L.M., Coleman, E., Voelker, R. and Barkan, A. (1999). The maize *tha4* gene functions in sec-independent protein transport in chloroplasts and is related to *hcf106*, *tatA*, and *tatB*. *J. Cell Biol.* *147*, 267-276.

Figures and Figure legends

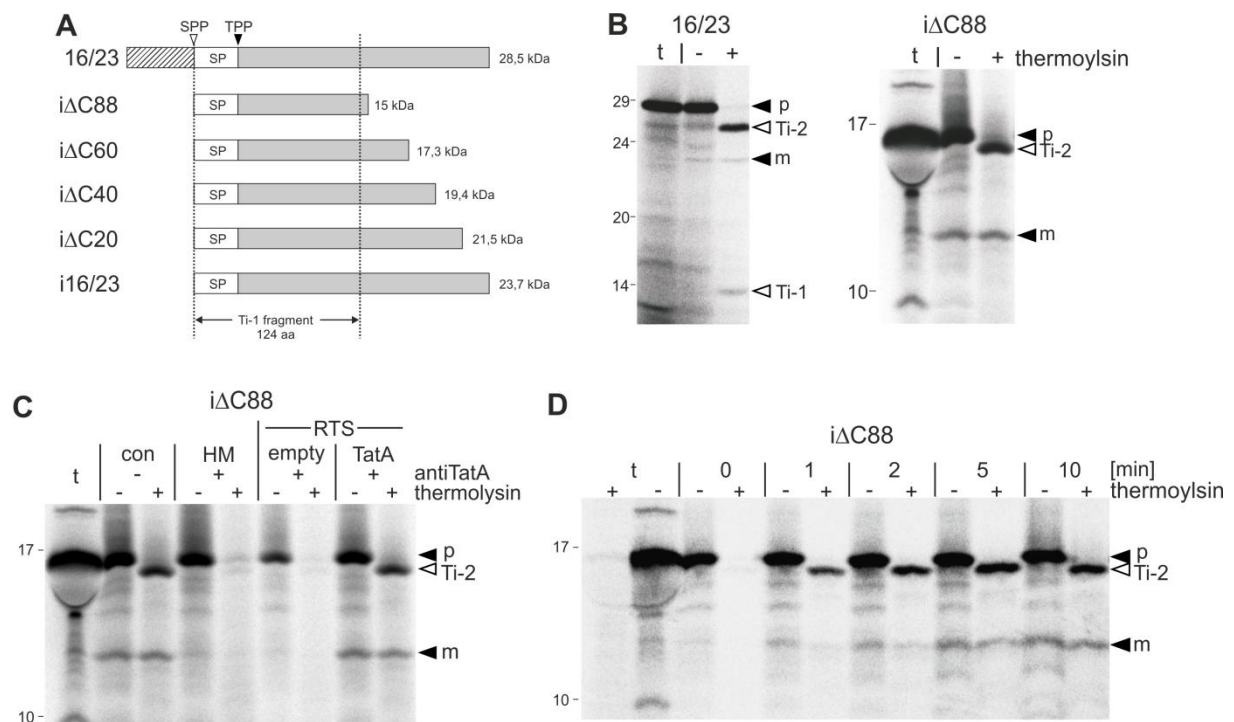


Figure 1 Thylakoid transport of a C-terminal truncation derivative of the chimeric 16/23 precursor. (A) Schematic representation of the 16/23 precursor and its derivatives i16/23, iΔC20, iΔC40, iΔC60, and iΔC88. The Tat-specific signal peptide (SP) and the passenger polypeptide are shown in white and grey, respectively, while the stroma targeting domain of the full length 16/23 precursor is depicted as striped rectangle. The cleavage sites of stromal processing peptidase (SPP) and thylakoidal processing peptidase (TPP) as well as the borders of the protease-protected Ti-1 fragment, which comprises 124 residues, are indicated. (B) The radiolabelled precursor proteins 16/23 and iΔC88 were obtained from *in vitro* translation in the presence of [³⁵S]-methionine and added to freshly isolated pea thylakoids. After incubation for 15 min at 25°C in the light the thylakoids were washed with HM buffer and either treated with thermolysin (200 μg/ml, 30 min on ice, lanes +), or mock-treated (lanes -). Stoichiometric amounts of each fraction corresponding to 15 μg of chlorophyll were separated on either a 10-17.5% SDS-polyacrylamide gradient gel (16/23) or a 16% Tris-Tricine gel (iΔC88) and subjected to phosphorimaging. In lanes *t*, 1 μl of the respective *in vitro* translation assays were loaded. The precursor (*p*) and mature proteins (*m*) are indicated by filled arrowheads, while open arrowheads point to the position of degradation products indicative of translocation intermediates (*Ti-1*, *Ti-2*). (C) Reconstitution of iΔC88 transport. Radiolabelled iΔC88 was incubated with isolated pea thylakoids that were either mock-treated (*con*) or treated with antibodies raised against TatA (*HM*). In the RTS assays, the anti-TatA treated thylakoids were supplemented with either pea TatA (*TatA*), which was obtained by *in vitro* translation with the wheat germ Rapid Translation System (RTS), or with RTS containing an empty vector control (*empty*). (D) *In thylakoido* time-course experiment performed with radiolabelled iΔC88 protein at 25 °C in the light. The incubation times are given on top of the lanes.

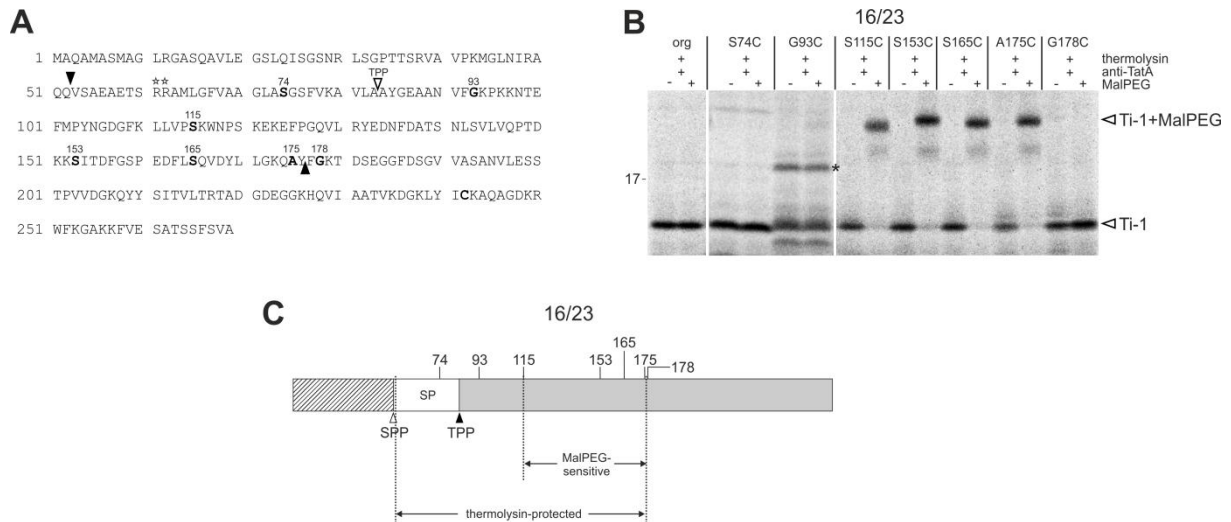


Figure 2 MalPEG-modification of the 16/23 chimera in Ti-1 conformation. (A) Amino acid sequence of the chimeric 16/23 protein given in the one-letter-code. The twin pair of arginine residues indicative for Tat transport signals is emphasized by two *asterisks*. Residues that were substituted by cysteine upon site-directed mutagenesis are highlighted in *bold* and additionally numbered on top according to their position within the precursor protein. *Filled arrowheads* indicate the thermolysin cleavage sites flanking the protease-protected fragment representing Ti-1 (Schlesier and Klösger, 2010), while the *open arrowhead* points to the TPP-cleavage site. (B) Cysteine modification of the thylakoid-bound 16/23 derivatives by externally added MalPEG₅₀₀₀. AntiTatA-pretreated thylakoids were incubated for 10 min with the 16/23 substitution mutants under transport conditions and resuspended in HM-buffer (pH 7.0) that was supplemented with 500 μM MalPEG₅₀₀₀. The modification reaction was performed for 30 min at 25°C in the dark. Afterwards, the thylakoids were sedimented, resuspended in HM-buffer (pH 8.0), and treated with thermolysin for 30 min at 4°C. Unmodified (*Ti-1*) and MalPEG₅₀₀₀-modified (*Ti-1+MalPEG*) fragments are indicated by *open arrowheads*. The *asterisk* marks an unspecific, MalPEG-independent degradation product obtained with the G93C derivative. (C) Schematic representation of the regions within the 16/23 chimera that are protected against thermolysin or sensitive to MalPEG₅₀₀₀. The positions of the residues used for cysteine-modification are indicated. For further details see legend to Figure 1.

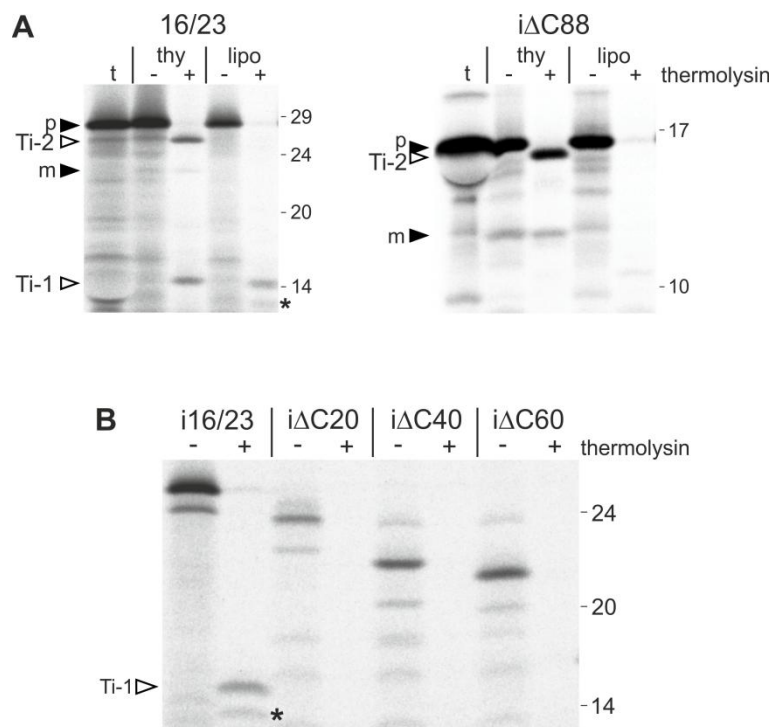


Figure 3 Membrane interaction of the 16/23 chimera is affected by C-terminal truncation. (A) Comparison of thylakoid transport and liposome insertion of the 16/23 protein (*left panel*) and the iΔC88 derivative (*right panel*). In the insertion experiments, 200 μ l liposome suspension and 5 μ l *in vitro* translation assay were mixed and further treated as described for *in thylakoido* experiments. Aliquots corresponding to 75 μ g of lipids were loaded on the gel. The asterisk marks an unspecific degradation band. (B) Liposome insertion assays using the truncation derivatives i16/23, iΔC20, iΔC40, iΔC60, and iΔC88. For further details see the legend to Figure 1.

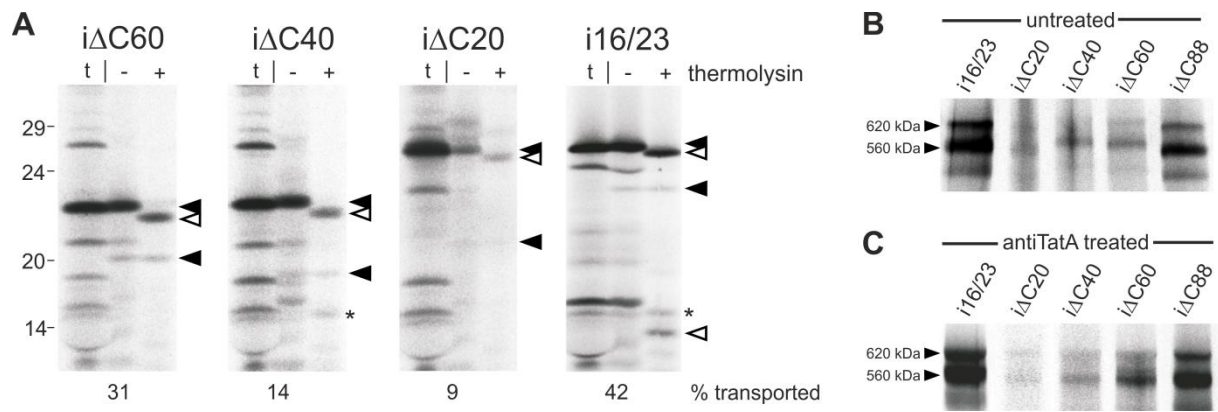


Figure 4 Transport efficiency of the C-terminal truncation derivatives correlates with the degree of receptor binding. (A) Thylakoid transport experiments with the C-terminal truncation derivatives i16/23, iΔC20, iΔC40, and iΔC60 were performed as described in the legend to Fig.1. (B) Mock-treated thylakoids (A) were washed twice with HM buffer, solubilized with digitonin, separated on a 5-13.5 % Blue Native polyacrylamide gradient gel, and visualised by phosphorimaging. The sizes of the detected complexes deduced from co-migrating protein standards in the native gel are indicated. (C) Blue-Native-PAGE as described in (B) with the exception that thy thylakoid transport experiments were performed with antiTatA treated thylakoids.

2.3.3 Ergänzende Ergebnisse

2.3.3.1 Untersuchungen zur Konformation des 23 kDa Passagierproteins

Die effektive Translokation des authentischen 23 kDa Vorläuferproteins wird im Allgemeinen auf die kompakte Faltung seines Passagierproteins zurückgeführt, die sich durch eine hohe Resistenz gegenüber Trypsin auszeichnet, sodass nach Proteasebehandlung des Tat-Substrats ein ca. 20 kDa großes Degradationsfragment vorliegt (Creighton *et al.*, 1995). Zunächst sollte untersucht werden, ob der Austausch des authentischen Transitpeptids mit demjenigen des 16 kDa Proteins zum chimären 16/23 Protein die Trypsinresistenz und somit die Konformation des Passagierproteins beeinflusst. Dafür wurden Aliquots der *in vitro*-Translationen der Proteine 23/23, 16/23 und i16/23 mit Trypsin inkubiert und die Ansätze anschließend mittels SDS-PAGE analysiert. Wie in Abbildung 13A zu sehen, ist nicht nur für das authentische 23 kDa Vorläuferprotein (23/23) eine solche Degradationsbande nach Trypsinbehandlung detektierbar, sondern auch für das chimäre 16/23 Protein. Darüber hinaus lässt sich auch für das i16/23 Protein ein proteasestabiles Fragment mit dem gleichen Migrationsverhalten im SDS-Gel nachweisen. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Faltung des Passagierproteins zu einer trypsinstabilen Konformation unabhängig vom Transitpeptid zu sein scheint.

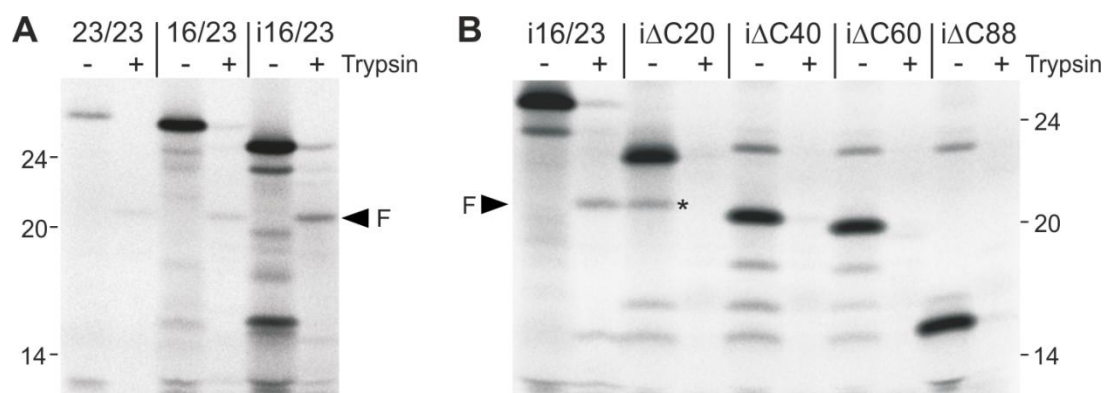


Abb.13 Untersuchungen zur Trypsinresistenz des Passagierproteins (A) Die Vorläuferproteine 23/23 und 16/23 sowie das stromale Intermediat i16/23 wurden *in vitro*-synthetisiert und Aliquots der erhaltenen Translationsprodukte mit 3 µg/ml Trypsin für 40 min auf Eis inkubiert. F kennzeichnet ein 20 kDa großes trypsinresistentes Degradationsfragment. **(B)** Trypsinbehandlung der *in vitro*-translatierten Proteine i16/23, iΔC20, iΔC40, iΔC60 und iΔC88. Für weitere Details, siehe (A). (*) markiert eine unspezifische Bande, die vermutlich auf einen alternativen Translationsstart zurückzuführen ist.

In Schlesier und Klösgen (2014, Manuskript) konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Verkürzung des 23 kDa Passagierproteins die TatBC-Rezeptorbindung und damit einhergehend auch die Translokation der Substratproteine wieder effizienter wird. Es bestand die Möglichkeit, dass dieser Effekt zumindest bei den kürzeren Varianten der in dieser Studie verwendeten Deletionsmutanten durch gefaltete Bereiche in den verbliebenen

Passagierproteinen verursacht wird. Um zu untersuchen, ob die Deletionsmutanten möglicherweise gefaltete Domänen besitzen, die ebenfalls eine Resistenz gegenüber Trypsin zeigen, wurden die *in vitro*-Translationsprodukte von allen Mutanten mit der Protease inkubiert und nachfolgend hinsichtlich eines möglichen proteasestabilen Degradationsfragments analysiert. Im Gegensatz zu den Proteinen mit unverändertem Passagierprotein zeigt keine der C-terminalen Deletionsmutanten eine resistente Fragmentbande nach Trypsinbehandlung (Abb.13B). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit einer Studie von Roffey und Theg (1996), in der bereits gezeigt werden konnte, dass C-terminale Verkürzungen am 23 kDa Passagierprotein aus Erbse zu dessen vollständiger Degradation in Anwesenheit von Trypsin und anderer Proteasen führt.

Da keine der verwendeten C-terminalen Deletionsmutanten ein proteasestabiles Passagierprotein aufweist, die TatBC-Bindungseffizienzen mit weiterer Verkürzung des C-Terminus jedoch wieder zunehmen, lässt sich vermuten, dass zumindest für kurze Tat-Substrate das Passagierprotein keine kompakte Konformation aufweisen muss, damit das Tat-Substrat effizient an den TatBC-Rezeptor binden kann.

2.3.3.2 Weiterführende Untersuchungen zur TatBC-Rezeptorbindung in Abhängigkeit vom Passagierprotein

Demnach war es nun interessant zu sehen, inwiefern sich eine vollständige Entfernung des 23 kDa Passagierproteins auf die TatBC-Bindung des verbleibenden Transitpeptids auswirkt. Aus diesem Grund wurden antiTatA-blockierte Thylakoide zum Vergleich mit dem 16/23 Protein, der Δ C88 Mutante und dem 16 kDa Transitpeptid (16TP) inkubiert und die entsprechenden Ansätze mittels *BN*-PAGE analysiert. Wie in Abbildung 14 zu sehen, ist das Transitpeptid allein in der Lage an die TatBC-Komplexe zu assoziieren. Dies stimmt mit vorherigen Studien überein, die zeigen konnten, dass das Tat-Signalpeptid bei Anwesenheit des Zwillingsarginin-Motivs durchaus auch ohne reifen Proteinteil an den TatBC-Rezeptor bindet (Teter and Theg, 1998; Mori und Cline, 2002). Dennoch assoziiert das Transitpeptid ohne Passagierprotein, trotz ähnlich starker Translation wie die anderen beiden Proteine (nicht gezeigt), nur schwach an die TatBC-Komplexe. Obwohl beim 16TP durch das Fehlen des Passagierproteins nur fünf anstelle von sechs Methioninresten im Protein vorhanden sind, zeigen Quantifizierungen unter Berücksichtigung dieser Methioninreste, dass dies nicht als Ursache für das schwache Signal an den TatBC-Komplexen gelten kann. Demnach lässt sich vermuten, dass zumindest der N-Terminus eines Passagierproteins zu einer stabileren Bindung des gesamten Tat-Substratproteins an den TatBC-Rezeptor beiträgt.

Darüber hinaus erkennt man im 16TP Ansatz einen *shift* in allen beiden Komplexbanden, der mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das fehlende 23 kDa Passagierprotein zurückzuführen ist. Interessanterweise liegen die entsprechenden Banden der Δ C88 Mutante, die noch ein ca.

10 kDa großes Passagierprotein besitzt, im *Blue-Native*-Gel genau zwischen denen der beiden anderen Proteine. Dieses beobachtete Laufverhalten der Komplexbanden in Abhängigkeit von der Größe des Passagierproteins könnte dafür sprechen, dass die mittels *BN*-PAGE detektierbaren Banden auf TatBC-Komplexe mit jeweils nur einem gebundenen Substrat zurückzuführen sind.

Zudem lässt sich in den 16/23 und Δ C88 Ansätzen eine weitere Bande bei ca. 440 kDa nachweisen, die hinsichtlich ihres Laufverhaltens die gleiche Abhängigkeit zum Substratprotein aufweist wie die beiden oberen Banden. Hierbei könnte es sich um einen weiteren TatBC-Substratkomplex handeln, der vermutlich aufgrund der schwachen Bindung des 16TP an die TatBC-Komplexe im entsprechenden Ansatz nicht mehr detektierbar ist.

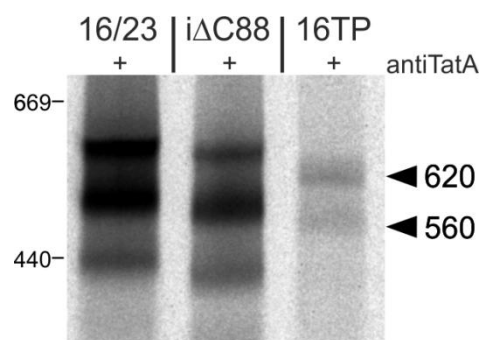


Abb.14 Untersuchungen zur TatBC-Bindung von Tat-Substratproteinen in Abhängigkeit vom Passagierprotein. AntiTatA-vorbehandelte Thylakoide wurden mit den Proteinen 16/23 und Δ C88 sowie mit dem Transitpeptid des 16 kDa Proteins inkubiert, mit HM-Puffer gewaschen und anschließend mittels mit Digitonin solubilisiert. Nachfolgend wurden die jeweiligen Ansätze auf einem 5-13% *Blue-Native*-Polyacrylamidgel separiert und mittels *Phosphorimaging* visualisiert.

2.3.3.3 Untersuchungen zum Einfluss des Passagierproteins auf die TatA-Funktion

In einem nächsten Schritt sollte nun untersucht werden, inwiefern auch der TatA-abhängige Translokationsprozess durch das Passagierprotein beeinflusst wird. Um dieser Frage nachzugehen, wurden *chase*-Experimente sowohl mit dem originalen 16/23 Protein als auch mit dessen Deletionsmutanten durchgeführt. Um den Translokationsprozess zu blockieren, ohne jedoch dabei die Membran- und TatBC-Rezeptorbindung zu beeinträchtigen, erfolgte vor dem eigentlichen Experiment eine antiTatA-Antikörper-Vorbehandlung der eingesetzten Thylakoide (Hauer *et al.*, 2013). Diese transportinkompetenten Thylakoide wurden mit *in vitro*-Translationen der jeweiligen Proteine inkubiert, um eine Membran- bzw. Rezeptorbindung zu ermöglichen und anschließend mit HM-Puffer gewaschen, um ungebundenes Substratprotein zu entfernen. Für die Rekonstitution der Translokationskompetenz wurden nachfolgend Aliquots der „beladenen“ Thylakoide mit *in vitro*-synthetisiertem TatA versetzt und unter Standardimportbedingungen (10 min bei 25°C im Licht) inkubiert. Als Kontrolle wurden zudem Aliquots mit HM-Puffer oder leerem *RTS* (*rapid*

translation system) versetzt (Abb.15). Des Weiteren ist die Rekonstitution des Membrantransports der jeweiligen Substrate gezeigt. Hierbei wurden die Banden des Ti-2 und des reifen Proteins in den proteasebehandelten Fraktionen der TatA-Ansätze quantifiziert und die Summe beider als prozentualer Anteil vom thylakoidgebundenen Substrat berechnet.

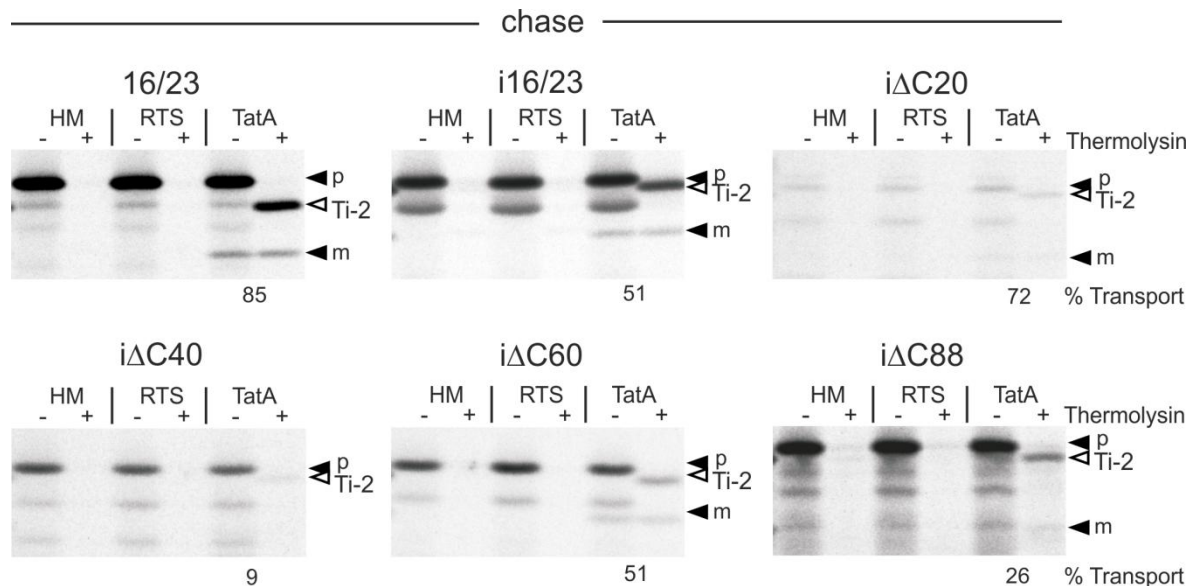


Abb.15 Untersuchungen zur TatA-induzierten Membrantranslokation von Tat-Substratproteinen in Abhängigkeit vom Passagierprotein. Chase-Experimente unter Verwendung des 16/23 Proteins sowie den Deletionsmutanten i16/23, iΔC20, iΔC40, iΔC60 und iΔC88. AntiTatA-vorbehandelte Thylakoide wurden mit den jeweiligen Proteinen für 10 min bei 25°C vorinkubiert. Nach einem Waschschriff mit HM-Puffer wurden von jedem Ansatz Aliquots für 15 min mit je 5 µl HM-Puffer (HM), leer RTS (RTS) oder RTStatA (TatA) versetzt und anschließend unter Standardimportbedingungen (25°C, Licht) für 10 min inkubiert. Die Ansätze wurden mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert und der Membrantransport an thylakoidgebundenem Substrat quantifiziert.

Die Analyse der *chase*-Experimente mittels SDS-Gelelektrophorese zeigt in den jeweiligen Kontrollspuren (HM, RTS), dass die Behandlung der Thylakoide mit antiTatA-Antikörpern bei allen Proteinen zu einer vollständigen Inhibierung des Thylakoidtransports führt, der jedoch nach externer Zugabe von *in vitro*-synthetisiertem TatA zumindest teilweise wieder reaktiviert werden kann. So werden vor allem bei den größeren Tat-Substraten über 50% des thylakoidgebundenen Substrats über die Membran transloziert. Bei den kürzeren Proteinen weist nur die iΔC60 Mutante eine ähnlich effiziente Rekonstitution auf, während die iΔC88 und iΔC40 Mutanten weitaus weniger effizient nach TatA-Zugabe transportiert werden. Im Falle der iΔC40 Mutante werden ca. 9% transloziert, so dass nur eine schwache Ti-2 Bande nach Proteasebehandlung detektierbar ist. Auch wenn die SDS-PAGE Analysen der entsprechenden *chase*-Experimente bisher nur einmal durchgeführt wurden und die ermittelten Transporteffizienzen zwischen den einzelnen Substraten stark schwanken, könnten diese vorläufigen Ergebnisse darauf hindeuten, dass neben der TatBC-Bindung auch die TatA-abhängige Translokation durch das Passagierprotein beeinflusst werden kann. Dennoch lässt

sich konstatieren, dass zwischen dem Einfluss des Passagierproteins auf die Translokation und die TatBC-Rezeptorbindung der Substrate scheinbar keine Korrelation besteht.

Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob sich die TatA-induzierte Translokation mittels nativer Analysen auch an den TatBC-Substratkomplexen detektieren lässt. Zur Klärung dieses Sachverhaltes wurden die gleichen *chase*-Experimente wiederholt, aber nun mittels *Blue-Native*-PAGE analysiert (Abb.16A). Es wurde erwartet, dass wenn TatA die Translokation von TatBC-gebundenem Substrat fördert, die Bandenintensitäten der jeweiligen Komplexe bei 560 und 620 kDa nach TatA-Zugabe abnehmen. Wie schon vormals beschrieben (Frielingsdorf *et al.*, 2008; Schlesier und Klösigen, 2014, Manuskript), führt die Inhibierung des Tat-abhängigen Proteintransports zu einer Akkumulation des Substrats an den zwei TatBC-Komplexen. Im Gegensatz dazu ist bei allen eingesetzten Proteinen in Anwesenheit von TatA ein deutlicher Abfall in den Bandenintensitäten beider Komplexe detektierbar. Davon ausgenommen ist die Mutante $\Delta C40$, die nur eine schwache Änderung in diesen Banden im Vergleich zur HM-Kontrolle aufweist. Dies korreliert mit der sehr schwachen Rekonstitution des Transportes dieser Mutante (Abb.15).

Auch wenn keine der verwendeten C-terminalen Deletionsmutanten eine detektierbare Resistenz gegenüber Trypsin aufweist und somit vermutlich auch nicht in einer gefalteten Konformation vorliegt, kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, dass diese Substrate am TatBC-Rezeptor eine transportkompetente Faltung annehmen, die ihnen nach Zugabe von TatA sowohl die Translokation über die Thylakoidmembran als auch die Dissoziation von den Komplexen erlaubt. Um dies zu klären, wurden abermals *chase*-Experimente ähnlich den bereits beschriebenen durchgeführt, nur das nun das 16 kDa Transitpeptid als Substrat Verwendung fand. Wie in Abbildung 16B gezeigt, akkumuliert das Transitpeptid nachweisbar an beiden Komplexen bei Verwendung von transportinkompetenten Thylakoiden. Die bemerkenswerteste Beobachtung ist jedoch, dass es nach Zugabe von *in vitro*-synthetisiertem TatA wie die anderen zuvor verwendeten Proteine von beiden TatBC-Komplexen dissoziiert.

Zum Vergleich der einzelnen Dissoziationseffizienzen wurden für alle bis dato verwendeten Proteine die *chase*-Experimente mit nachfolgender *Blue-Native*-PAGE-Analyse mehrfach wiederholt und anschließend die erhaltenen Intensitäten der jeweiligen 560 und 620 kDa Banden quantifiziert. Nach der Quantifizierung wurden die Werte von beiden Komplexen addiert und im prozentualen Verhältnis zum entsprechenden HM-Kontrollansatz des *chase*-Experimentes (HM) gesetzt (Abb.16C). Die Quantifizierungsergebnisse zeigen, dass im Falle der größeren Substrate die Zugabe von Leer-RTS nur geringfügig die TatBC-Bindung beeinflussen (80% - 90% gebundenes Substrat), während vor allem die Mutanten $\Delta C40$ und $\Delta C88$ sowie das 16 kDa Transitpeptid deutlich stärker von den Komplexen dissoziieren (60% gebundenes Substrat). Diese stärkere Dissoziation der Mutanten $\Delta C40$ und $\Delta C88$ spiegelt sich jedoch nicht in deren rekonstituierten Thylakoidtransport wider (siehe Abb.15), sodass

angenommen werden kann, dass diese *RTS*-bedingte Dissoziation von den TatBC-Komplexen vor dem eigentlichen Translokationsschritt stattfindet.

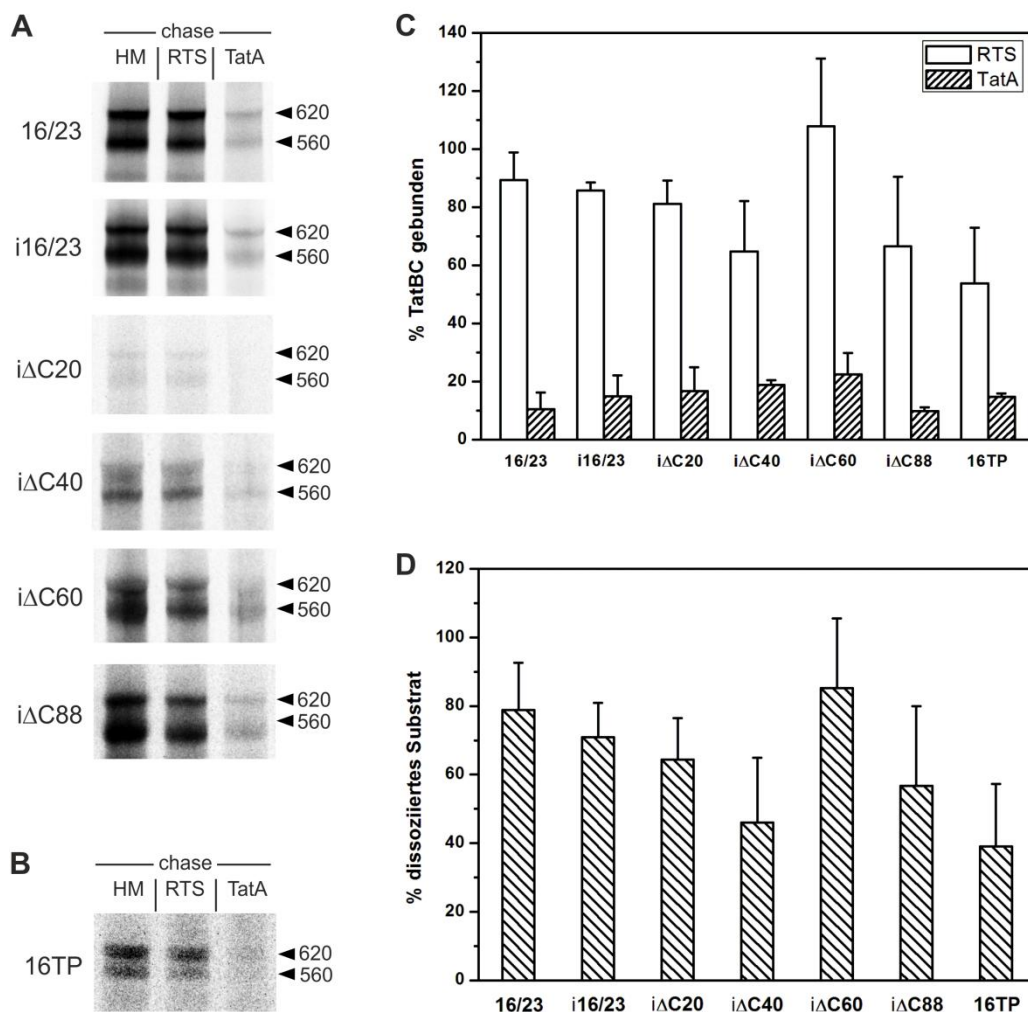


Abb.16 Untersuchungen zur TatA-induzierten Dissoziation von Tat-Substratproteinen vom TatBC-Rezeptor in Abhängigkeit vom Passagierprotein. (A) Blue-Native-PAGE-Analyse von *chase*-Experimenten wie in Abb.14 beschrieben. **(B)** Blue-Native-PAGE-Analyse eines *chase*-Experiments mit dem 16 kDa Transitpeptid (16TP). Für weitere Details, siehe Abb.14. **(C)** Quantifizierung der Menge an TatBC-gebundenem Protein basierend auf Blue-Native-PAGE-Analysen von *chase*-Experimenten wie in **(A)** und **(B)** gezeigt. Für jedes Substrat wurde die relative Menge an gebundenem Protein (620 kDa + 560 kDa Komplex) im prozentualen Verhältnis zum HM-Kontrollansatz des *chase*-Experimentes (HM) berechnet. **(D)** Darstellung der ausschließlich auf TatA zurückzuführenden Dissoziation der aufgeführten Substratproteine von den TatBC-Komplexen. Die TatA-induzierte Dissoziation ergibt sich jeweils aus der Differenz zwischen den in **(C)** ermittelten prozentualen Werten für TatBC-gebundenes Substratprotein in Anwesenheit von leerem *RTS* (*RTS*) und *RTStatA* (*TatA*). Die in den Diagrammen dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen basieren dabei auf drei unabhängigen Experimenten.

Des Weiteren verdeutlichen die Quantifizierungsdaten, dass bei allen verwendeten Proteinen nach Zugabe von *RTStatA* nicht mehr als 30% an gebundenem Substrat an den TatBC-Komplexen vorliegen. Setzt man jedoch für alle Proteine die quantifizierten Werte der unspezifischen *RTS*-bedingten Dissoziation als Nullwert, so dass man die prozentualen Werte für die ausschließlich TatA-bedingte Substratfreisetzung von den TatBC-Komplexen erhält, so

lassen sich bei einigen Proteinen deutliche Unterschiede in diesem durch das TatA vermittelten Prozess erkennen (Abb.16D). Überraschenderweise dissoziieren längere Proteine wie das 16/23, i16/23 und i Δ C20 unabhängig von ihrer Konformation und TatBC-Bindungseffizienz in Anwesenheit von TatA mit recht hoher Effizienz (nach Mittelwerten zwischen 80 und 65%), während bei einigen C-terminal verkürzten Mutanten, trotz höherer TatBC-Bindungseffizienz im Vergleich zum i Δ C20 Protein, die Freisetzung von den TatBC-Komplexen geringer ist. Dies betrifft vor allem die Dissoziationen der i Δ C40 Mutante und des 16 kDa Transitpeptids (nach Mittelwerten zwischen 50 und 40%). Dabei steht die schwächere Dissoziationseffizienz des i Δ C40 Proteins in Korrelation zu der im Vergleich zu den anderen Mutanten drastisch schlechteren Rekonstitution des Thylakoidtransports. Die i Δ C60 Mutante zeigt hingegen wieder eine ebenso hohe Dissoziationseffizienz wie die der längeren Proteine. Zieht man bei der kürzeren i Δ C88 Mutante zudem die Standardabweichung in Betracht, so könnte sich diese Mutante hinsichtlich ihrer Dissoziationseffizienz durchaus auch im Bereich der längeren Proteine befinden.

Insgesamt deuten diese Ergebnisse stark darauf hin, dass der TatA-abhängige Dissoziationsprozess weitestgehend unabhängig von der Konformation oder gar von der Anwesenheit des Passagierproteins verläuft und in Korrelation zur TatA-vermittelten Proteintranslokation steht (siehe Diskussion im Abschnitt 3.3).

2.3.3.4 Untersuchungen zum Einfluss der terminalen Prozessierung auf die TatA-Funktion

Basierend auf der Beobachtung, dass das Transitpeptid auch ohne Passagierprotein TatA-abhängig vom TatBC-Rezeptor dissoziiert, stellte sich die Frage, ob die terminale Prozessierung des Substrats zum reifen Protein mittels der TPP eine Grundvoraussetzung für dessen Dissoziation vom TatBC-Rezeptor ist. Zur Klärung dieser Frage wurden *chase*-Experimente unter Verwendung der A83L Mutante des 16/23 Proteins durchgeführt.

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass eine Substitution des Alanins mit einem Leucin an Position 83 innerhalb der Primärsequenz des 16 kDa Transitpeptids, die sich direkt vor der TPP-Spaltstelle befindet, zur einer kompletten Inhibierung des finalen Prozessierungsschrittes führt (Fan *et al.*, 2010; Dittmar *et al.*, 2014). Nach SDS-PAGE-Analyse des *chase*-Experimentes mit der A83L Substitutionsmutante zeigt sich eine starke Ti-2 Bande mit einer einhergehenden Abnahme in der Ti-1 Bandenintensität nach TatA-Zugabe (Abb.17). Des Weiteren verweist das Fehlen einer Bande des reifen Proteins auf eine erfolgreiche Inhibierung der finalen Prozessierung (Abb.17, linke Seite). Zudem lässt sich in der korrespondierenden *Blue-Native*-PAGE eine deutliche Dissoziation von den TatBC-Komplexen mit ähnlicher Effizienz wie bei den vorherigen Proteinen im Zuge der Rekonstitution des Thylakoidtransports nachweisen (Abb.17, rechte Seite).

Diese Ergebnisse zeigen somit eindeutig, dass TatA unabhängig von der finalen Prozessierung die Membrantranslokation sowie Dissoziation des Tat-Substrates vom TatBC-Rezeptor ermöglicht (siehe Diskussion im Abschnitt 3.3.2).

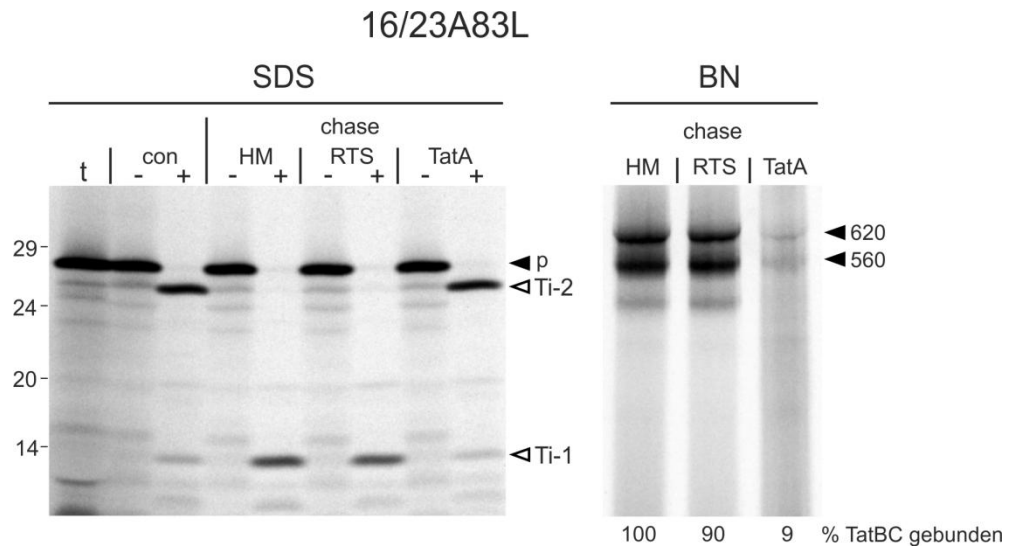


Abb.17 Untersuchungen zur TatA-Funktion in Abhängigkeit von der finalen Prozessierung. Chase-Experiment unter Verwendung der TPP Mutante 16/23A83L. Für weitere Details, siehe Abb.14 und 15.

2.4 Quantifizierung des TatA-Bedarfs während des Tat-abhängigen Proteintransports

2.4.1 Zusammenfassung

Die Translokation eines Passagierproteins im Zuge des Tat-abhängigen Proteintransports benötigt die Aktivität des TatA Proteins, dessen genaue Funktion während dieses Schrittes jedoch noch nicht aufgeklärt ist. Dabei stehen drei verschiedene Modelle derzeit zur Diskussion, die TatA allesamt eine zentrale Rolle während des Transports zusprechen: (1) TatA bildet in oligomerer Form eine im Durchmesser variable Pore, die den Membrantransport verschieden großer Tat-Substrate ermöglicht, (2) TatA induziert eine Membranschwächung, die wiederum in einer direkten Translokation des Passagierproteins durch die Lipiddoppelschicht resultiert, (3) TatA besitzt eine katalytische oder regulatorische Funktion, die einen Transport durch den TatBC-Komplex ermöglicht. Die Tatsache, dass lösliches TatA in der Lage ist die Transporteigenschaften von TatA-defizienten Thylakoiden zu rekonstituieren (Frielingsdorf *et al.*, 2008), ermöglichte es den Bedarf an TatA, der für den Transport eines Proteins benötigt wird, erstmalig zu quantifizieren und somit möglicherweise Hinweise zur tatsächlichen TatA-Funktion zu erhalten.

Im Zuge erster Analysen zeigte sich, dass *in vitro*-synthetisiertes TatA sowohl aus *Pisum sativum* als auch aus *Arabidopsis thaliana* in der Lage, ist die Transportkompetenz von Erbsenthylakoiden, die mit antiTatA-Antikörper behandelt wurden, wiederherzustellen, was mit der ausgeprägten Konservierung der Tat-Untereinheiten zumindest unter den dikotyledonen Pflanzen in Einklang steht. Für die beabsichtigte Quantifizierung der katalytischen Aktivität musste TatA jedoch in möglichst reiner Form in verschiedenen Konzentrationen zu den experimentellen Ansätzen gegeben werden. Aus diesem Grund wurde TatA aus *A. thaliana* in *E. coli* heterolog überexprimiert, aufgereinigt und auf Funktionalität hin überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass die Zugabe von überexprimiertem TatA zu antiTatA-blockierten Thylakoiden ebenso wie die von *in vitro*-synthetisiertem TatA zu einer Rekonstitution des Transportverhaltens führt.

In einem nächsten Schritt wurden Kinetikexperimente mit antiTatA-behandelten Thylakoiden in Anwesenheit von gereinigtem TatA durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass in Anwesenheit von löslichem TatA der Membrantransport des 16/23 Proteins bemerkenswert schnell verläuft, sodass schon nach zweiminütiger Inkubationszeit etwa 50% Transportrate gegenüber der Kontrollreaktion mit unbehandelten Thylakoiden zu verzeichnen war. Basierend auf diesem Resultat wurden alle nachfolgenden Experimente mit zweiminütiger Inkubationszeit durchgeführt. Überraschenderweise konnte zudem gezeigt werden, dass die Inkubationsdauer von blockierten Thylakoiden mit löslichem TatA vor Zugabe von radioaktivmarkiertem Substrat

keinerlei Einfluss auf die Effizienz des TatA-vermittelten Proteintransports hat. Dies lässt vermuten, dass entweder die Inkubationszeit von zwei Minuten ausreichend ist, um sowohl die Membraninsertion als auch die translokationsinduzierende Funktion des TatA zu ermöglichen, oder aber dass die Membraninsertion nicht essentiell für dessen Aktivität ist.

Um auszuschließen, dass die zu beobachtende Rekonstitution des Tat-Transports nicht durch eine kompetitive Freisetzung des Antikörpers durch das von außen zugegebene TatA verursacht wird, wurden mehrere Kontrollexperimente mit hohen Konzentrationen an nichtfunktionellen Varianten des TatA Proteins durchgeführt. Es zeigte sich, dass sowohl das C-terminale hydrophile TatA Fragment, welches ursprünglich als Antigen zur Herstellung des Antikörpers benutzt wurde, als auch die E10C Mutante des TatA, bei der schon in vorherigen Studien fehlende Aktivität nachgewiesen werden konnte, zu keiner signifikanten Rekonstitution der Transportkompetenz TatA-blockierter Thylakoide führt. Darüber hinaus, verdeutlichte die ausbleibende Reaktivierung des Tat-Transports nach Zugabe des mit einem N-terminalen *tag* versehenen TatA Proteins, dass N-terminale Verlängerungen die TatA-Funktionalität stark beeinträchtigen.

Basierend auf allen vorherigen Experimenten wurde der TatA-Bedarf für die Translokation des 16/23 Proteins exakt quantifiziert. Hierfür wurde die TatA-Konzentration in den experimentellen Ansätzen schrittweise von 3 auf 0,0125 μM reduziert und die entsprechenden Thylakoidtransportexperimente mehrfach wiederholt. Dabei wurden nachfolgend die translokationsspezifischen Banden (Ti-2 und reifes Protein) quantifiziert und in Beziehung zu den Signalstärken gesetzt, die aus einem Kontrollexperiment mit unbehandelten Thylakoiden erhalten wurden. Nach graphischer Auftragung der berechneten Werte gegen die Konzentration an jeweils eingesetzten löslichen TatA ergibt sich ein sigmoidaler Kurvenverlauf. In diesem zeichnet sich ab, dass in einem kleinen Intervall, welches den Wendepunkt der Kurve bei annähernd 0,1 bis 0,15 μM TatA einschließt, sogar nur geringfügige Änderungen in der TatA-Konzentration einen großen Einfluss auf die Translokationsrate haben. Interessanterweise ergab eine Quantifizierung der TatA-Menge in der Thylakoidmembran von Erbse eine Konzentration von ca. 0,17 μM . Diese korreliert mit der Konzentration an löslichem TatA, die für eine substantielle Transportrekonstitution benötigt wird und lässt somit vermuten, dass ein Großteil an löslichen TatA Molekülen, die zu den Thylakoidtransportexperimenten zugegeben wurden, durchaus katalytisch aktiv ist.

Ein weiteres interessantes Ergebnis ergab sich durch die Auftragung der quantifizierten Werte in einem Hill-Diagramm. Aus dem Anstieg des sich ergebenden linearen Graphen konnte ein Hill-Koeffizient von über drei abgelesen werden. Dieser deutet wiederum stark darauf hin, dass TatA eine positive Kooperativität hinsichtlich der Katalyse des Tat-abhängigen Membrantransports aufweist. Solche kooperativen Effekte sind jedoch üblicherweise charakteristisch für allosterische Enzyme. Dies führte zu der Spekulation, dass die gesamte

Tat-Translokase als ein heteromerer, allosterischer Enzymkomplex beschreiben werden könnte, der die Membrantranslokation von Substratproteinen ermöglicht. Das TatA Protein als Untereinheit dieses Komplexes würde dabei einen spezifischen Schritt in einem mehreren Schritte umfassenden Reaktionszyklus am TatBC-Rezeptor katalysieren, in dessen Folge die Translokation eines gefalteten Passagierproteins über die Thylakoidmembran ermöglicht wird.

Inwiefern jedoch diese Überlegungen zutreffend sind oder ob andere Modelle der TatA-Funktion gültig sind, könnte sich letztendlich unter anderem durch die Untersuchung des TatA-Bedarfs für den Transport verschieden großer Substratproteine sowie durch die genaue Bestimmung der stöchiometrischen Mengen an Substratprotein und Tat-Untereinheiten klären lassen.

2.4.2 Artikel



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbamcr

Enough is enough: TatA demand during Tat-dependent protein transport

René Steffen Hauer¹, René Schlesier¹, Kathleen Heilmann, Julia Dittmar, Mario Jakob, Ralf Bernd Klösigen*

Institute of Biology – Plant Physiology, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Weinbergweg 10, 06120 Halle/Saale, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 December 2012
Received in revised form 23 January 2013
Accepted 25 January 2013
Available online 1 February 2013

Keywords:

Twin-arginine translocation
Thylakoid membrane
Transport mechanism
Cooperative effect
Heterologous overexpression
Protein purification

ABSTRACT

The twin-arginine translocation (Tat¹) pathway is unique with respect to its property to translocate proteins in a fully folded conformation across ion-tight membranes. In chloroplasts and Gram-negative bacteria, Tat translocase consists of the integral subunits TatB and TatC, which are assumed to constitute the membrane receptor, and TatA, a bitopic membrane protein being responsible in a yet unknown manner for the membrane translocation step. Antibody inhibition of intrinsic thylakoidal TatA activity and recovery of transport by heterologously expressed, purified TatA allowed to exactly quantify the amount of TatA required to catalyse membrane transport of the model Tat substrate 16/23. We can show that TatA concentrations in the 100 nM range are sufficient to efficiently catalyse membrane transport of the protein, which corresponds well to the amount of TatA identified in thylakoids. Furthermore, TatA shows cooperativity in its catalytic activity suggesting that Tat translocase operates as an allosteric enzyme complex.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The twin-arginine translocation (Tat) pathway transports proteins across the thylakoid membrane of chloroplasts and the plasma membranes of bacteria and archaea [1–3]. It is specifically engaged by proteins carrying signal peptides with a characteristic twin pair of arginine residues within their N-region [4] and energised by the transmembrane potential, notably ΔpH and/or $\Delta\Psi$ [5,6]. The Tat pathway is unique with respect to its property to translocate proteins in a fully folded conformation across ion-tight membranes [7–10]. Even transport of two independently folded proteins by a single Tat transport signal has been described, irrespective if they are present within a single polypeptide chain or solely associated by protein–protein interaction [11,12].

In both chloroplasts and Gram-negative bacteria, Tat machinery consists of three subunits, namely TatA, TatB, and TatC (in the thylakoid system also called Tha4, Hcf106, and cpTatC, respectively) [1]. TatC is a polytopic protein with six transmembrane helices and an N-terminal stromal domain [13] providing insertase activity for Tat signal peptides [14], while both TatA and TatB have a bitopic topology with a single N-terminal membrane anchor. The stoichiometry of these subunits is

still a matter of debate. In line with their presumed concerted function as receptor complex, TatB and TatC are usually found in approximately equimolar ratio [15–17], although 4–5 fold excess of TatB has also been described [18,19]. However, the amount of TatA appears to vary much more among the different membrane systems, from substoichiometric (*Arabidopsis thaliana* [17]) to excess (*E. coli* [16]). Whether this variability reflects indeed the authentic situation or is instead the result of methodological differences, as suggested recently [19], remains to be clarified.

Mechanistically, protein transport by the Tat pathway can be divided into four consecutive steps: (1) unassisted binding of the Tat substrate to the target membrane [20–24], which may not be obligatory for all substrates though [19], (2) association of the Tat substrate with the TatBC-receptor complexes [12,25–27], which in plants have an apparent size of 560–700 kDa, (3) membrane translocation of the passenger protein, which depends on TatA function and its transient interaction with the TatBC/substrate complex [28–30], and (4) proteolytic removal of the signal peptide, which can take place even after release of the Tat substrate into the membrane [31]. While significant progress has been achieved in the last years in understanding steps 1, 2, and 4 of the transport process, step 3 describing the actual membrane translocation of the passenger protein remains still enigmatic. Three deviating working models are currently discussed [17,28,32–34]: (a) translocation pores with different or variable diameter to facilitate membrane transport of the various Tat substrates, which are all distinct in size, (b) TatA-induced membrane weakening resulting in translocation of the substrate directly through the lipid bilayer, and (c) a catalytic or regulatory function of TatA facilitating membrane transport by the TatBC complexes.

Abbreviations: Tat, twin-arginine translocation; Ti-1(–2), translocation intermediate-1(–2); TPP, thylakoidal processing peptidase; OE16, 16 kDa subunit of the oxygen-evolving system associated with photosystem II; RTS, Rapid Translation System; Hepes, 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid

* Corresponding author. Tel.: +49 345 55 26 200; fax: +49 345 55 27 285.

E-mail address: kloesigen@pflanzenphys.uni-halle.de (R.B. Klösigen).

¹ Both authors contributed equally to this work.

Despite distinct in detail, all three models ascribe TatA a central role in the translocation process. To clarify this role in more detail, we aimed for quantifying the amount of TatA required to catalyse membrane transport of a given protein. Making use of the observation that soluble TatA, which has recently been identified in the chloroplast stroma, is able to reconstitute protein transport properties of thylakoid vesicles depleted of TatA [30], we used solutions of heterologously expressed, purified TatA to exactly determine the requirements for membrane transport of a model Tat substrate.

2. Materials and methods

2.1. Heterologous overexpression and purification of TatA

The cDNA fragment encoding mature TatA from *A. thaliana* (gene accession number at2g01110) was obtained by PCR using a cDNA library generated from adult *Arabidopsis* leaves as template and the following primers: 5' ttt cc atg gct ttg ttt ggt ctc ggt gtg 3' and 5' ttt ctc gag tca tac att ctc ctt tga gc 3'. The amplified fragment was cut with NcoI and XhoI and cloned with the bacterial expression vector pET-30a (Novagen, linearised with NcoI and XhoI) yielding a chimeric TatA construct carrying a combined His-/S-tag at the N-terminus and an enterokinase cleavage site connected via two linker amino acid residues (AM) to the N-terminus of the mature TatA sequence. The double-tagged TatA construct was overexpressed in *E. coli* strain BL21 (DE3) at 37 °C in M9 minimal medium. After IPTG induction at $OD_{600nm} = 0.5$, cells were further incubated over night at 37 °C, harvested by centrifugation for 20 min at 4000 g, resuspended in 25 ml PBS (phosphate buffered saline) and ruptured by three French press passages at 1000 psi. After centrifugation for 20 min at 10,000 g, the supernatant was supplemented with 5 volume binding buffer (20 mM Hepes, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 7.5) and ultracentrifuged for 60 min at 140,000 g to remove residual cytoplasmic membranes. The pellet of the 10,000 g centrifugation step containing the inclusion bodies was dissolved for at least 1 h at 4 °C in binding buffer supplemented with 6 M GuanidiniHCl and likewise ultracentrifuged for 60 min at 140,000 g at 4 °C. The supernatants of the ultracentrifugation steps of both the cytosolic and inclusion body fractions were separately applied to Ni^{2+} -affinity chromatography (HiTrap Chelating HP columns, GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions. His-tagged TatA was recovered with four column volumes elution buffer each (20 mM Hepes, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole, pH 7.5), which in the case of the inclusion body column was additionally supplemented with 6 M GuanidiniHCl.

To remove the N-terminal double tag from mature TatA by BrCN cleavage, 5 mg eluted protein was dialysed against distilled water, shock frozen in liquid nitrogen, freeze dried in vacuum, and dissolved in 1.6 ml 85% formic acid plus 0.4 ml 5 M BrCN in acetonitrile. After incubation over night at 25 °C in the dark, the reaction mixture was diluted 10-fold with distilled water, shock frozen in liquid nitrogen and vacuum freeze dried. The protein was dissolved in Laemmli sample buffer, separated on 15% SDS-PAA gels, and visualised by non-fixing zinc-imidazole staining [35]. The TatA-containing band at 17 kDa was recovered, minced into small pieces, and electroeluted at 70 V overnight using electroelution-devices filled with standard SDS-PAGE running buffer. The protein was collected from the anodic face of the elution device and stored at 4 °C.

Final purification of TatA was performed by reversed phase HPLC (column: EC 125/4 Nucleosil 500-5 C3-PPN, Macherey & Nagel; flow rate: 1 ml/min; detection wavelength: 220 nm) applying an acetonitrile-water gradient (solvent A: water + 0.05% trifluoroacetic acid; solvent B: acetonitrile + 0.05% trifluoroacetic acid) of following composition: 0–6 min: 10% B; 6–7 min: 10 to 30% B; 7–37 min: 30 to 60% B; 37–45 min: 60 to 90% B. Under these conditions, TatA elutes at about 23 min from the column. The TatA peak was collected, supplemented with 1/10 volume of 10-fold HM buffer, and dialysed twice (3.5 kDa cut off Membra-Cell™ dialysis membranes, Serva) at

4 °C for at least 4 h each against HM buffer (10 mM Hepes/KOH, pH 8.0; 5 mM $MgCl_2$). Protein aggregates were removed by sequential centrifugation at 4 °C for 20 min at 16,000 g and for 30 min at 160,000 g in an ultracentrifuge. The final protein solution was stored at 4 °C. Due to the lack of amino acid residues absorbing UV-light at 280 nm, the concentration of soluble TatA was estimated from protein band intensities after SDS-PAGE and Coomassie colloidal staining. For comparison, dilution series of defined lysozyme solutions were loaded in parallel. With this method, the solubility of mature TatA from *A. thaliana* in HM-buffer was estimated to approximately 5 μ M.

2.2. In vitro synthesis of TatA from *Pisum sativum* and *A. thaliana*

The cDNA fragments encoding mature TatA from *P. sativum* and *A. thaliana* were cloned downstream of a start methionine codon within the pIVEX 1.3 WG vector. Cell-free synthesis of the corresponding proteins was carried out with the *Rapid Translation System (RTS) 100 wheat germ CECF kit* according to the manufacturer's instructions (5PRIME, Hamburg, Germany).

2.3. In thylakoid protein transport experiments

Isolation of chloroplasts and thylakoids from pea seedlings (*P. sativum* var. Feltham First) followed the protocol described by Hou et al. [21]. In thylakoid protein transport experiments with radiolabelled precursor proteins were carried out according to [10] with the following modifications: to inhibit protein transport by the Tat pathway, thylakoids were incubated for 30 min on ice with affinity-purified antibodies against TatA [17], washed twice with HM-buffer, and resuspended in HM buffer supplemented with TatA obtained from either overexpression or in vitro synthesis. In the experiments shown in Figs. 1 and 3, thylakoids were further incubated for 10 min on ice before starting the actual import reaction which was achieved by the addition of radiolabelled Tat substrate obtained by in vitro translation and incubating the assays at 25 °C in the light. Subsequent processing of the assays was performed as described [10,25].

2.4. Miscellaneous

Gel electrophoresis of proteins under denaturing conditions was carried out according to [36]. The gels were exposed to phosphorimager screens and analysed with the Fujifilm FLA-3000 (Fujifilm, Düsseldorf, Germany) using the software packages BASReader (version 3.14) and AIDA (version 3.25; Raytest, Straubenhardt, Germany). Western analysis was performed as described by Jakob et al. [17]. All other methods followed published protocols [37].

3. Results

3.1. Thylakoidal TatA can be replaced by soluble TatA in thylakoid transport experiments

The membrane translocation step during Tat-dependent protein transport requires the activity of TatA, which is an integral component of the thylakoid membrane. A few years ago, TatA was found also in the chloroplast stroma and shown to be capable of functionally replacing the membrane-bound TatA moiety, at least to a certain extent [30]. To further substantiate this observation, Tat transport was analysed here with complementation assays according to Dabney-Smith et al. [38]. In this approach, thylakoid vesicles isolated from pea are pretreated with affinity-purified anti-TatA antibodies to inhibit thylakoidal TatA activity. Consequently, Tat substrates like the precursor polypeptide of the 16 kDa subunit of the oxygen-evolving system (OE16) are not transported into the thylakoids but remain on the stromal (cis)-side of the vesicles where they are accessible to externally added protease (Fig. 1A). Supplementation of the assays with TatA from pea, which can

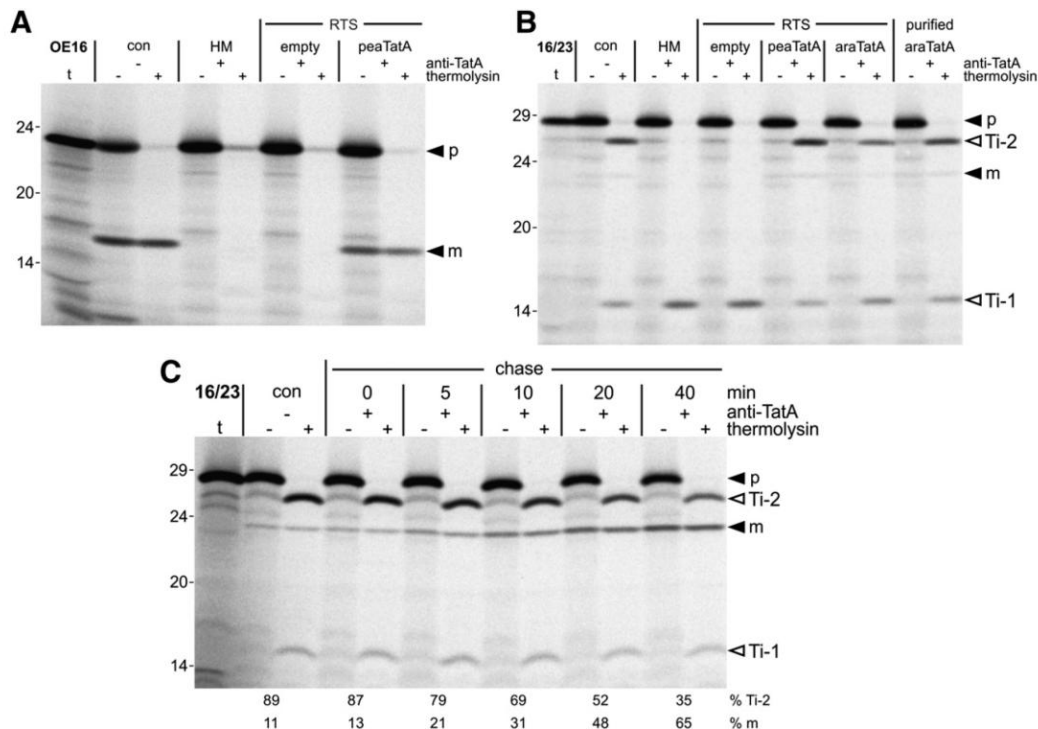


Fig. 1. TatA is required for translocation but not for maturation of Tat substrates. (A) The authentic precursor protein of OE16 was synthesized by in vitro transcription/translation of the corresponding cDNA in the presence of [³⁵S]-methionine. 5 μ l of the translation assay was incubated with isolated pea thylakoids that were either mock-treated (*con*) or treated with antibodies raised against TatA (*HM*). In the RTS assays, the anti-TatA treated thylakoids were supplemented with TatA from pea (*peaTatA*), which was obtained by in vitro transcription/translation with the wheat germ Rapid Translation System (RTS), or with RTS containing an empty vector control (*empty*). After the import reaction for 5 min at 25 °C in the light, thylakoids were washed with HM buffer (10 mM Hepes/KOH, pH 8.0; 5 mM MgCl₂) and either treated with thermolysin (200 μ g/ml, 30 min on ice, lanes +), or mock treated (lanes -). Stoichiometric amounts of each fraction corresponding to 15 μ g of chlorophyll were separated on 10–17.5% SDS-PAA gradient gels and visualised by phosphorimaging. In lane *t*, 1 μ l of the OE16 in vitro translation assay was loaded. The positions of the precursor (*p*) and mature protein (*m*) are indicated by filled arrowheads. (B) As in (A), but the experiments were performed with the chimeric precursor protein 16/23. Furthermore, the anti-TatA treated thylakoids were alternatively supplemented also with TatA from *Arabidopsis thaliana*, which was either obtained by in vitro transcription/translation with the RTS system (*araTatA*), or purified after heterologous overexpression in *E. coli* (*purified araTatA*). The open arrowheads point to the two degradation products indicative of the integral translocation intermediates *Ti-1* and *Ti-2* observed upon membrane transport of 16/23. (C) Isolated pea thylakoids were incubated with radiolabelled 16/23 precursor for 5 min at 25 °C in the light (*con*), washed with ice-cold HM buffer, resuspended in HM buffer supplemented with anti-TatA antibodies, and further incubated in a chase reaction at 25 °C in the dark for the time periods indicated on top of the lanes. All further processing steps were performed as described in (A). For each time-point, the relative amount of *Ti-2* and mature 23 kDa protein was calculated in terms of percentage of total translocated protein (*Ti-2* + mature 23 kDa protein) taking into account the number of methionine residues in either of the two translocation products.

be obtained by coupled in vitro transcription and translation in the Rapid Translation System (RTS), leads to reconstitution of membrane transport, as demonstrated by the accumulation of the mature 16 kDa protein in the thylakoid lumen where it is protected against external proteolysis.

In order to determine which step of the transport process is inhibited by the antibodies, the experiment was repeated with the chimeric 16/23 precursor protein, an established model substrate for the thylakoidal Tat machinery (e.g., [21,25]), which consists of the transit peptide of the 16 kDa subunit and the mature part of the 23 kDa subunit, both from the oxygen-evolving system. During thylakoid transport of this chimera, two translocation intermediates can be observed. The early translocation intermediate-1 (*Ti-1*) represents membrane-bound precursor protein prior to the actual membrane translocation step, i.e. the bulk of the passenger polypeptide still being situated on the stromal side of the membrane [21,39]. In contrast, translocation intermediate-2 (*Ti-2*) appears only after complete membrane translocation of the 23 kDa passenger protein. It assumes a bitopic topology within the membrane with a stromally exposed N-terminal fragment belonging to the transit peptide and the passenger located in the thylakoid lumen [21]. Conversion of *Ti-2* to the mature 23 kDa protein requires no further membrane translocation step but solely cleavage of the precursor protein by thylakoidal processing peptidase (TPP). In the case of the 16/23 chimera such cleavage is retarded due to the lack of polar residues in the vicinity of the TPP cleavage site giving rise to the temporary accumulation of the protein in its *Ti-2* conformation [31].

If the 16/23 precursor is incubated with anti-TatA treated thylakoids, it accumulates in the membranes exclusively in its *Ti-1* conformation, as demonstrated by the appearance of the indicative 14 kDa proteolytic fragment after thermolysin treatment of the thylakoids (Fig. 1B). Supplementation of the assays with TatA from pea leads to reconstitution of the membrane transport of the 16/23 protein and both *Ti-2* and the mature 23 kDa protein can be found. Essentially the same result is obtained if the assays are supplemented with RTS-generated TatA from *A. thaliana*, which likewise is able to reconstitute the transport properties of anti-TatA treated pea thylakoids (Fig. 1B).

These results reconfirm earlier findings that TatA is required solely for the actual membrane translocation of the passenger protein but not for membrane binding. Moreover, it is also not essential for the processing of Tat substrates by TPP. *Ti-2* obtained by incubation of the 16/23 precursor protein with untreated thylakoids can be chased to mature 23 kDa protein even if the thylakoids are treated with anti-TatA antibodies prior to the chase incubation (Fig. 1C). This finding furthermore corroborates that *Ti-2* is a true translocation intermediate of the 16/23 chimera and not a dead end product resulting from aborted membrane transport.

3.2. Heterologous overexpression and purification of catalytically active TatA protein

For the intended quantification of the catalytic activity, TatA obtained by in vitro translation is not ideally suited due to the

inevitable contamination with potentially perturbing proteins from the translation system (e.g., [30]). Therefore, we aimed to replace it by purified TatA molecules which can be added in arbitrary concentration to the assays. To achieve this, TatA from *A. thaliana* was heterologously overexpressed in *E. coli* and purified to homogeneity following a multistep purification procedure including Ni-affinity chromatography, preparative SDS-PAGE and reversed phase HPLC (Fig. 2; for details see also Material and methods). The identity of such purified TatA, which was obtained in concentrations up to 50 µg/ml in detergent-free HM buffer (corresponding to approx. 5 µM), was confirmed by mass spectrometry. Its catalytic activity was examined with thylakoid transport experiments similar to those described above. As with RTS-generated TatA protein, supplementation of *in thylakoido* assays containing anti-TatA treated thylakoids with 3 µM purified TatA protein leads to reconstitution of membrane transport of the 16/23 chimera (Fig. 1B) demonstrating that it is possible to obtain thylakoidal TatA in active, soluble conformation after heterologous overexpression in *E. coli*. Furthermore, it illustrates that compounds of the *in vitro* translation mixture are not required for its catalytic activity.

TatA from pea was likewise overexpressed in *E. coli* and purified to homogeneity. However, this protein shows only low solubility in HM buffer (maximal concentration achieved 2 µg/ml corresponding to approx. 0.2 µM). Moreover, it has a strong tendency to aggregate and disintegrate, even at low concentration (data not shown), which altogether precluded its analysis in the subsequent protein transport experiments.

3.3. Kinetics of membrane transport catalysed by soluble TatA

As the first step to characterise the catalytic activity of soluble TatA, time-course experiments were performed with anti-TatA treated thylakoids in the presence of 3 µM purified TatA (Fig. 3). Considering both Ti-2 and the terminally processed mature 23 kDa protein as the result

of membrane translocation of the 16/23 precursor protein, it becomes obvious that in the presence of soluble TatA membrane transport of the chimeric substrate takes place in a remarkably rapid manner. During the first few minutes after onset of the reaction, a steep and almost linear increase in the accumulation of the two translocation products is observed. Already after 2 min, almost 50% of the transport rate found in the 8 minute control reaction with untreated thylakoids is achieved (Fig. 3). At later time points, the further rise in product accumulation slows down suggesting that not all of the precursor protein present in the assay may actually be available for transport. Hence, all subsequent experiments were performed with incubation times of only 2 min. As depicted in Fig. 3A, at this early time-point most of the translocated protein is still in its Ti-2 conformation and only minor amounts of the terminally processed 23 kDa protein are detectable. This reconfirms earlier observations that processing of the 16/23 precursor takes place with slower reaction kinetics than the actual membrane translocation step [31].

Up to that point, thylakoids have always been preincubated with soluble TatA for 10 min on ice before starting the reaction by adding radiolabelled Tat substrate. This should permit membrane insertion and complex assembly of the TatA molecules which are potentially important for the catalytic activity. To examine this presumed requirement more precisely, we have varied the time period of preincubation of anti-TatA treated thylakoids with 3 µM soluble TatA from 0 to 15 min before we started the 2 minute import reaction by adding radiolabelled 16/23 chimera. To our surprise, we could not detect any influence of the preincubation time on the efficiency of TatA-mediated thylakoid transport (Fig. S1). In all assays, essentially the same amounts of translocation products (Ti-2 and mature 23 kDa protein) are found demonstrating that such preincubation can be omitted without loss of catalytic activity. This suggests that, either, the incubation time of 2 min is sufficient to facilitate both membrane insertion and translocation function, or membrane insertion of TatA is not essential for its activity.

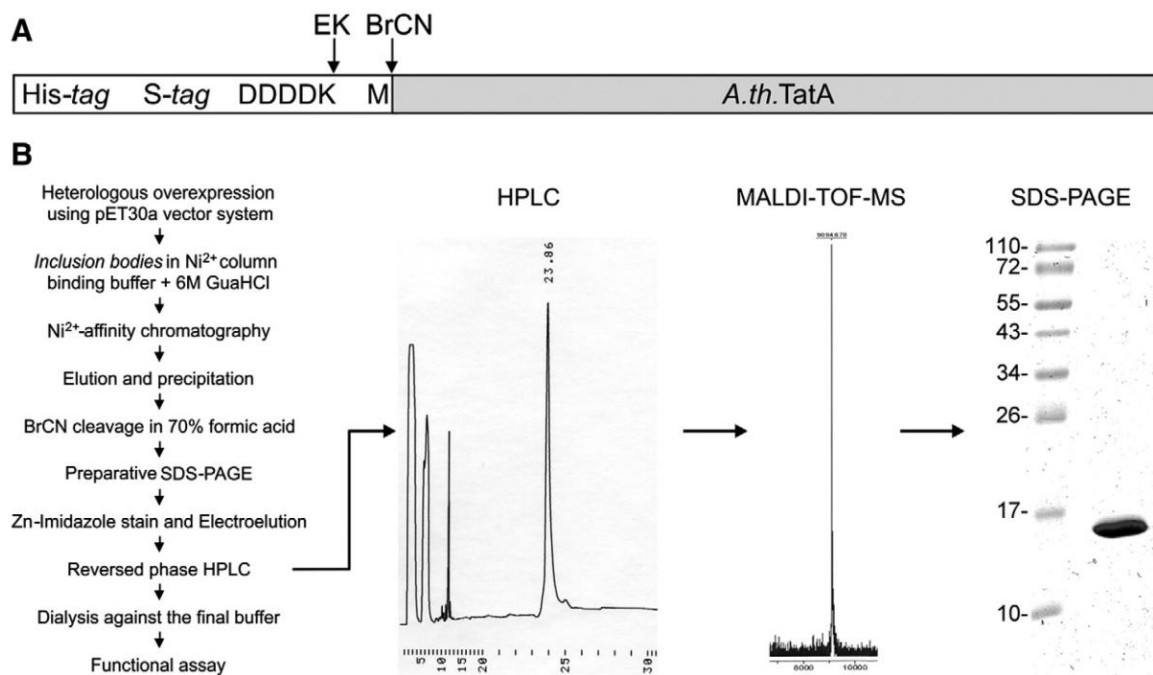


Fig. 2. Purification of TatA from *Arabidopsis thaliana* after heterologous overexpression in *E. coli*. (A) Schematic representation of the TatA construct used for bacterial overexpression of TatA from *A. thaliana*. The Histidin (*His*)- and *S*-peptide (*S*)-tags as well as the Enterokinase (*EK*) and brome cyane (*BrCN*) cleavage sites, which are all positioned N-terminally of the mature TatA sequence, are indicated. (B) Flow diagram of the protocol used for TatA purification after overexpression in *E. coli*. The protein peak at 23.86 min in the reversed phase HPLC profile was recovered and analysed by MALDI-TOF mass spectroscopy. The determined molecular mass of 9094.67 Da corresponds well with the calculated molecular weight of mature TatA (9094.3 Da). 5 µg purified protein were loaded on a 15% SDS-PAA gel and visualised by Coomassie colloidal staining. For further details, see Materials and methods.

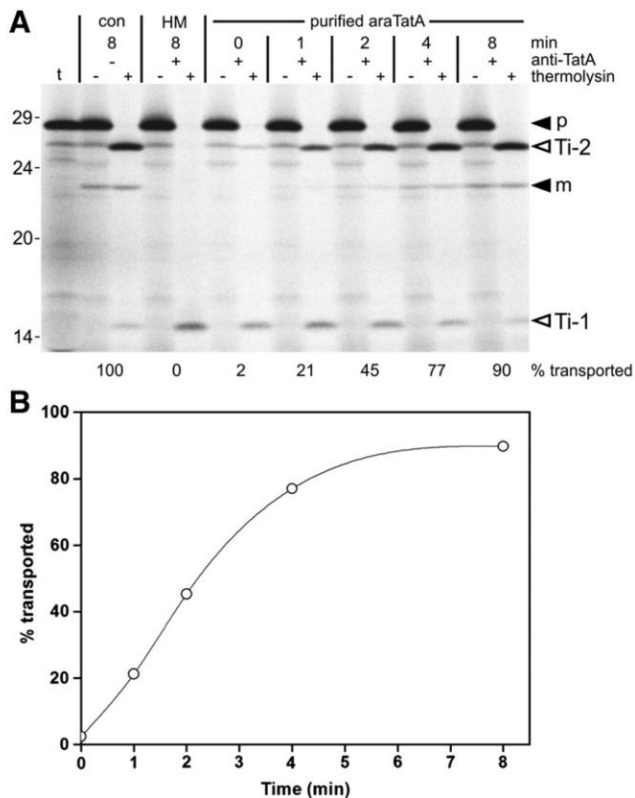


Fig. 3. Time-course of 16/23 transport after supplementation of anti-TatA treated thylakoids with purified araTatA. (A) *In thylakoido* assays containing anti-TatA treated thylakoids were supplemented with 3 μ M purified araTatA and incubated for 10 min on ice. After the addition of radiolabelled 16/23 precursor protein, the assays were further incubated at 25 °C in the light for the time periods indicated on top of the lanes. In the control assays lacking TatA (HM) or employing mock-treated thylakoids (con), the incubation time was 8 min. All further processing steps were performed as described in the legend to Fig. 1. (B) Quantification of the amount of translocated protein from the import reactions shown in (A). For each time-point, the relative amount of translocated protein (Ti-2 + mature 23 kDa protein) was calculated in terms of percentage of the control reaction with mock-treated thylakoids (con).

3.4. Tat transport recovery requires supplementation with catalytically active TatA

An important item to be considered in such experiments is the persistency of the antibody-induced inhibition of intrinsic thylakoidal TatA activity, particularly with regard to the competitive release of antibodies by externally added TatA that was described by Dabney-Smith et al. [38]. To clarify this point, *in thylakoido* assays containing anti-TatA treated thylakoids were supplemented in control experiments with the C-terminal hydrophilic TatA fragment used as antigen for antibody raise, which covers part of the amphipathic α helix plus the entire stromal domain [17]. While supplementation of the assays with 3 μ M full-size TatA results in the expected quantitative recovery of thylakoidal Tat transport, the effect of identical amounts of antigenic TatA fragment on membrane transport of the 16/23 chimera can almost be neglected (Fig. 4A). Essentially all of the Tat substrate remains arrested in its Ti-1 conformation and only a marginal increase in the amount of Ti-2 compared to the control reaction can be observed. If the experiments are performed with 5-fold lower amounts (0.6 μ M) of antigenic fragment, no difference to the control reaction is perceivable, whereas 0.6 μ M full-size TatA still leads to almost quantitative reconstitution of thylakoidal Tat transport (>80% of the positive control reaction, Fig. 4A). This reconfirms not only the suitability of the chosen experimental approach but moreover suggests that even at this lower concentration TatA is present in almost saturating amounts.

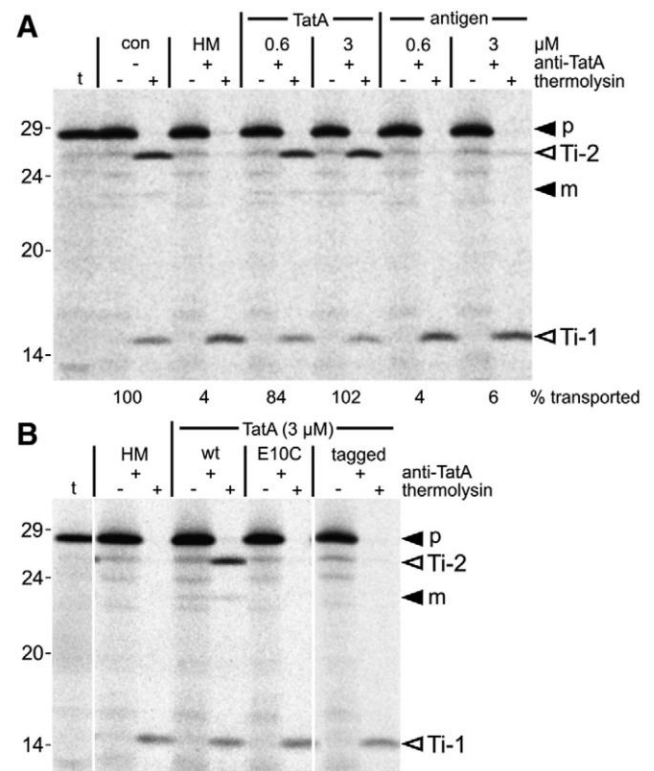


Fig. 4. Persistency of the antibody-induced TatA inhibition. (A) *In thylakoido* assays containing anti-TatA treated thylakoids were supplemented with 0.6 μ M or 3 μ M purified TatA (TatA), or with identical amounts of the purified antigenic TatA fragment used to raise anti-TatA antibodies (antigen), and incubated with radiolabelled 16/23 precursor protein for 2 min at 25 °C. (B) As in (A), but the assays were supplemented with 3 μ M of either wild-type TatA (wt), the mutant derivative TatA E10C (E10C), or N-terminally tagged TatA (tagged). The white spaces indicate that in this figure separate parts from the same gel were mounted together. For further details, see the legend to Fig. 1.

Further proof for the conclusion that the observed recovery of Tat transport of anti-TatA treated thylakoids is strictly mediated by the externally added soluble TatA was provided by the functional analysis of TatA E10C, a mutant derivative of TatA in which the glutamic acid at position 10 was replaced by cysteine. This glutamic acid residue is strictly conserved among all plant TatA proteins identified so far and the corresponding mutant of pea, called Tha4 E10C, was earlier shown to be catalytically inactive [40]. In line with that, supplementation of *in thylakoido* assays containing anti-TatA treated thylakoids with TatA E10C from *A. thaliana*, which was again obtained by heterologous overexpression in *E. coli* and subsequent purification, showed that this protein is not able to mediate thylakoid transport of the 16/23 chimera, not even at concentrations of 3 μ M in the assays (Fig. 4B). Higher concentrations of the E10C mutant could not be tested due to a reduced solubility of this mutant compared to the wild-type protein.

Finally, we supplemented the *in thylakoido* assays containing anti-TatA treated thylakoids with heterologously expressed TatA protein from *A. thaliana*, which was purified as described in Fig. 2 except that the BrCN cleavage step was omitted. Consequently, the purified protein still carries the N-terminal hexahistidine and S-peptide tags. Even at concentrations of 3 μ M, such N-terminally tagged TatA is incapable of reconstituting Tat transport of anti-TatA treated thylakoids (Fig. 4B) which ultimately rules out that the observed recovery of thylakoidal Tat transport by externally added TatA is the result of reactivation of the intrinsic thylakoidal TatA moiety by competitive antibody release. Furthermore, it demonstrates that such N-terminal extensions preclude the functionality of TatA.

3.5. Quantification of TatA requirement

Next, we wanted to exactly quantify the demand of TatA in the translocation process. In the first set of experiments, the concentration of soluble TatA present in the *in thylakoido* assays containing anti-TatA treated thylakoids was stepwise reduced from 3 μM to 0.25 μM . Using again the 16/23 chimera as substrate, it turned out that even at the lowest TatA concentration substantial Tat transport activity is obtained (Fig. 5A). For this reason, the lower concentration range was examined in more detail in two further sets of experiments in which the concentration of soluble TatA in the assays was stepwise reduced to 0.1 μM or even to 0.0125 μM (Fig. 5B and C, respectively). For each concentration ≤ 0.2 μM , at least 6 independent transport experiments were performed. The accumulation of both translocation products, i.e. Ti-2 and mature 23 kDa, was quantified and related to the amounts obtained in control experiments with untreated thylakoids performed in parallel. Plotting this ratio against the concentration of soluble TatA present in the assays results in a graph with sigmoidal shape (Fig. 5D): While at TatA concentrations up to 0.05 μM only marginal transport activity ($\leq 3\%$) is detectable, any TatA concentration ≥ 0.2 μM leads to translocation rates of at least 75% of the corresponding control reaction, i.e. within both ranges variation of TatA concentration does not substantially influence the efficiency of the transport process. However, in a small interval enclosing the transition point of the curve at approximately 0.1–0.15 μM TatA, even moderate changes in TatA concentration have a major impact on the translocation rate.

Graphical analysis of the ratio of transport rate and TatA concentration in a Hill plot results in a linear graph described by the equation $y = 3.1x + 2.7$ (see insert in Fig. 5D) in which the slope of 3.1 represents the Hill coefficient n . Any Hill coefficient $n > 1$ is an indication for positive cooperative effects and, consequently, $n = 3.1$ as observed here strongly

suggests that TatA exhibits positive cooperativity in catalysing Tat-dependent membrane transport. Remarkably, this value is in the same range as that of oligomeric enzymes with multiple ligand or substrate binding sites (e.g. haemoglobin, $n = 2.8\text{--}3.2$; [41]). It should be kept in mind though that the Hill coefficient does not represent the actual number of ligand binding sites. Instead, it describes the minimal number of such binding sites and should thus be taken as an interaction value reflecting cooperativity [42].

3.6. Quantification of the amount of TatA in thylakoid membranes of pea

Finally, we wanted to know how the activity and the demand of soluble TatA determined in our *in thylakoido* assays compare to the amount of intrinsic TatA that is available in freshly isolated thylakoid vesicles. For this purpose, dilutions of solubilised pea thylakoids were separated by SDS-PAGE and subjected to quantitative Western analysis following in principle the procedure described by Jakob et al. [17]. However, in the experiments described here dilution series of overexpressed and purified pea TatA carrying a C-terminal His-tag (pea TatA_{His}) were loaded in parallel as reference for the calibration curve, instead of the antigenic fragment that was used in the former study for calibration. This avoids misinterpretation caused by the potentially discrepant immunoreactivity of entire proteins versus antigenic protein fragments that was proposed by Celedon and Cline [19]. Development of the Western membrane by horseradish peroxidase-coupled assays (Fig. 6) followed by quantification of the resulting signals yielded a TatA concentration in these thylakoids of about 0.28 μmol per μg chlorophyll. Hence, in our *in thylakoido* assays, which contain thylakoids corresponding to 30 μg chlorophyll in a total reaction volume of 50 μl , the concentration of intrinsic thylakoidal TatA is approximately 0.17 μM which corresponds well to the concentration of soluble TatA required

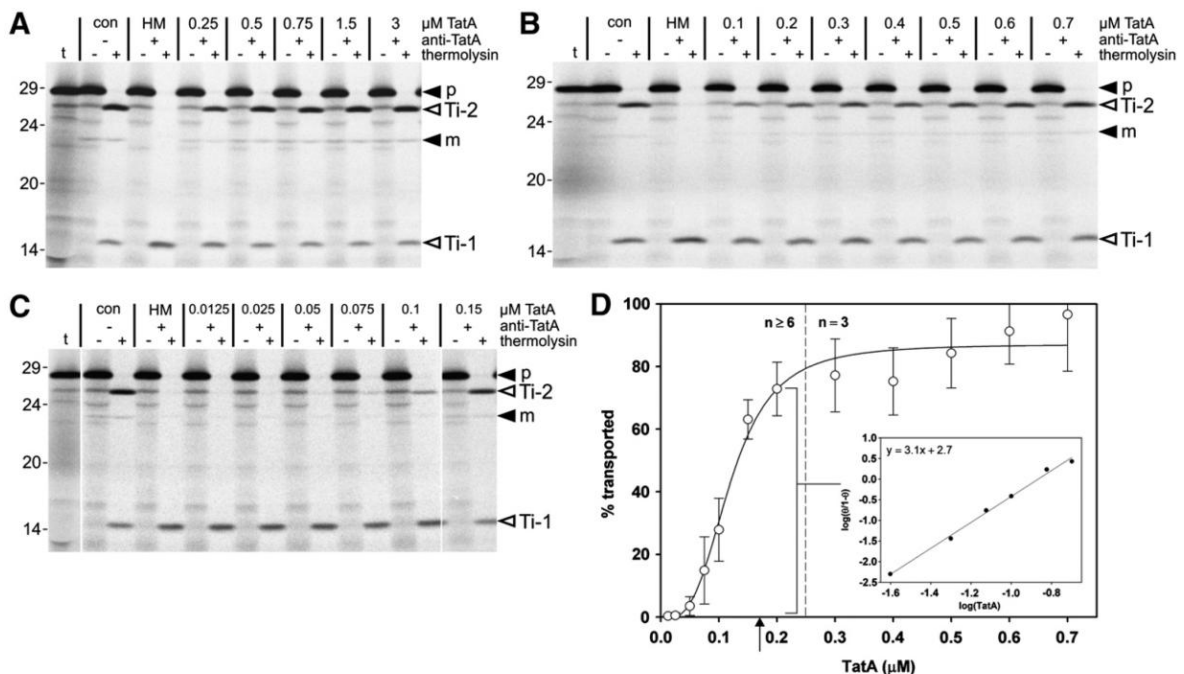


Fig. 5. Quantification of TatA requirement. (A–C) *In thylakoido* assays containing anti-TatA treated thylakoids were supplemented with purified soluble TatA at the concentrations indicated on the top of the lanes and incubated with radiolabelled 16/23 precursor protein for 2 min at 25 °C. (D) Quantification of the amount of translocated protein from repeated import reactions identical to those shown in (A–C). For each TatA concentration, the relative amount of translocated protein (Ti-2 + mature 23 kDa protein) was calculated in terms of percentage of the corresponding control reaction with mock-treated thylakoids (*con*). Both mean values and standard deviations were calculated from either three ($n = 3$) or at least six ($n \geq 6$) independently repeated experiments and shown in a single plot. The fit corresponds to a sigmoidal function according to the Hill equation $y = y_0 + (V_{\max} \times [\text{TatA}]^n) / ([\text{TatA}]^n + K_M^n)$. The arrow points to the concentration of thylakoidal TatA as determined by Western analysis (0.17 μM). *Inset*: To determine the Hill coefficient, $\log(\theta/(1-\theta))$ was plotted versus $\log[\text{TatA}]$ with θ representing the transport rate from 0 (= no transport) to 1 (= 100% transport). The slope of the resulting linear regression line (3.1) is equivalent to the Hill coefficient. For further details, see the legends to Figs. 1 and 3.

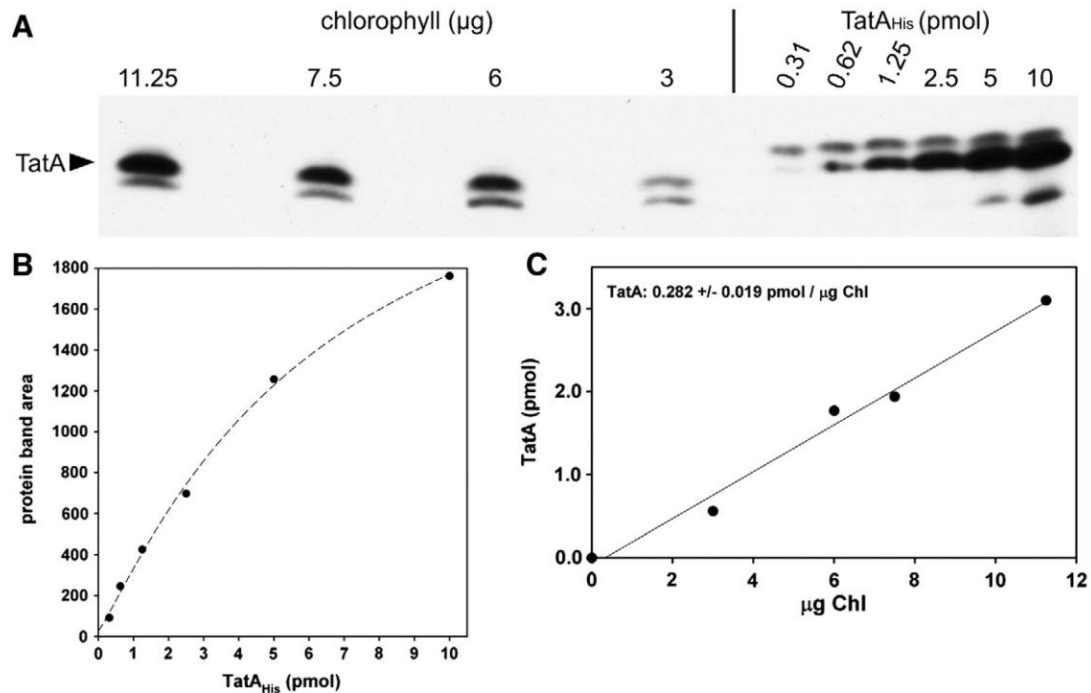


Fig. 6. Quantification of intrinsic TatA in pea thylakoids. (A) Dilution series of thylakoid proteins from pea were separated by SDS-PAGE and subjected to Western analysis using affinity purified antibodies against TatA. For comparison, dilution series of purified pea TatA_{His}, which due to the C-terminal His-tag shows a slightly reduced mobility upon SDS-PAGE, were loaded in parallel onto the same gel. The immunoblots were developed by ECL. On top of each lane, either the amount of purified TatA_{His} protein (given in pmol) or the amount of thylakoids loaded (as indicated by the chlorophyll content in the samples) is shown. (B) Calibration curve obtained by plotting the quantified Western signals (protein band area) of the pea TatA_{His} dilution series versus the concentration of TatA_{His} in the samples (given in pmol). (C) The concentration of TatA in each pea thylakoid sample (given in pmol) as deduced from the calibration curve shown in (B) was plotted versus the amount of chlorophyll loaded and fitted to a linear function. The slope of the resulting line corresponds to the concentration of TatA in pea thylakoids (0.282 ± 0.019 pmol/µg Chl).

for substantial transport recovery. From Fig. 5D it can be deduced that supplementation of *in thylakoido* assays containing anti-TatA treated thylakoids with 0.17 µM soluble TatA would lead to approximately 65% transport recovery. This suggests that a large proportion of the soluble TatA molecules added to the *in thylakoido* assays are indeed catalytically active.

4. Discussion

It was the goal of this study to quantify the amount of TatA required to facilitate membrane transport of the model Tat substrate protein 16/23. Based on the observation that soluble TatA is able to reconstitute Tat transport of thylakoid vesicles depleted of TatA [30], we inhibited the intrinsic TatA activity of freshly isolated pea thylakoids by affinity purified antibodies and replaced it by heterologously expressed, purified TatA from *A. thaliana*. Various control experiments made sure that the resulting Tat transport is not due to restoration of the intrinsic thylakoidal TatA activity, e.g. by competitive release of antibodies, but relies strictly on the catalytic activity of the externally added TatA protein.

4.1. Efficiency and flexibility of thylakoidal Tat transport (TatA requirement)

The fact that thylakoidal Tat transport can be fully reconstituted with components derived from different plant species, notably thylakoid vesicles from pea chloroplasts and TatA protein from *A. thaliana*, demonstrates the pronounced conservation of the Tat subunits, at least among dicotyledonous plants. In line with that, TatA, TatB, and TatC from pea and *Arabidopsis* show 63%, 55%, and 70% sequence identity and 90%, 72%, and 86% sequence homology, respectively, on the amino acid level. It might be worthwhile to pursue in the future if TatA from evolutionary more distant species, e.g. monocotyledonous

plants, algae, or even bacteria, are likewise capable of reconstituting Tat transport of anti-TatA treated pea thylakoids.

The catalytic activity of heterologously expressed, purified TatA is remarkably high. If *in thylakoido* assays containing anti-TatA treated thylakoids are supplemented with sufficient amounts of soluble TatA, the resulting Tat transport activity is indistinguishable from that of untreated thylakoid vesicles (e.g., Fig. 4). On the other hand, already at a TatA concentration of 0.075 µM in the assays, the accumulation of considerable amounts of the two translocation products, Ti-2 and mature 23 kDa protein, can be detected (Fig. 5). And even this low TatA demand might be an overestimation because the proportion of TatA molecules that were in fact catalytically active is not known. However, the close correlation of the transport properties of externally added TatA in the reconstituted *in thylakoido* assays (Fig. 5) with the results of thylakoidal TatA quantification in the Western analysis (Fig. 6) strongly suggests that the catalytic activity of the purified soluble TatA protein from *A. thaliana* is quite similar to that of intrinsic TatA of isolated pea thylakoids.

Tat transport in the *in thylakoido* system takes place so rapidly that even the reconstitution assays with anti-TatA treated thylakoids and soluble TatA had to be performed with incubation times of only 2 min to prevent corruption of the data sets by substrate depletion or energy consumption (Fig. 3). Furthermore, we could not observe any need for preincubation with TatA before starting the actual transport reaction by adding the 16/23 substrate protein (Fig. S1). This was rather unexpected because in our approach membrane-bound TatA activity is substituted by TatA protein provided in soluble form in detergent-free buffer. It suggests that membrane insertion and/or complex assembly of TatA, which presumably requires at least partial refolding of the polypeptide chain, takes place at a time scale of seconds and is thus too rapid to be detected by our assay system.

The time course experiment shown in Fig. 3 suggests a short lag phase in product formation which was similarly observed already

earlier (e.g. [43]). It is probably a consequence of the substrate-induced assembly of the translocase complex involving also TatA because it is not detectable after preincubation with Tat substrate [44] and diminished with increasing TatA-substrate ratios [19]. A lag phase of approximately 20–45 s was observed also in FRET-based protein binding studies using fluorescent Tat substrates and inverted membrane vesicles from *E. coli* [45]. In this study, the lag phase was attributed to an energy-dependent rather than substrate-induced assembly step yielding functional Tat translocase.

4.2. Cooperativity of TatA in membrane transport catalysis

Maybe the most surprising result of our experiments is the sigmoidal curve progression when Tat transport activity in the reconstituted *in thylakoido* system is plotted against TatA concentration (Fig. 5D). Such curves are indicative for cooperative effects that are characteristic of allosteric enzymes. However, in such enzymes they are usually evoked by cooperative binding of substrate molecules which in turn take effect on the enzymatic activity. Substrate-dependent cooperativity during Tat-dependent protein transport has already been described earlier when the entire transport process was measured by product formation [46]. It could not be observed though when merely binding of the substrate to the TatBC receptor was analysed [19].

The cooperative effect observed in our experiments is not elicited by substrate binding though. Instead, it depends on the concentration of TatA in the assays, i.e. one of the subunits of the protein transport machinery. If Tat translocase is considered as a heteromeric enzyme complex catalysing membrane translocation of substrate proteins, TatA can be addressed as subunit or even coenzyme of this complex which catalyses a specific step in the multistep reaction cycle. In the presence of delta pH and signal peptide, TatA can be crosslinked to TatB and TatC [28] demonstrating that binding of TatA to the TatBC receptor complex is intimately linked to the transport process. Since TatBC is an oligomeric complex, multiple binding sites for TatA can be assumed. In allosteric enzymes, ligand binding by one of the subunits results in the transmission of conformational changes to the other subunits which in turn increases their affinity for the ligand. Such a scenario would nicely fit also to the cooperative effects observed for TatA. In this case, binding of TatA to the multiple binding sites of the TatBC complex would lead to a conformational rearrangement, and thus activation, of this complex which finally results in the translocation of the folded substrate protein across the lipid bilayer.

If TatA is considered as coenzyme of Tat translocase, it appears feasible to regard the concentration of soluble TatA required for 50% Tat transport activity as KM value. Using the 16/23 chimera as Tat substrate, the KM value for TatA deduced from Fig. 5D is approximately 120 nM. Although presumably not even all TatA molecules used in our experiments were indeed catalytically active (see above), this value is remarkably close to the KM value of 76.6 nM reported for the iOE17 substrate [46], the maize ortholog of the 16 kDa protein from spinach (gene: *psbQ*). Although highly speculative, this might suggest that TatA and Tat substrate are needed in stoichiometric amounts in the transport process. Experiments are underway to investigate if this finding can be confirmed for other Tat substrates. Whether such transport involves a pore or channel structure and, if so, which and how many of the subunits of the TatABC translocase are constituents of this pore/channel structure remains to be shown.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.01.030>.

Acknowledgements

We thank Birgit Kretschmann for excellent technical assistance. This work was supported by grants from the Deutsche

Forschungsgemeinschaft (KL 862/5-1) and the European Regional Development Fund of the European Commission.

References

- [1] M. Müller, R.B. Klösgen, The Tat pathway in bacteria and chloroplasts (review), *Mol. Membr. Biol.* 22 (2005) 113–121.
- [2] B. Hou, T. Brüser, The Tat-dependent protein translocation pathway, *Biomol. Concepts* 2 (2011) 507–523.
- [3] T. Palmer, B.C. Berks, The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway, *Nat. Rev. Microbiol.* 10 (2012) 483–496.
- [4] A.M. Chaddock, A. Mant, I. Karnauchov, S. Brink, R.G. Herrmann, R.B. Klösgen, C. Robinson, A new type of signal peptide: central role of a twin-arginine motif in transfer signals for the Delta pH-dependent thylakoidal protein translocase, *EMBO J.* 14 (1995) 2715–2722.
- [5] U.K. Bageshwar, S.M. Musser, Two electrical potential-dependent steps are required for transport by the *Escherichia coli* Tat machinery, *J. Cell Biol.* 179 (2007) 87–99.
- [6] N.A. Braun, A.W. Davis, S.M. Theg, The chloroplast Tat pathway utilizes the trans-membrane electric potential as an energy source, *Biophys. J.* 93 (2007) 1993–1998.
- [7] S.A. Clark, S.M. Theg, A folded protein can be transported across the chloroplast envelope and thylakoid membranes, *Mol. Biol. Cell* 8 (1997) 923–934.
- [8] C.L. Santini, B. Ize, A. Chanal, M. Müller, G. Giordano, L.F. Wu, A novel sec-independent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli*, *EMBO J.* 17 (1998) 101–112.
- [9] F. Sargent, E.G. Bogsch, N.R. Stanley, M. Wexler, C. Robinson, B.C. Berks, T. Palmer, Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway, *EMBO J.* 17 (1998) 3640–3650.
- [10] J.P. Marques, I. Dudeck, R.B. Klösgen, Targeting of EGFP chimeras within chloroplasts, *Mol. Genet. Genomics* 269 (2003) 381–387.
- [11] A. Rodrigue, A. Chanal, K. Beck, M. Müller, L.F. Wu, Co-translocation of a periplasmic enzyme complex by a hitchhiker mechanism through the bacterial tat pathway, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 13223–13228.
- [12] E. Fan, M. Jakob, R.B. Klösgen, One signal is enough: stepwise transport of two distinct passenger proteins by the Tat pathway across the thylakoid membrane, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 398 (2010) 438–443.
- [13] S.E. Rollauer, M.J. Tarry, J.E. Graham, M. Jääskeläinen, F. Jäger, S. Johnson, M. Krehenbrink, S.M. Liu, M.J. Lukey, J. Marcoux, M.A. McDowell, F. Rodriguez, P. Roversi, P.J. Stansfeld, C.V. Robinson, M.S. Sansom, T. Palmer, M. Högbom, B.C. Berks, S.M. Lea, Structure of the Tat core of the twin-arginine protein transport system, *Nature* 492 (2012) 210–214.
- [14] J. Fröbel, P. Rose, F. Lausberg, A.S. Blümmel, R. Freudl, M. Müller, Transmembrane insertion of twin-arginine signal peptides is driven by TatC and regulated by TatB, *Nat. Commun.* 3 (2012) 1311.
- [15] A. Bolhuis, J.E. Mathers, J.D. Thomas, C.M. Barrett, C. Robinson, TatB and TatC form a functional and structural unit of the twin-arginine translocase from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 20213–20219.
- [16] R.L. Jack, F. Sargent, B.C. Berks, G. Sawers, T. Palmer, Constitutive expression of *Escherichia coli* tat genes indicates an important role for the twin-arginine translocase during aerobic and anaerobic growth, *J. Bacteriol.* 183 (2001) 1801–1804.
- [17] M. Jakob, S. Kaiser, M. Gutensohn, P. Hanner, R.B. Klösgen, Tat subunit stoichiometry in *Arabidopsis thaliana* challenges the proposed function of TatA as the translocation pore, *Biochim. Biophys. Acta* 1793 (2009) 388–394.
- [18] H. Mori, E.J. Summer, K. Cline, Chloroplast TatC plays a direct role in thylakoid (Delta)pH-dependent protein transport, *FEBS Lett.* 501 (2001) 65–68.
- [19] J.M. Celedon, K. Cline, Stoichiometry for binding and transport by the twin arginine translocation system, *J. Cell Biol.* 197 (2012) 523–534.
- [20] S.M. Musser, S.M. Theg, Characterization of the early steps of OE17 precursor transport by the thylakoid Delta pH/Tat machinery, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 2588–2598.
- [21] B. Hou, S. Frielingsdorf, R.B. Klösgen, Unassisted membrane insertion as the initial step in Delta pH/Tat-dependent protein transport, *J. Mol. Biol.* 355 (2006) 957–967.
- [22] A. Shanmugham, H.W. Wong Fong, Y.J. Bollen Sang, H. Lill, Membrane binding of twin arginine preproteins as an early step in translocation, *Biochemistry* 45 (2006) 2243–2249.
- [23] U.K. Bageshwar, N. Whitaker, F.C. Liang, S.M. Musser, Interconvertibility of lipid- and translocon-bound forms of the bacterial Tat precursor pre-Sufl, *Mol. Microbiol.* 74 (2009) 209–226.
- [24] A.J. Karlsson, H.K. Lim, H. Xu, M.A. Rocco, M.A. Bratkowski, A. Ke, M.P. DeLisa, Engineering antibody fitness and function using membrane-anchored display of correctly folded proteins, *J. Mol. Biol.* 416 (2012) 94–107.
- [25] J. Berghöfer, R.B. Klösgen, Two distinct translocation intermediates can be distinguished during protein transport by the TAT (Delta pH) pathway across the thylakoid membrane, *FEBS Lett.* 460 (1999) 328–332.
- [26] K. Cline, H. Mori, Thylakoid Delta pH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport, *J. Cell Biol.* 154 (2001) 719–729.
- [27] S. Richter, T. Brüser, Targeting of unfolded PhoA to the TAT translocon of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 42723–42730.
- [28] H. Mori, K. Cline, A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid [Delta] pH/Tat translocase, *J. Cell Biol.* 157 (2002) 205–210.
- [29] M. Alami, I. Luke, S. Deitermann, G. Eisner, H.G. Koch, J. Brunner, M. Müller, Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in *Escherichia coli*, *Mol. Cell* 12 (2003) 937–946.

- [30] S. Frielingsdorf, M. Jakob, R.B. Klösgen, A stromal pool of TatA promotes Tat-dependent protein transport across the thylakoid membrane, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 33838–33845.
- [31] S. Frielingsdorf, R.B. Klösgen, Prerequisites for terminal processing of thylakoidal Tat substrates, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 24455–24462.
- [32] U. Gohlke, L. Pullan, C.A. McDevitt, I. Porcellii, E. de Leeuw, T. Palmer, H.R. Saibil, B.C. Berks, The TatA component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 10482–10486.
- [33] K. Cline, M. McCaffery, Evidence for a dynamic and transient pathway through the TAT protein transport machinery, *EMBO J.* 26 (2007) 3039–3049.
- [34] P. Natale, T. Brüser, A.J. Driessen, Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane – distinct translocases and mechanisms, *Biochim. Biophys. Acta* 1778 (2008) 1735–1756.
- [35] L. Castellanos-Serra, W. Proenza, V. Huerta, R.L. Moritz, R.J. Simpson, Proteome analysis of polyacrylamide gel-separated proteins visualized by reversible negative staining using imidazole–zinc salts, *Electrophoresis* 20 (1999) 732–737.
- [36] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [37] J. Sambrook, D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 2001.
- [38] C. Dabney-Smith, H. Mori, K. Cline, Requirement of a Tha4-conserved transmembrane glutamate in thylakoid Tat translocase assembly revealed by biochemical complementation, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 43027–43033.
- [39] R. Schlesier, R.B. Klösgen, Twin arginine translocation (Tat)-dependent protein transport: the passenger protein participates in the initial membrane binding step, *Biol. Chem.* 391 (2010) 1411–1417.
- [40] C. Dabney-Smith, H. Mori, K. Cline, Oligomers of Tha4 organize at the thylakoid Tat translocase during protein transport, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 5476–5483.
- [41] A.V. Hill, The combinations of haemoglobin with oxygen and carbon monoxide, *J. Physiol.* 40 (1910) iv–vii.
- [42] J.N. Weiss, The Hill equation revisited: uses and misuses, *FASEB J.* 11 (1997) 835–841.
- [43] N.N. Alder, S.M. Theg, Energetics of protein transport across biological membranes. a study of the thylakoid Delta pH-dependent/cpTat pathway, *Cell* 112 (2003) 231–242.
- [44] S.M. Musser, S.M. Theg, Proton transfer limits protein translocation rate by the thylakoid Delta pH/Tat machinery, *Biochemistry* 39 (2000) 8228–8233.
- [45] N. Whitaker, U.K. Bageshwar, S.M. Musser, Kinetics of precursor interactions with the bacterial Tat translocase detected by real-time FRET, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 11252–11260.
- [46] N.N. Alder, S.M. Theg, Protein transport via the cpTat pathway displays cooperativity and is stimulated by transport-incompetent substrate, *FEBS Lett.* 540 (2003) 96–100.

2.4.3 Ergänzende Ergebnisse

Wie in Hauer *et al.* (2013) beschrieben, war es mittels Thylakoidtransportexperimenten und deren anschließender Analyse unter denaturierenden Bedingungen möglich, den genauen TatA-Bedarf für die Translokation des chimären 16/23 Proteins zu bestimmen. Unter Verwendung nativer Gelelektrophoresemethoden konnte zudem in Abschnitt 2.3.3 gezeigt werden, dass die Zugabe von *in vitro*-synthetisiertem Erbsen-TatA zu einer deutlichen Signalintensitätsabnahme der beiden TatBC-Substratkomplexe führt. In weiterführenden Experimenten sollte nun für das 16/23 Protein untersucht werden, ob die TatA-Abhängigkeit des Translokationsschrittes mit derjenigen des Dissoziationsprozesses am TatBC-Komplex korreliert.

2.4.3.1 Untersuchungen zur Dissoziation des 16/23 Proteins vom TatBC-Komplex nach Zugabe von überexprimiertem TatA

Da eine exakte Quantifizierung des TatA-Bedarfs für die Dissoziation des 16/23 Proteins vom TatBC-Rezeptorkomplex mit *in vitro*-synthetisiertem TatA nicht möglich ist, wurde zu diesem Zweck abermals überexprimiertes und funktionell aufgereinigtes *Arabidopsis thaliana*-TatA unterschiedlicher Konzentration verwendet (Hauer *et al.*, 2013). In einem ersten Schritt sollte jedoch zunächst untersucht werden, ob das überexprimierte TatA aus *Arabidopsis thaliana* in einer Konzentration, die in Transportexperimenten zu einer vollständigen Rekonstitution der Translokation führt, mit ähnlicher Effizienz wie das *in vitro*-synthetisierte Erbsen-TatA die Dissoziation des 16/23 Proteins vom TatBC-Komplex verursacht. Zu diesem Zweck wurden im Zuge eines *chase*-Experimentes antiTatA-blockierte Thylakoide für 10 min mit radioaktivmarkiertem 16/23 Protein inkubiert und nach einem anschließenden Waschschriff entweder mit *in vitro*-synthetisiertem TatA (*RTSTatA*) aus Erbse oder mit gereinigtem *Arabidopsis thaliana*-TatA für 10 min unter Transportbedingungen (Licht, 25°C) versetzt. Aufgrund des Waschschriffes sollte dabei weitestgehend nur TatBC-gebundenes Protein für einen Transport zur Verfügung stehen. Im Gegensatz zu den *chase*-Experimenten im Abschnitt 2.3.3 wurde jedoch, basierend auf der in Hauer *et al.* (2013) beschriebenen Beobachtung, dass eine Vorinkubation der Thylakoide mit TatA auf Eis vor der eigentlichen Inkubation mit radioaktivem Substrat unter Transportbedingungen nicht notwendig ist, bei den folgenden Experimenten auf eine solche Vorinkubation verzichtet.

Wie in Abbildung 18 zu sehen, führt sowohl die Anwesenheit von *RTSTatA* als auch von überexprimiertem TatA mit annähernd gleicher Effizienz zu einer starken Abnahme in den Bandenintensitäten der beiden TatBC-Substratkomplexe. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass beide unterschiedlich synthetisierten und aus unterschiedlichen Spezies stammenden TatA Proteine die Dissoziation des 16/23 Proteins vom Rezeptorkomplex ermöglichen. Darüber

hinaus zeigt der Vergleich mit den in Abschnitt 2.3.3 aufgeführten Ergebnissen, dass auch für den Dissoziationsprozess keine längere Vorinkubation des TatA Proteins mit den transportinkompetenten Thylakoiden nötig ist.

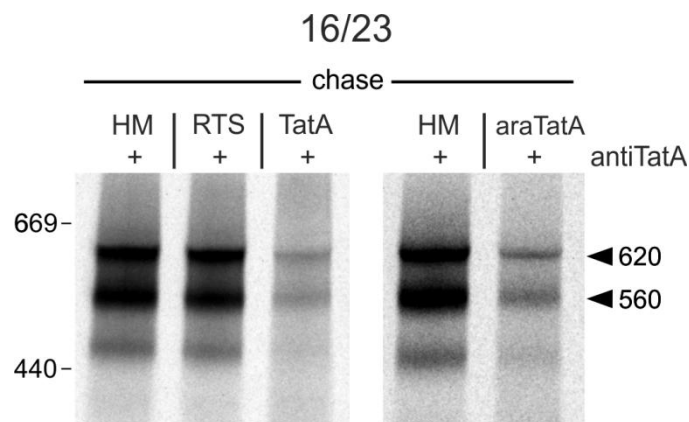


Abb.18 Aufgereinigtes *Arabidopsis thaliana*-TatA ermöglicht die Dissoziation des 16/23 Proteins vom TatBC-Rezeptorkomplex. AntiTatA-Antikörper vorbehandelte Thylakoide wurden für 10 min bei 25°C mit radioaktivmarkiertem 16/23 Protein inkubiert. Nach einem anschließenden Waschschritt wurden die Ansätze entweder mit *in vitro*-synthetisiertem Erbsen-TatA (TatA) oder heterolog überexprimierten, gereinigtem *Arabidopsis thaliana*-TatA (araTatA, 0.6 μ M) versetzt und unverzüglich bei Standard-Transportbedingungen (25°C, Licht) für 10 min inkubiert. Als Kontrolle wurden Ansätze ausschließlich mit Leer-RTS (RTS) oder HM-Puffer versetzt. Die Analyse des Experimentes erfolgte mittels *Blue-Native*-Gelelektrophorese und anschließender Autoradiographie. Für weitere Details, siehe Abb.15.

In einem nächsten Schritt sollte nun mittels *Blue-Native*-PAGE-Analysen untersucht werden, inwiefern die Kinetik der Substrat-Dissoziation mit derjenigen der Translokation bei einem Überschuss an TatA korreliert. Hierfür wurden antiTatA-blockierte und mit 16/23 Protein vorinkubierte Thylakoide mit 0,6 μ M TatA versetzt und die entsprechenden Ansätze unterschiedlich lang unter Transportbedingungen inkubiert (Abb.19A). In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die verwendete TatA-Konzentration in einem gesättigten Bereich liegt, indem es zu einer vollständigen Rekonstitution des 16/23 Proteins kommt (Hauer *et al.*, 2013). Nach erfolgter Auftrennung der jeweiligen Ansätze mittels *Blue-Native*-Gelelektrophorese wurden die beiden oberen Komplexbanden bei 560 und 620 kDa einzeln quantifiziert und die erhaltenen Werte im Verhältnis zu den Komplexbanden im HM-Kontrollansatz gesetzt (Abb.19B). Dabei zeigt sich, dass schon innerhalb der ersten fünf Minuten etwa 85% des Substrats (bei Addition beider Komplexwerte) von den Komplexen dissoziiert sind. Interessanterweise nehmen die Bandenintensitäten beider Komplexe nicht in gleichem Maße ab. Während am 560 kDa Komplex noch 85% Intensität bei 0 min zu detektieren sind, lassen sich zum gleichen Zeitpunkt beim oberen Komplex nur noch 50% des HM-Kontrollwertes nachweisen. Erst ab einer Inkubationszeit von 10 min konvergieren beide Messkurven bei einem Wert von 15%, der mit weiterer Inkubationszeit nur noch geringfügig abfällt (10% bei 40 min).

Insgesamt ergibt sich bei diesem Experiment ein zur Transportkinetik annähernd invers verlaufender Graph, der für eine enge Korrelation zwischen Translokation und Dissoziation des 16/23 Proteins in Abhängigkeit von TatA spricht. Obwohl der 2 min Wert eher am Ende des linearen Bereichs liegt, wurden unter anderem aufgrund der Vergleichbarkeit zu den erhaltenen TatA-Quantifizierungsdaten aus Hauer *et al.* (2013) die nachfolgenden Experimente mit dieser Inkubationszeit durchgeführt.

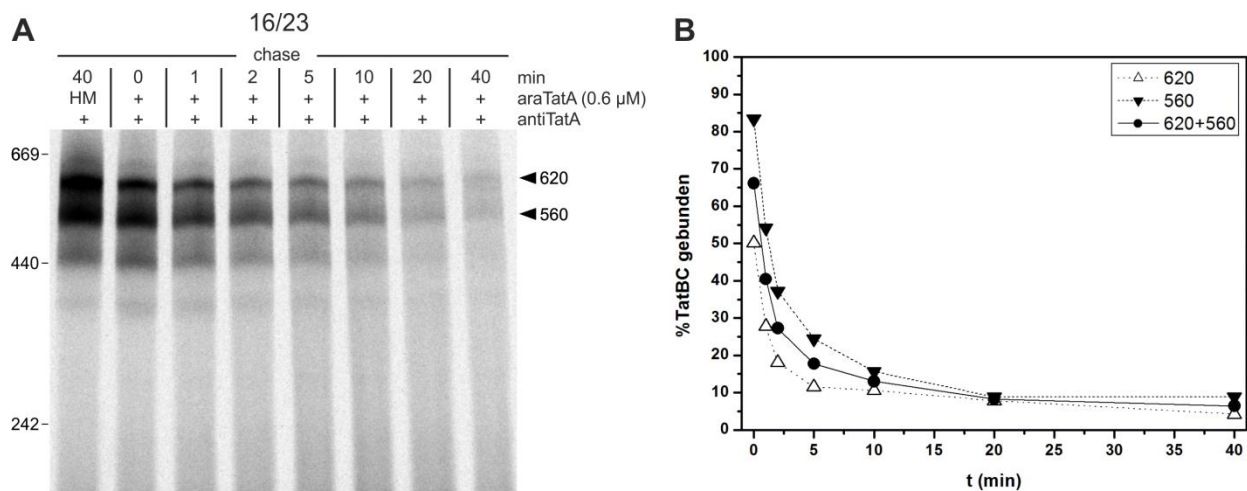


Abb.19 Kinetik der TatA-vermittelten Dissoziation des 16/23 Proteins vom TatBC-Rezeptorkomplex. (A) Thylakoidtransportansätze mit antiTatA-blockierten und mit 16/23 Protein vorinkubierten Thylakoiden wurden mit je 0,6 μM TatA versetzt und nach einem Waschschrift für unterschiedlichen Zeiten, wie oberhalb der Abbildung angezeigt, unter Standardtransportbedingungen (25°C, Licht) weiter inkubiert. Für den HM-Kontrollansatz betrug die Inkubationszeit 40 min. Für weitere Details, siehe Abb.15. (B) Quantifizierung der Bandenintensitäten des 620 und 560 kDa Komplexes der jeweiligen Transportansätze aus (A). Für jeden Zeitpunkt wurden die relativen Intensitäten, entweder einzeln oder nach Addition beider Komplexbanden, im prozentualen Verhältnis zum HM-Kontrollansatz dargestellt.

Basierend auf den vorherigen Ergebnissen sollte nun als nächstes der genaue TatA-Bedarf für die Dissoziation des 16/23 Proteins vom TatBC-Rezeptorkomplex quantifiziert werden. Hierfür wurden Transportansätze, die antiTatA-blockierte und substratbeladene Thylakoide beinhalten, nach erfolgtem Waschschrift mit 0,05 bis 0,6 μM an überexprimiertem TatA versetzt und anschließend für 2 min unter Transportbedingungen inkubiert. Für jede Konzentrationsreihe wurden vier unabhängige Experimente durchgeführt. Die Wahl der jeweils eingesetzten TatA-Konzentrationen bezog sich dabei auf einen Konzentrationsbereich, bei dem eine substantielle Rekonstitution des 16/23 Proteintransports nachgewiesen werden konnte (Hauer *et al.*, 2013). Nach Quantifizierung der beiden Komplexbanden bei 560 und 620 kDa wurden die erhaltenen Werte in den jeweiligen Ansätzen addiert und ins Verhältnis zum additiven Wert der Komplexbanden im HM-Kontrollansatz gesetzt.

Wie in Abbildung 20A gut zu erkennen, nehmen mit ansteigender TatA-Konzentration die Bandenintensitäten der beiden TatBC-Substratkomplexe bis auf ca. 40% (bei 0,6 μM) ab.

Aufgrund der starken Streuung der Messwerte bei 0,4 μM TatA, lässt sich jedoch nicht eindeutig klären, ob auch diese TatA-Konzentration in Bezug auf die Substratdissoziation im gesättigten Bereich liegt. Dennoch weist die graphische Darstellung der quantifizierten Werte darauf hin, dass die Prozesse der Translokation und Dissoziation auch hinsichtlich ihres TatA-Bedarfs miteinander korrelieren.

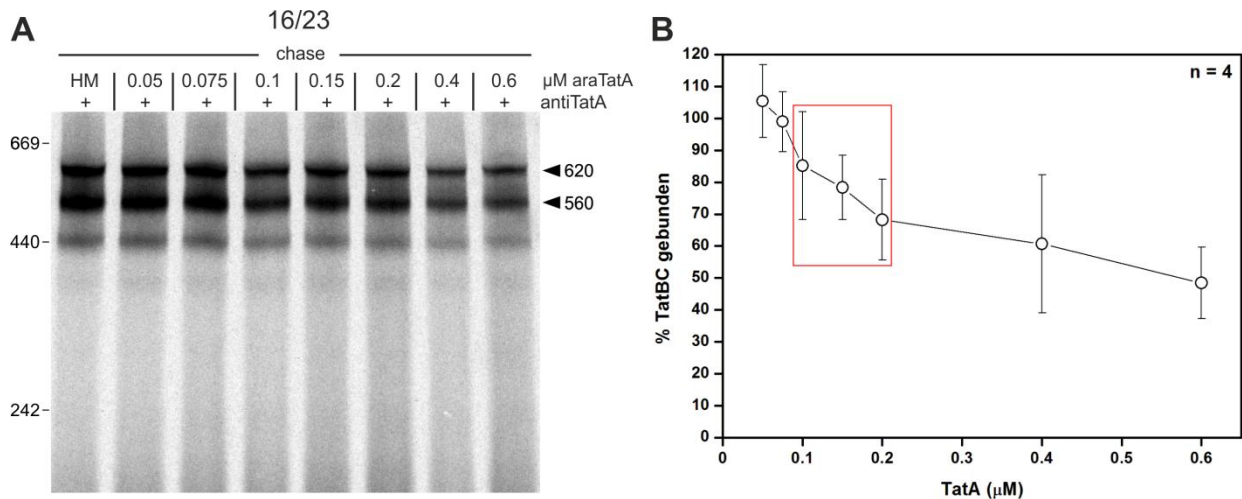


Abb.20 Quantifizierung des TatA-Bedarfs für die Dissoziation des 16/23 Proteins vom TatBC-Rezeptorkomplex. (A) Thylakoidtransportansätze mit antiTatA-blockierten und mit 16/23 Protein vorinkubierten Thylakoiden wurden, wie oberhalb der Spuren angegeben, mit unterschiedlichen Konzentrationen an TatA versetzt und anschließend für 2 min unter Standardtransportbedingungen (25 °C, Licht) weiter inkubiert. Für weitere Details, siehe Abb.14. **(B)** Quantifizierung der Bandenintensitäten der TatBC-Substratkomplexe aus mehrfach wiederholten ($n=4$) und in **(A)** exemplarisch dargestellten Thylakoidtransportexperimenten. Für jede TatA-Konzentration wurden die relativen Intensitäten nach Addition beider Komplexbanden im prozentualen Verhältnis zum HM-Kontrollansatz dargestellt. Rot umrahmt: Konzentrationsintervall mit geringfügiger Substratdissoziation. Für weitere Details, siehe Text.

Interessanterweise fällt im Bereich von 0,1 bis 0,2 μM die Abnahme der Komplexbanden weitaus geringer aus (Abb.20B), als die entsprechenden Analysen zum Thylakoidtransport des 16/23 Proteins vermuten lassen würden, da bei diesen schon bei 0,2 μM ein starker Anstieg in der Importrate bis zur Sättigung zu verzeichnen ist (Hauer *et al.*, 2013). So beträgt die Substratabnahme an den Komplexen in diesem relativ kleinen Konzentrationsintervall (rot umrahmt) laut der entsprechenden Mittelwerte nur ca. 15% (von 85% bei 0,1 μM zu 70% bei 0,2 μM). Demnach bedarf es für die Dissoziation des 16/23 Proteins vom Rezeptor höherer Konzentrationen an TatA, als für die eigentliche Translokation des Passagierproteins über die Thylakoidmembran. Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz im TatA-Bedarf wird in Abschnitt 3.3.2 diskutiert.

3 Diskussion

3.1 Zur Membraninteraktion des 16/23 Proteins

3.1.1 Membraninsertion versus Membranassoziation: Topologiestudien zum Ti-1

In Schlesier und Klösgen, 2010 konnte gezeigt werden, dass das thermolysinresistente Fragment des frühen Translokationsintermediats 1 (Ti-1) sowohl das hydrophobe Tat-Signalpeptid als auch weite Bereiche des N-Terminus vom reifen Teil des chimären 16/23 Proteins beinhaltet. Da der N-Terminus laut der Röntgenkristallstruktur des 23 kDa Proteins aus Spinat (Kopecky *et al.*, 2012) eine amphipathische α -Helix zeigt, die über einen flexiblen *loop* mit dem restlichen, hauptsächlich aus einem β -Faltblatt bestehenden, reifen Protein verbunden ist, wurde vermutet, dass dieser an der Membraninteraktion des Vorläuferproteins beteiligt ist (Schlesier und Klösgen, 2010). In einem solchen Szenario könnte, die amphipathische Helix zusammen mit der hydrophoben Domäne des 16 kDa Tat-Signalpeptids, die eine α -helikale Struktur bei der Interaktion mit Membranen annimmt (Kerth *et al.*, 2012), zu einer konzertierten Insertion dieses Proteinbereiches führen. Eine solche Insertion würde jedoch hierbei die *trans*-orientierte Translokation eines ca. 70 Aminosäure langen hydrophilen *loops* zwischen beiden Transmembranbereichen erfordern. Zwar ist bekannt, dass einige Proteine wie das CF₀II Protein der chloroplastidären ATP-Synthase mit zwei Transmembranbereichen in die Thylakoidmembran inserieren, so dass der sie verbindende *loop* ins Thylakoidlumen transloziert wird (Michl *et al.*, 1994), jedoch besteht dieser hydrophile Bereich aus nur wenigen negativ geladenen Aminosäuren, die dessen Lokalisierung auf der positiv geladenen *trans*-Seite der Membran begünstigen. Dass auch andere Tat-Substrate als das 16/23 Protein in der Lage sind spontan in die Membran zu inserieren, so dass sowohl der N- als auch der C-Terminus *cis*-membranseitig exponiert vorliegen, konnte erst kürzlich anhand des bakteriellen Proteins SufI in *E. coli* gezeigt werden (Karlsson *et al.*, 2012). Wie beim 16/23 Protein lässt sich auch beim Tat-abhängigen Proteintransport von einer Mutante des SufI Proteins ein frühes Translokationsintermediat nachweisen. Mittels Antikörpernachweis eines FLAG-*tags*, der zwischen beiden Transmembranbereichen des bakteriellen Proteins eingefügt wurde, konnte gezeigt werden, dass es durchaus zu einer periplasmatischen Exposition dieses Bereiches kommt. Dennoch sei auch hier angemerkt, dass der eingefügte *tag* ebenfalls aus relativ wenigen polaren Aminosäuren besteht, die sicherlich einer Translokation dieses Bereiches förderlich sind. Demnach bleibt die Frage bestehen, ob auch das unveränderte SufI Protein in der Lage ist in die Membran zu inserieren. Neben diesen bisher aufgeführten Studien zur spontanen Membraninsertion von Proteinen, die eine Translokation von eher kurzen, geladenen *loop*-Bereichen beschreiben, konnten Brambillasca *et al.*, 2006 anhand von Derivaten des *tail anchored* (TA) Proteins Cytochrom b(5) zeigen, dass bis zu 85 Reste lange Domänen verschiedener Sequenzen und Ladungen C-terminal von der

Transmembrandomäne des Cytochrom b(5) spontan posttranslational in Mikrosomen- und Lipidvesikel transloziert werden. Demnach besteht auch für den hydrophilen Bereich zwischen den beiden vorhergesagten Membransegmenten im Ti-1 Fragment des 16/23 Proteins die Möglichkeit, dass dieser trotz seiner Länge über die Membran in das Thylakoidlumen transloziert werden kann.

Da jedoch schon in früheren Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass eine gewisse Anzahl an thermolysingeschützten Resten des Ti-1 Fragments mittels anderer Proteasen wie beispielsweise Proteinase K abgespalten werden kann (Hou *et al.*, 2006), ließ sich eine stromale Exposition eines weitaus größeren Bereichs des Fragments vermuten, der allein durch den Einsatz von Proteasen nicht erfasst werden kann. Zur genaueren Bestimmung des stromal exponierten Bereichs wurden deshalb SCAM-Analysen unter Verwendung von thiolreaktiven Reagenzien unterschiedlicher Größe verwendet. Wie im Abschnitt 2.2.3 beschrieben, zeigen die SCAM-Analysen insbesondere unter Verwendung von MalPEG₅₀₀₀ im Gegensatz zum proteolytischen Verdau, dass sich durchaus ein Großteil des proteaseresistenten Ti-1 Fragments noch auf der stromalen Seite befindet. So scheinen ausschließlich Reste, die sich unmittelbar hinter der TPP-Spaltstelle im reifen Proteinteil befinden (siehe Mutante G93C), mittels des thiolreaktiven Reagens nicht modifiziert zu werden. Obwohl in ersten Untersuchungen sich auch das im Signalpeptid eingeführte Cystein in Position 74 einer Modifizierung entzog, zeigte sich jedoch bei der Wiederholung der Modifizierungsexperimente mit der S74C Mutante, dass diese durchaus, wenn auch nur schwach, mittels MalPEG₅₀₀₀ modifizierbar ist. Dies ist insofern überraschend, da angenommen wurde, dass zumindest der hydrophobe Bereich des Signalpeptids vollständig in die Lipiddoppelschicht eingebettet wird.

Da sowohl Reste innerhalb des amphipathischen Helix-Bereichs im reifen Proteinteil (Positionen 159 und 165) als auch N-terminal von diesem (Positionen 115 und 153) signifikant modifiziert werden konnten, erscheint es eher unwahrscheinlich, dass die amphipathische α -Helix während der Membraninteraktion des 16/23 Proteins als zweites Transmembransegment in die Lipiddoppelschicht inseriert. Aufgrund der ausbleibenden Modifikation des Restes an Position 93 besteht jedoch noch die Möglichkeit, dass der membraneingebettete bzw. inserierte Bereich kleiner ist als ursprünglich vermutet. Demnach könnte man von einem wesentlich kürzeren hydrophilen *loop* sowie von einem Transmembranbereich ausgehen, der weiter N-terminal von der amphipathischen Helix gelegen ist. Geht man davon aus, dass das Lysin am Ende des hydrophoben Bereichs des Signalpeptids (Position 79) das Lumen erreicht, so könnte sich ein zweiter Transmembranbereich nur zwischen den Positionen 79 und 115 befinden. Da ein Transmembransegment für das Durchspannen einer Membran ca. 15-25 Aminosäuren benötigt (zusammengefasst in Rath und Deber, 2012), könnte ein luminal exponierter *loop* des Ti-1 immer noch eine Länge von über 20 Aminosäuren besitzen. Dennoch ergaben

Insertionsexperimente unter Verwendung von reagensbeladenen Lipidvesikeln keinerlei Evidenz für einen vollständigen Insertionsprozess mit einhergehender Translokation eines hydrophilen *loop*-Bereichs über die Vesikelmembran. Wobei diese Experimente aufgrund der parallel durchgeführten Kontrollexperimente mit Cysteinmutanten des CF₀II Proteins durchaus zur Diskussion stehen.

Obwohl in zahlreichen Arbeiten gezeigt werden konnte, dass das CF₀II Protein mittels einer „horse shoe“ Konformation spontan in die Membran inseriert, so dass ein kurzer hydrophiler *loop* auf die *trans*-Seite transloziert wird und dies die TPP-Abspaltung des Transitpeptids ermöglicht (Michl *et al.*, 1994, 1999), konnte keine der beiden eingesetzten Cysteinmutanten des Proteins durch eingeschlossenes MalPEG₅₀₀₀ oder EGFP-SMCC modifiziert werden. Da selbst nach Solubilisierung der Vesikelmembranen durch Zugabe von Triton X-100 und der damit einhergehenden Reagensfreisetzung keine Modifikation nachweisbar war, lässt sich vermuten, dass im Verlauf der Liposomenherstellung zu wenig Reagens eingeschlossen wird. Gründe hierfür könnten unter anderem in der Einschlussprozedur, die mehrere Gefrier-Tau-Zyklen umfasst, oder im physikochemischen Verhalten des Reagens liegen. So ist unter anderem bekannt, dass die Einschlusseffizienz von niedermolekularen Substanzen, aber auch von Proteinen in artifizielle Vesikel stark variiert und dabei in Abhängigkeit von der Lipidzusammensetzung und Einschlussprozedur zwischen 10 bis 50% betragen kann (Walde und Ichikawa, 2001; Colletier *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2012). Für MalPEG₅₀₀₀ konnte gezeigt werden, dass die Bedingungen der Einschlussprozedur nicht zu einer Inaktivierung des Reagens führen. Jedoch lässt sich nicht ausschließen, dass die Polyethylenkette den Einschluss des gesamten Reagens durch hydrophobe Interaktionen mit den Lipiden während der Liposomenherstellung erschwert. Im Fall des EGFP-SMCC (Emal), konnte zumindest rein optisch auf dessen effizienten Einschluss in die Liposomen geschlossen werden. Dennoch könnte die fehlende Modifizierung der eingesetzten Cysteinmutanten des 16/23 Proteins in Lösung darauf hindeuten, dass die *crosslinker*-Länge des Emal von ca. 8 Å zu kurz sein könnte, um effizient an die einzelnen Cysteinderivate kovalent zu binden.

Basierend auf den beschriebenen SCAM-Experimenten zur Topologiebestimmung des Ti-1 lässt sich konstatieren, dass schon allein die Analyse der lumenal eingeschlossenen thiolreaktiven Reagenzien hinsichtlich ihrer verbleibenden Funktionalität eine beträchtliche Herausforderung darstellt. Aus diesem Grund könnte neben dem Einschluss von thiolreaktiven Reagenzien in artifizielle Vesikel, auch alternativ der Einsatz von proteasebeladenen Liposomen zur Bestimmung der Ti-1 Membrantopologie in Betracht gezogen werden. Demnach könnten nach erfolgreichem Einschluss einer aktiven Protease wie α -Chymotrypsin die beladenen Vesikel in Liposomeninsertionsexperimenten mit dem 16/23 Protein analysiert werden. Falls nach erfolgter Membraninsertion das Protein einen lumenalen *loop* aufweist, welcher die jeweilige Proteaseschnittstelle beinhaltet, sollte es zu einer proteolytischen

Spaltung des Vorläuferproteins kommen. Im Zuge dieser Arbeit war es bereits möglich eine Methode zum Einschluss von aktivem α -Chymotrypsin in Liposomen zu etablieren, wobei die Prozedur der von Walde und Marzetta (1998) beschriebenen folgte.

Der Vorteil bei diesem experimentellen Ansatz liegt insbesondere darin, dass die hydrolytische Aktivität der Protease nach erfolgtem Einschluss mittels externer Zugabe von Bz-Tyr-pNA, einem membrangängigen Substrat von α -Chymotrypsin, über längere Zeiträume detektiert werden kann. In ersten Experimenten bestätigte die kontinuierliche Freisetzung von *p*-Nitroanilin, die mittels Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 410 nm für verschiedene Zeitpunkte gemessen werden konnte, eindeutig eine vorhandene Proteaseaktivität des eingeschlossenen Enzyms (Abb.21A). Um auszuschließen, dass die gemessene katalytische Aktivität nicht von bereits freigesetztem Enzym, sondern ausschließlich von dem eingeschlossenen α -Chymotrypsin stammt, wurde das Experiment durch die Zugabe des membranundurchlässigen Substrates Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA wiederholt. Im Gegensatz zu Bz-Tyr-pNA ist dieses Substrat nicht in der Lage, in das Vesikellumen zu diffundieren und sollte demnach auch nicht durch die Protease gespalten werden.

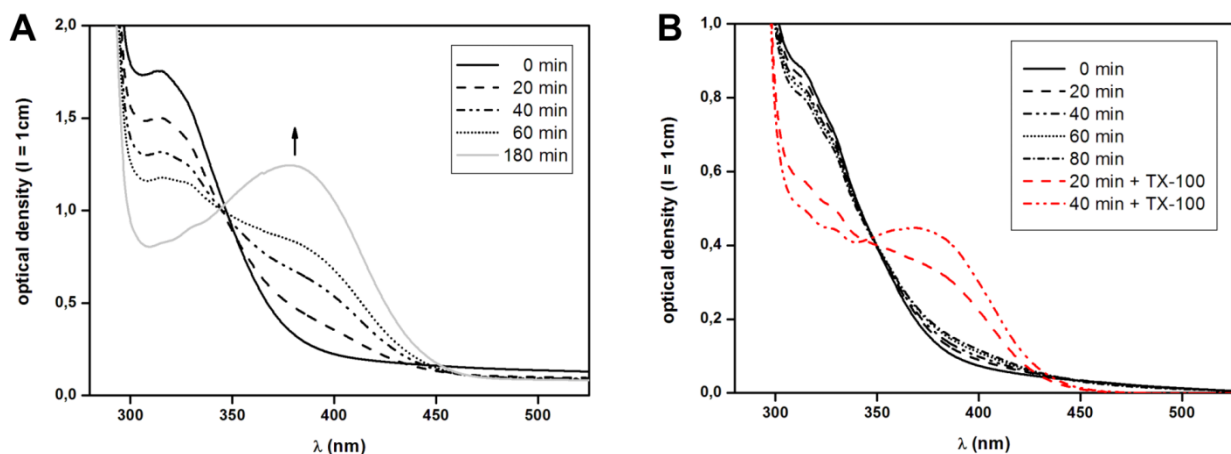


Abb.21 Spektroskopischer Nachweis des effizienten Einschlusses von aktivem α -Chymotrypsin in Lipidvesikel. (A) Kinetik der Freisetzung von *p*-Nitroanilin nach externer Zugabe und anschließender Hydrolyse des membranpermeablen Substrats Bz-Tyr-pNA in Tris-Puffer (pH 7.0) bei 25°C. Der Pfeil verweist auf den charakteristischen Anstieg des 410 nm Wertes im Zuge der *p*-Nitroanilin-Freisetzung. **(B)** Kinetik zur Hydrolyse des membranimpermeablen Substrates Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA in Abwesenheit von Detergens (*schwarze Kurven*) und nach externer Zugabe von Triton X-100 (*TX-100; rote Kurven*).

Wie in Abbildung 21B zu erkennen, konnte selbst nach langen Inkubationszeiten von über einer Stunde keine signifikante Spaltung des membranundurchlässigen Substrates nachgewiesen werden. Erst die Solubilisierung der Vesikel durch Zugabe von Triton X-100 führte zu einem signifikanten Anstieg in der *p*-Nitroanilin-Freisetzung. Zusammengefasst bestätigen diese vorläufigen Experimente den effektiven Einschluss von aktivem α -Chymotrypsin in Lipidvesikel. Demnach könnten diese enzymbeladenen Liposomen in weiterführenden Insertionsexperimenten unter Verwendung des 16/23 Proteins als auch des

Kontrollproteins CF₀II eingesetzt werden und somit weitere Aufschlüsse über die Existenz von luminal exponierten *loops* liefern.

Obwohl aufgrund der zur Zeit noch nicht ausgereiften Insertionsexperimente mit eingeschlossenen Reagenzien und Enzymen keine eindeutige Aussagen zu der Existenz einer luminal exponierten *loop*-Struktur im Ti-1 gemacht werden können, deuten doch die entsprechenden Experimente unter Anwesenheit von extern zugegebenen thiolreaktiven Substanzen eher auf eine stromale Lokalisierung der Reste im Ti-1 Fragment hin. Da jedoch nicht alle Positionen gleichermaßen modifiziert werden (siehe Position 74 und 93), liegt die Vermutung nahe, dass das Protein zumindest partiell in die Membran inseriert, wenn auch eine bloße Membranassoziation, die zu einer partiell geschützten Konformation führt, derzeit nicht ausgeschlossen werden kann. Zur besseren Unterscheidung dieser beiden Möglichkeiten, könnten Tryptophanfluoreszenzmessungen wie in Clayton und Sawyer (2002) zusammengefasst durchgeführt werden. Dieser Ansatz beruht auf der Tatsache, dass Tryptophanreste innerhalb eines Proteins einen Anstieg in ihrer relativen Fluoreszenzintensität sowie eine Blauverschiebung in ihrem Wellenlängenmaximum im Fluoreszenzspektrum aufweisen, wenn diese innerhalb einer Lipiddoppelschicht lokalisiert sind (Le Guernevé *et al.*, 1998). Durch das Einfügen von einzelnen Tryptophanresten in mögliche Membraninteraktionsbereiche innerhalb des 16/23 Proteins wie der hydrophoben Domäne des Signalpeptids oder dem N-Terminus des reifen Proteinteils sollten Membraninsertionen der veränderten Positionen und der damit korrespondierende Proteinbereich mittels Fluoreszenzspektroskopie detektiert werden können.

3.1.2 Einfluss des Passagierproteins auf die Ausbildung des Ti-1

Auch wenn im Zuge dieser Arbeit die Topologie des 16/23 Proteins in Ti-1 Konformation noch nicht endgültig geklärt werden konnte, so zeigen doch die vorliegenden Daten, dass der N-Terminus des reifen Proteinteils an der Membraninteraktion beteiligt ist und somit die Frage aufgeworfen wird, inwiefern der Faltungszustand des 23 kDa Passagierproteins eine Rolle bei diesem Prozess spielt. Wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben, weist das *in vitro*-translatierte 23 kDa Protein aus Spinat unabhängig vom Transitpeptid eine kompakt gefaltete Struktur auf, so dass ein Großteil der Polypeptidkette gegenüber Trypsin resistent ist. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass diese Faltung nicht nur entscheidend für das Transportverhalten des gesamten Vorläuferproteins ist, sondern auch einen großen Einfluss auf dessen Membraninteraktionsverhalten hat. So ließen sich mittels Transport- und Insertionsexperimenten unter Verwendung von C-terminalen Deletionsmutanten keine Ti-1 Fragmentbanden detektieren. Im Zuge der Topologiestudien konnte jedoch auch gezeigt werden, dass eine einzelne Mutation in Position 106 des Proteins zu einer Inhibierung der

Membraninteraktion führt. Infolgedessen weist im Gegensatz zu allen anderen in dieser Arbeit beschriebenen Cysteinmutanten nur die G106C Mutante kein Ti-1 Fragment auf. In diesem Fall liegt die Erklärung nahe, dass diese Position möglicherweise als Bestandteil einer Transmembrandomäne oder eines teilweise membraninsetierten Proteinbereiches in einer hydrophoben Umgebung lokalisiert ist, sodass die Einführung einer polaren Seitengruppe letztendlich die Ausbildung des Ti-1 inhibiert.

Auch wenn diese Erklärung für das Verhalten der G106C Mutante plausibel erscheint, als schlüssige Begründung für das Fehlen einer Ti-1 Fragmentbande nach Substitution des Cystein 242 mit einem Serin kann sie wohl eher nicht angesehen werden. Obwohl diese Position am C-Terminus des reifen Proteinteils und somit relativ weit entfernt von den Resten des Ti-1 Fragmentes lokalisiert ist, zeigt die entsprechende C242S Mutante selbst nach Blockierung des Tat-abhängigen Proteintransports mittels Antikörper gegen TatA sowie im Verlauf von Insertionsexperimenten keinerlei Indizien für eine spontane Membraninteraktion (Abb.22A). Laut Röntgenkristallstruktur bilden die Aminosäuren 250 bis 266 eine C-terminale α -Helix, die wiederum im engen Kontakt zu einem β -Faltblatt steht, in dessen letzten Strang das Cystein positioniert ist (Kopecky *et al.*, 2012). Es wäre durchaus denkbar, dass schon der Austausch eines Sauerstoffatoms zu einem Schwefelatom in der Aminosäureseitenkette und die damit einhergehende Erhöhung des Atomradius zu einer Destabilisierung der gesamten Konformation des reifen Proteinteils führen. Für diese Annahme spricht, dass eine Trypsinbehandlung der *in vitro*-Translation der C242S Mutante im Gegensatz zum unveränderten 16/23 Protein kein proteasestabiles Fragment bei 20 kDa ergibt (Abb.22B). Es sei angemerkt, dass ein entsprechendes Experiment für die G106C Mutante bis dato nicht durchgeführt wurde und sich somit auch hier nicht gänzlich ausschließen lässt, dass diese Mutation die Faltung des Proteins beeinträchtigt. Obwohl sich für die C242S Mutante das Ergebnis der Trypsinbehandlung mit denen für die C-terminalen Deletionsmutanten Δ C20 und Δ C40 gleicht, verweisen entsprechende Thylakoidtransportexperimente dieser Mutante mit nachfolgender denaturierender sowie nativer gelelektrophoretischer Analyse auf einen weitaus geringeren Effekt bezüglich deren TatBC-Binde- und Transportverhaltens (Abb.22A,C). Ein ähnliches Verhalten hinsichtlich nicht nachweisbarer Membraninteraktion, aber dennoch signifikanter TatBC-Bindung, konnte im Falle der C-terminalen Deletionsmutanten nur für die kürzeren Varianten Δ C60 und Δ C88 gezeigt werden. Folgt man nun der Argumentation aus Schlesier und Klösgen (2014), dass eine Faltung insbesondere für große Tat-Passagierproteine nötig ist, um deren effiziente TatBC-Bindung zu ermöglichen, so lässt sich für die C242S Mutante zumindest eine partiell gefaltete Konformation annehmen. Dies würde dem Protein immer noch eine starke Bindung an den TatBC-Komplex mit einhergehender effektiver Translokation erlauben, auch wenn es zur Ti-1 Ausbildung nicht mehr befähigt ist.

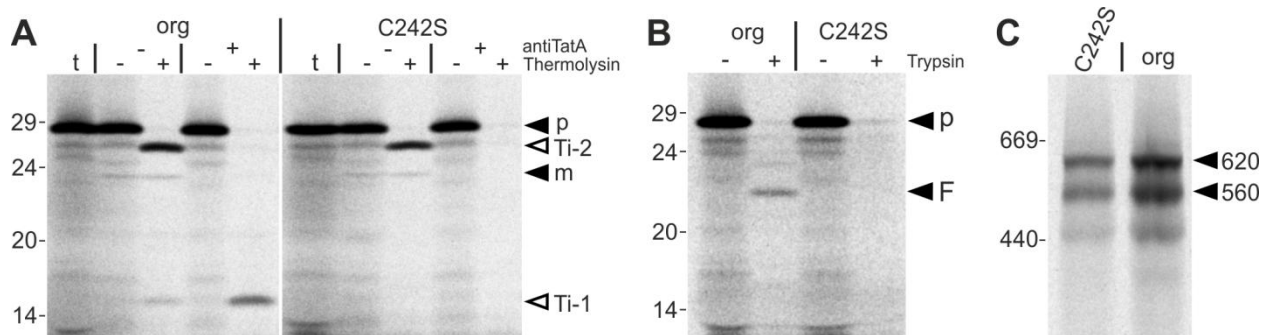


Abb.22 Untersuchungen zum Transport- und Membraninteraktionsverhalten der C-terminalen Substitutionsmutante 16/23C242S. (A) Thylakoidtransportexperimente mit dem originalen 16/23 Protein sowie mit dessen C-terminaler Substitutionsmutante C242S. Die entsprechenden *in vitro*-Translationen wurden jeweils für 10 min bei 25°C entweder mit unbehandelten oder antiTatA-vorbehandelten Thylakoiden inkubiert. (B) Je 2 µl der *in vitro*-Translationen vom originalen 16/23 Protein sowie von der C242S Mutante wurden für 30 min bei 4°C mit 3 µM Trypsin inkubiert. (C) Blue-Native-PAGE-Analyse der Thylakoidtransportexperimente mit antiTatA-vorbehandelten Thylakoiden aus (A). Für weitere Details, siehe Abb.14.

Zusammengenommen zeigen die beschriebenen Ergebnisse, dass die Membraninteraktion an sich keinen obligatorischen Schritt für den Tat-abhängigen Proteintransport darstellt. Dies korreliert mit der Tatsache, dass bis dato nur für einige wenige bakterielle und pflanzliche Proteine eine spontane Membranbindung nachgewiesen werden konnte (siehe hierzu Einleitung, Abschnitt 1.3). Darüber hinaus verdeutlichen sie jedoch, dass die Aminosäuren des thermolysinresistenten Bereichs des Ti-1 allein nicht in der Lage sind, dessen Ausbildung an der Membran zu fördern, sondern dass es vielmehr einer strikt gefalteten Konformation des Passagierproteins bedarf. Hierbei stellt sich die Frage, ob für die Membraninteraktion ausschließlich die Primärsequenz der Polypeptidkette des 23 kDa Proteins benötigt wird oder ob allein eine gefaltete Domäne, die C-terminal von den Aminosäuren des Ti-1 Fragments lokalisiert ist, für diesen Prozess ausreicht. Aufschluss darüber könnten beispielsweise Transport- und Insertionsexperimente mit einem Δ C88-EGFP Konstrukt geben.

Weiterhin bleibt zu klären, warum das Passagierprotein gefaltet sein muss, damit Ti-1 gebildet werden kann. Es lässt sich vermuten, dass das 16/23 Protein in oligomerer Form an die Membran bindet und dass dieser Prozess durch Interaktion der gefalteten Domänen gefördert bzw. ermöglicht wird. So konnten bereits Ma und Cline (2010) zeigen, dass mehrere Substrate mit eigenem Signalpeptid gleichzeitig mittels des Tat-Apparats unter oxidierenden Bedingungen über die Thylakoidmembran transportiert werden, auch wenn in ihren Studien keine spontane Membraninteraktion des von ihnen verwendeten Derivats des authentischen 16 kDa Proteins nachweisbar war. Ein detaillierterer Blick auf eine mögliche Oligomerisierung des 16/23 Proteins in Anwesenheit von Membranen könnte in Zukunft durch den Einsatz von bifunktionalen *crosslinkern* wie DSS (Disuccinimidylsuberat) oder DSG (Disuccinimidylglutarat) in Insertionsexperimenten erhalten werden.

3.2 Zur TatBC-Rezeptorbindung unterschiedlicher Tat-Substrate

3.2.1 Die TatBC-Bindung als entscheidender Schritt des Tat-abhängigen Proteintransports

Thylakoid-Transportexperimente mit den C-terminalen Deletionsmutanten des 16/23 Proteins zeigen, dass schon eine geringfügige Verkürzung des Passagierproteins zu einer drastischen Abnahme in der Transporteffizienz führt und dass dieser Effekt vor allem auf einer stark eingeschränkten TatBC-Bindung dieser minimal verkürzten Mutante beruht. Die proteolytische Degradation der entsprechenden Mutante mittels Trypsin lässt zudem darauf schließen, dass das verbliebende Passagierprotein im Gegensatz zum unveränderten Protein keine oder nur eine schwach gefaltete Konformation aufweist. Da aber mit weiterer Verkürzung des C-Terminus die TatBC-Bindungs- und Transporteffizienzen wieder zunehmen, obwohl keine der jeweiligen Mutanten eine Resistenz gegenüber Trypsin zeigt, lässt sich vermuten, dass eine kompakte Faltung des Passagierproteins keine notwendige Voraussetzung für beide Prozesse darstellt. Die schwache TatBC-Bindung der größeren Deletionsmutanten könnte dabei auf einer vermehrten Interaktion zwischen hydrophoben Bereichen des reifen Proteinteils und dem ebenfalls stark hydrophoben Signalpeptid beruhen, so dass Letzteres nicht mehr für die Bindung an den TatBC-Komplex zur Verfügung steht. Bei den kleineren Mutanten könnte sich die Wahrscheinlichkeit für diese Interaktion zwischen Signalpeptid und verbliebenem Passagier verringern, da weniger hydrophobe Anteile in der Polypeptidkette des reifen Proteins vorliegen sollten.

Dennoch bleibt anzumerken, dass eine Sensitivität gegenüber Trypsin allein sicherlich noch keine vollständige Aussage über die tatsächliche Konformation des jeweils verbliebenen Passagierproteins erlaubt. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass insbesondere die kürzeren C-terminalen Deletionsmutanten durchaus eine partielle Faltung einnehmen, die zwar das Protein nicht vor proteolytischer Degradation schützt, sich aber möglicherweise positiv auf dessen TatBC-Bindung und Transport auswirkt. Die nachgewiesene TatBC-Bindung des 16 kDa Transitpeptids bestätigt jedoch schon frühere Studien, die zeigen konnten, dass für eine Assoziation der Tat-Substrate an den TatBC-Rezeptor im Wesentlichen nur ein funktionelles Tat-Signalpeptid benötigt wird (Teter and Theg, 1998; Mori und Cline, 2002). Dennoch könnten die schwachen Signale der TatBC-Substratkomplexbanden bei Verwendung des Transitpeptids in *BN-PAGE*-Analysen darauf hindeuten, dass neben dem hydrophoben Signalpeptid auch das Passagierprotein an einer stabilen Bindung des Tat-Substrats an den TatBC-Rezeptor beteiligt ist. Die in Abschnitt 2.3.3 beschriebenen *chase*-Experimente zur Analyse der Dissoziationseffizienzen der einzelnen Deletionsmutanten zeigen zudem, dass das Leer-RTS allein zu einer deutlichen Dissoziation der kleinsten eingesetzten C-terminalen Mutanten von

den TatBC-Substratkomplexen führt, die sich nicht in einer Rekonstitution des Tat-Transports widerspiegelt. Mit zunehmender Verkürzung des C-Terminus erhöht sich zwar wieder die Fähigkeit der Mutanten an den TatBC-Rezeptor zu binden, jedoch scheint sich die Stabilität dieser Bindung eher zu verringern. Die beobachtete Dissoziation in Anwesenheit von Leer-RTS könnte dabei möglicherweise auf Salze oder Chaperon-Proteine, die im RTS vorhanden sind, zurückzuführen sein. Durch bevorzugte Erkennung und Bindung an entfaltete Bereiche könnten diese Chaperone die Entfernung der weniger stark TatBC-assoziierten Tat-Substrate begünstigen. Eine Ausnahme hiervon bildet die $\Delta C60$ Mutante, die hinsichtlich ihrer Stabilität am TatBC-Substratkomplex dem originalen 16/23 Protein gleicht. Möglicherweise nimmt dieses Protein eine Konformation an, die sich stabilisierend auf deren Bindung an den TatBC-Rezeptor auswirkt.

Neben einer RTS-bedingten Dissoziation, die vor allem auf die kürzeren Mutanten zutrifft, zeigen die gleichen *chase*-Experimente aber auch eine deutliche TatA-induzierte Entfernung aller verwendeten Tat-Substrate von den TatBC-Substratkomplexen. Die Effizienz dieser TatA-induzierten Dissoziation scheint bei weitem nicht so stark zwischen den einzelnen Proteinen zu variieren, wie deren TatBC-Bindungseffizienzen. Darüber hinaus verweisen erste vorläufige SDS-PAGE-Analysen solcher *chase*-Experimente, dass in Anwesenheit von TatA der Transport aller TatBC-gebundenen Substrate wieder rekonstituiert werden kann, wenn auch die $\Delta C40$ und $\Delta C88$ Mutanten im Vergleich zu den anderen Proteinen deutlich geringere Transporteffizienzen aufweisen (siehe Diskussion 3.3.3). Zusammengefasst könnten diese Daten darauf hinweisen, dass vor allem die Bindung an den TatBC-Rezeptorkomplex und weniger die TatA-abhängige Translokation abhängig von der Konformation des Passagierproteins ist. Diese Annahme könnte dabei mit molekularbiologischen Studien übereinstimmen, in denen unterschiedlich mutierte Tat-Translokasen in *E. coli* generiert wurden, die auch falschgefaltete oder ungefaltete Proteine als Tat-Substrate erkennen und über die Cytoplasmamembran transportieren (Rocco *et al.*, 2012). Dabei konnte gezeigt werden, dass vor allem Mutationen im TatBC-Rezeptor den Transport der falschgefalteten Substrate ermöglichen. Jedoch wurden auch einige wenige TatA Mutanten identifiziert, bei denen ebenso eine weniger stringente Ablehnung von falschgefalteten Tat-Substraten vorzuliegen scheint. Basierend auf ihren Ergebnissen vermuten die Autoren, dass die insbesondere für das bakterielle System oft beschriebene inhärente *quality control*-Funktion der Tat-Translokase gegenüber dem Faltungsstatus der zu transportierenden Tat-Substratproteine (DeLisa *et al.*, 2003; Palmer und Berks, 2012) hauptsächlich darin besteht, ob Substrat an den TatBC-Rezeptor binden kann oder nicht. Des Weiteren konnten bereits Richter *et al.* (2007) in *E. coli* zeigen, dass auch das bakterielle Tat-System wie das pflanzliche ohne Mutationen in den Translokaseuntereinheiten in der Lage ist, ein durch verhinderte Co-Faktor-Assemblierung entfaltetes Tat-Substrat zu transportieren. Zudem war es möglich, vollständig unstrukturierte

Tat-Substratproteine, bestehend aus einem Tat-Signalpeptid und repetitiven Einheiten von FG aus dem Hefe Nsp1p Kernporenprotein, mittels des Tat-Apparats zu transportieren, wobei die Effizienz des Transports dieser ungefalteten Passagierproteine mit zunehmender Länge schwächer wurde.

Dennoch deuten Studien von Musser und Theg (2000) darauf hin, dass neben der TatBC-Bindung auch der Translokationsschritt durch die Struktur des Passagierproteins beeinflusst werden könnte. So zeigen die Autoren, dass das von ihnen verwendete Avidin-gekoppelte 16 kDa Vorläuferprotein zwar an den TatBC-Rezeptor bindet, aber trotz Faltung dennoch nicht transportiert werden kann. Jedoch konnte anhand dieser Analysen nicht belegt werden, ob die TatA-Funktion durch das sperrige Tat-Substrat beeinträchtigt wird oder ob die Translokase generell nicht in der Lage ist die Substrat-Translokation zu vermitteln, unabhängig davon welche Komponente des Tat-Apparats für diesen Prozess zuständig ist. Demnach könnte man vermuten, dass der Tat-abhängige Translokationsprozess möglicherweise durch bestimmte Konformationen bzw. strukturelle Eigenschaften des Passagierproteins beeinträchtigt wird. Dies könnte erklären, warum beispielsweise das $\Delta C40$ Protein relativ ineffizient in Anwesenheit von TatA transloziert wird, obwohl es eine stärkere TatBC-Bindung als die $\Delta C20$ Mutante aufweist.

3.2.2 Stöchiometrische Zusammensetzung des TatBC-Substratkomplexes

In Abschnitt 2.3.3 wurde beschrieben, dass die Bindung von unterschiedlich großen Tat-Substraten an den TatBC-Rezeptor zu einem deutlichen *shift* im Laufverhalten der TatBC-Substratkomplexbanden bei 560 und 620 kDa im Verlauf einer *BN*-PAGE führt. Unter Verwendung des 8 kDa großen Transitpeptids des 16 kDa Proteins sowie der etwas größeren $\Delta C88$ Mutante (18 kDa) konnte durch Vergleich mit dem 16/23 Protein (29 kDa) gezeigt werden, dass dieser *shift* annähernd der Größe des jeweils vorhandenen bzw. nicht vorhandenen Passagierproteins entspricht. Zudem konnte neben den bereits beschriebenen oberen TatBC-Komplexen noch ein weiterer Komplex bei ca. 400 kDa detektiert werden, der im Vergleich zu den beiden anderen Komplexen nur eine sehr schwache Bandenintensität zeigt und sich nicht immer bei allen durchgeführten *BN*-PAGE-Analysen nachweisen ließ. Da diese Bande ebenso in Abhängigkeit vom Substrat einen deutlichen *shift* aufweist, kann davon ausgegangen werden, dass deren Detektion auf die Bindung des Vorläuferproteins zurückzuführen ist und nicht auf eine unspezifische Markierung mittels radioaktiven Methionins. Bereits frühere Studien von Jakob *et al.* (2009) wiesen mittels *BN*-PAGE- und *Western-blot*-Analysen von *Arabidopsis thaliana*-Thylakoiden auf vier TatBC-Komplexe, von denen jedoch nur die beiden größten einen schwachen *shift* nach Substratzugabe zeigen. Auch wenn die in dieser Arbeit angeführten Experimente mit Erbsenthylakoiden durchgeführt wurden, liegt es nahe, dass der detektierte dritte Komplex mit einem von den unteren der vier in Jakob *et al.*

(2009) beschriebenen TatBC-Komplexe übereinstimmen könnte. Die schwache Bandenintensität des dritten Komplexes im Autoradiogramm sowie die deutlichen Westernsignale der untersten Komplexbanden in Arabidopsis, lassen darauf schließen, dass im Allgemeinen nur wenig Tat-Substrat an diesen TatBC-Komplex gebunden vorliegt, sodass die in Jakob *et al.* (2009) durchgeführten *Western-blot*-Analysen möglicherweise nicht sensitiv genug sind, um einen substratinduzierten *shift* an diesen Komplexen zu detektieren.

Insbesondere die Veränderungen im Laufverhalten der TatBC-Substratkomplexe in Abhängigkeit von der Größe des Tat-Substrats deuten stark darauf hin, dass jeder dieser im nativen Gel detektierten Komplexe nur jeweils ein radioaktives Protein gebunden hat. Möglicherweise könnte es sich bei diesen detektierten Komplexen zwischen 620 und 400 kDa um stabile Dissoziationsprodukte eines wesentlich größeren Rezeptor-Substratkomplexes handeln, die durch dessen Zerfall unter den gegebenen Bedingungen der Membransolubilisierung und *BN*-PAGE entstehen. Demnach könnten an diesen großen TatBC-Rezeptorkomplex mehrere Substratproteine gleichzeitig gebunden vorliegen. Dieses Szenario steht im Einklang mit früheren Studien unter Verwendung von Erbsenthylakoiden, in denen gezeigt werden konnte, dass durchaus mehrere Tat-Substratproteine gleichzeitig an TatBC binden und in Anwesenheit von funktionellem TatA auch transportiert werden können (Ma und Cline, 2010). Darüber hinaus verweisen neueste Quantifizierungsdaten zur Stöchiometrie der Tat-Untereinheiten in Pflanzen und Bakterien auf annähernd äquimolare Mengen an TatB und TatC (Jakob *et al.*, 2009; Celedon und Cline, 2012). In weiteren Studien wurde postuliert, dass ein funktioneller TatBC-Rezeptorkomplex aus 7-8 TatB:TatC-Protomeren bestehen könnte (Tarry *et al.*, 2009; Ma und Cline, 2010). Weiterhin wurde vermutet, dass in diesem heptameren bzw. oktameren Komplex an jedem TatB:TatC-Protomer ein Substrat gebunden vorliegt (Celedon und Cline, 2012).

Geht man davon aus, dass auch die in dieser Arbeit nachgewiesenen TatBC-Substratkomplexe in Erbse jeweils nur aus den Tat-Untereinheiten TatB (19 kDa) und TatC (33 kDa) sowie aus nur einem Substratprotein wie das 16/23 Protein (29 kDa) bestehen, so erhält man beispielsweise im Falle des 560 kDa Komplexes nach Abzug des Molekulargewichts des gebundenen Substrats einen etwa 530 kDa großen TatBC-Komplex. Legt man jedoch diesem Wert ein 1:1 Verhältnis von TatB zu TatC zugrunde und teilt diesen durch die Summe der Molekulargewichte der beiden Tat-Untereinheiten, so ergibt sich ein Endergebnis von ca. 10 TatB:TatC-Protomeren. Würden nun die beiden obersten Komplexe bei 620 und 560 kDa zu einem annähernd 1,2 MDa großen Komplex zusammengefasst, so müsste dieser aus 21 bis 22 TatB:TatC-Protomeren bestehen und nur zwei gebundene 16/23 Proteine beinhalten. Tarry *et al.* (2009) konnten mittels Einzelpartikelelektronenmikroskopie von isolierten TatBC-Substratkomplexen aus *E. coli* ebenfalls nur maximal zwei gebundene SufI Proteine pro Komplex nachweisen. Die Autoren vermuten, dass die von ihnen untersuchten TatBC-

Komplexe der Größe nach Heptameren entsprechen. Obwohl insbesondere in Bakterien eine Assoziation des TatA-Proteins auch im Zuge von nativen Gelelektrophoresemethoden an den TatBC-Substratkomplexen gezeigt werden konnte (Oates *et al.*, 2005), war es bis dato nicht möglich, mit den in der Arbeitsgruppe durchgeführten *BN*-PAGE-Analysen, eine solche TatA-Assoziation auch an den pflanzlichen Komplexen nachzuweisen (Jakob *et al.*, 2009 und nicht gezeigte Daten). Somit lässt sich ausschließen, dass das TatA-Protein durch Assoziation an die TatBC-Substratkomplexe am ermittelten Laufverhalten der drei Komplexbanden aus Erbsenthylakoiden beteiligt ist.

Weiteren Aufschluss darüber, ob die mittels *BN*-PAGE detektierten Komplexe tatsächlich Dissoziationsprodukte eines wesentlich größeren TatBC-Substratkomplexes darstellen, könnte beispielsweise durch eine Modifizierung der Membransolubilisierungsprozedur oder aber auch durch Verwendung alternativer Gelsysteme erlangt werden. So wird unter anderem vermutet, dass sich der in der *BN*-PAGE verwendete Farbstoff und Ladungsträger Coomassie-Blau G250 negativ auf die Stabilität größerer Membranproteinkomplexe auswirkt (Ladig *et al.*, 2011). Dieses Problem könnte jedoch möglicherweise umgangen werden, indem beispielsweise der Coomassie-Farbstoff im Zuge einer *high resolution clear native (hrCM)*-PAGE (Wittig *et al.*, 2007) oder auch *histidine- and deoxycholate based native (HDM)*-PAGE (Ladig *et al.*, 2011) durch eine farblose Mischung aus anionischen und neutralen Detergenzien ersetzt wird.

3.3 Zur Rolle des TatA Proteins während des Translokations-schrittes

3.3.1 Rekonstitution des Tat-Transports mittels überexprimiertem und gereinigtem TatA

Mit Hilfe des chimären 16/23 Proteins wurde in dieser Arbeit neben der Untersuchung des Membraninteraktionsverhaltens und des Einflusses der Konformation des Passagierproteins auf den Tat-Transport auch die quantitative Bestimmung des TatA-Bedarfs für die Translokation durchgeführt. Hierbei kam für Letzteres erstmals heterolog überexprimiertes und aufgereinigtes TatA in funktioneller Form sowie in genau definierten Konzentrationen zum Einsatz (Hauer *et al.*, 2013). Dabei konnte gezeigt werden, dass dieses aufgereinigte TatA aus *Arabidopsis thaliana* in gleichem Maße wie *in vitro*-translatiertes TatA (Dabney-Smith *et al.*, 2003; Frielingsdorf *et al.*, 2008) in der Lage ist, den Tat-abhängigen Proteintransport von transportinkompetenten Thylakoiden zu rekonstituieren. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass weitere Komponenten wie Chaperonproteine oder Salze, die möglicherweise in den *in vitro*-Ansätzen zur Synthese von TatA in unbekannter Menge vorliegen, den Tat-Transport begünstigen oder wie vormals schon gezeigt gar negativ (Frielingsdorf *et al.*, 2008). Der Fakt, dass *Arabidopsis thaliana*-TatA in der Lage ist, den Tat-Transport an Erbsen-

Thylakoidmembranen zu rekonstituieren, spricht für eine starke Konservierung der Tat-Komponenten zumindest unter den dikotyledonen Pflanzen. Dies steht im Einklang mit Untersuchungen im bakteriellen System, in dem gezeigt werden konnte, dass die Tat-Untereinheiten TatAd und TatCd aus dem gram-positiven Bakterium *Bacillus subtilis* den Substrattransport in Tat-defizienten *E. coli*-Stämmen komplementieren (Barnett *et al.*, 2008). Dennoch bleibt die Frage offen, ob auch eine Komplementierung des Tat-Transports zwischen evolutionär weiter entfernt liegenden Spezies möglich ist. So könnten weiterführende Experimente klären, ob beispielsweise TatA Proteine aus niederen Pflanzen, Cyanobakterien oder gar aus den Domänen der Bakterien und Archaeen auch in höheren Pflanzen funktionell sind.

Wie schon erwähnt, ermöglichte der erstmalige Einsatz von überexprimiertem TatA eine genaue Quantifizierung der Menge dieses Proteins, die für die Tat-abhängige Translokation des 16/23 Proteins über die Thylakoidmembran benötigt wird. Überraschenderweise entspricht die quantifizierte TatA-Konzentration, die zur vollständigen Rekonstitution des 16/23 Proteintransports führt (0,15 μM), annähernd der Menge an membrangebundenen TatA (0,17 μM). Da eine Kompetition des extern zugegebenen TatA Proteins mit dem bereits gebundenem Antikörper ausgeschlossen werden kann und die zu beobachtende Transportaktivität somit ausschließlich auf das überexprimierte Protein zurückzuführen ist, stellt sich Frage nach dessen tatsächlichen Wirkungsort. Aufgrund der mittels quantitativer Western-*blot*-Analysen ermittelten TatA-Mengen in der Thylakoidmembran könnte man davon ausgehen, dass das extern zugegebene TatA zunächst in die Membran inseriert und erst dort seine Funktion erfüllt. Dies würde sicherlich eine Vorinkubation der transportinkompetenten Thylakoide mit TatA notwendig machen, was jedoch in dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte. Entweder inseriert TatA so schnell in die Membran, dass dieser Prozess unter den gewählten Vorinkubationsbedingungen nicht nachweisbar ist, oder aber das Protein verbleibt in der löslichen Phase und vermittelt von dort aus den Transport. Letzteres würde mit der Tatsache übereinstimmen, dass sowohl im isolierten Stroma von Erbsenchloroplasten (Frielingsdorf *et al.*, 2008) als auch im Cytosol von gram-negativen und gram-positiven Bakterien (Pop *et al.*, 2003; Westermann *et al.*, 2006; Berthelmann *et al.*, 2008) funktionelles TatA nachgewiesen werden konnte. Hierbei bleibt zu untersuchen, wie und in welcher Form das TatA Protein aus der löslichen Phase heraus den Transport von Tat-Substraten vermitteln könnte. Unter anderem wäre denkbar, dass TatA mit potentiellen Tat-Substratproteinen schon im Stroma interagiert und deren Translokation über eine nachfolgende Assoziation mit dem TatBC-Rezeptorkomplex ermöglicht. So vermuteten bereits Pop *et al.* (2003), basierend auf einer effektiven TatAd-Coimmunopräzipitation des Vorläuferproteins prePhoD in *Bacillus subtilis*, dass das TatAd vor der Membraninsertion durch spezifische Bindung an ein funktionelles Tat-Signalpeptid mit dem Substratprotein interagiert und somit bei dessen

zielgerichteter Weiterleitung zur Translokation assistiert. Ein solches Verhalten könnte dabei in Analogie zum peroxisomalen Proteintransport stehen, bei dem Pex5p im Cytosol gefaltete *cargo*-Proteine mit C-terminalen PTS (*peroxisome targeting signal*)-Sequenzen bindet und zum sogenannten *docking*-Komplex geleitet, wo es nachfolgend den Translokationsprozess vermittelt (zusammengefasst in Hasan *et al.*, 2013). Dennoch bleibt anzumerken, dass bis dato in keinerlei Studien eine ähnliche Interaktion zwischen chloroplastidären TatA und Substratproteinen im Stroma nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus belegen Studien von Mori und Cline (2002), als auch entsprechende *BN*-PAGE-Analysen in dieser Arbeit, dass das Substratprotein in Abwesenheit von funktionellem TatA effektiv an den TatBC-Komplex binden kann und, dass diese über das Tat-Signalpeptid vermittelte Bindung gar eine Voraussetzung für die nachfolgende TatA-Assoziation darstellt.

Die bisher in der Literatur aufgeführten *crosslinking*-Experimente belegen zwar einen engen Kontakt zwischen TatA und dem ternären TatBC-Substratkomplex, jedoch können diese keinen direkten Hinweis geben, ob es aus dem Stroma oder doch eher aus der Membran kommend an den Komplex bindet. So könnte durchaus die Möglichkeit bestehen, dass TatA direkt von der löslichen Phase aus mit dem ternären Komplex assoziiert und den anschließenden Translokationsschritt vermittelt. Der Transportprozess könnte dabei unter anderem die Ausbildung einer an das Passagierprotein angepassten TatA-Pore am ternären TatBC-Substratkomplex umfassen. So konnte gezeigt werden, dass TatA sowohl in angereichertem Stroma (Daten nicht gezeigt) als auch im bakteriellen Cytoplasma (Berthelmann *et al.*, 2008) in der Lage ist, hochmolekulare Oligomerstrukturen auszubilden. Jedoch könnte der in Hauer *et al.* (2013) nachgewiesene und diskutierte kooperative Effekt des TatA Proteins auf den Thylakoidtransport des 16/23 Proteins durchaus auch einen Hinweis auf einen allosterischen Enzymkomplex geben, bei dem TatA als eine Art stromaler Co-Faktor die Translokation des Substrats über den TatBC-Komplex vermittelt. Nach dieser Hypothese würde die allosterische Bindung von TatA zu Konformationsänderungen in den TatBC-Untereinheiten und somit zu einer Umorientierung bzw. Aktivierung im TatBC-Rezeptorkomplex führen, was wiederum die Translokation des gefalteten Passagierproteins zur Folge hätte.

Weitere Aufklärung darüber, ob TatA als Pore oder als eine Art Co-Faktor die Translokation von Tat-Substratproteinen vermittelt, könnten beispielsweise Analysen zur exakten Stöchiometrie der einzelnen Tat-Komponenten liefern. Während Einigkeit darüber besteht, dass TatB und TatC sowohl in bakteriellen als auch in pflanzlichen Systemen in äquimolaren Mengen vorliegen, steht der tatsächliche TatA-Gehalt zur Diskussion (Jakob *et al.*, 2009). So lassen bisherige Studien vor allem bei Bakterien aber auch zum Teil in Erbse einen Überschuss an TatA gegenüber den anderen Untereinheiten vermuten (Jack *et al.*, 2001; Celedon and Cline, 2012), wohingegen quantitative *Western-blot*-Analysen in *Arabidopsis thaliana* eher auf substöchiometrische Mengen dieses Proteins hinweisen (Jakob *et*

al., 2009). Inwiefern hier Spezies-spezifische Eigenarten oder Unterschiede in den jeweilig verwendeten Quantifizierungsmethoden als Ursachen für diese Diskrepanz herangezogen werden können, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen. Des Weiteren könnte insbesondere die Quantifizierung des TatA-Bedarfs für den Transport weiterer Tat-Substrate, die sich in der Größe ihrer jeweiligen Passagierproteine deutlich voneinander unterscheiden, wertvolle Einblicke in die Funktionsweise des TatA Proteins geben. So wäre es interessant zu sehen, ob der Bedarf an TatA mit der Größe des Passagierproteins steigt oder ob für die Translokation sämtlicher Tat-Substrate stets annähernd die gleiche TatA-Konzentration benötigt wird. Beispielsweise würde man bei der Ausbildung einer an die Substratgröße angepassten TatA-Pore eher von einer direkten Korrelation zwischen TatA-Konzentration und Passagiergröße ausgehen, als es bei einer durch TatA-induzierten und über den TatBC-Komplex vermittelten Translokation der Fall wäre.

3.3.2 TatA-induzierte Dissoziation des Substrats vom TatBC-Komplex

Im Zuge dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass die Anwesenheit von TatA zu einer Dissoziation unterschiedlich großer Tat-Substrate vom TatBC-Rezeptorkomplex führt (siehe Abschnitte 2.2.3 und 2.3.3). So verbleiben nach externer Zugabe von TatA und nachfolgender Inkubation der jeweiligen *chase*-Ansätze für 10 min im Licht durchschnittlich 10-20% Substrat an den Komplexen gebunden. Diese Ergebnisse zeigen, dass unter den gewählten Bedingungen die gleiche Menge an TatA in der Lage ist, in annähernd gleichem Umfang die Dissoziation von verschiedenen Tat-Substraten zu vermitteln. Es sei dennoch darauf hingewiesen, dass die entsprechenden Experimente mit *in vitro*-synthetisiertem TatA durchgeführt wurden. Auch wenn dessen tatsächliche Konzentration nicht genau bestimmt wurde, so ließen jedoch quantitative Vergleiche mit heterolog überexprimiertem und gereinigtem TatA ein Wert von annähernd 3 μM pro experimentellem Ansatz vermuten (Daten nicht gezeigt). Diese hohe TatA-Konzentration liegt bei weitem über der vor Kurzem bestimmten Menge, die für eine vollständige Rekonstitution des 16/23 Transports benötigt wird (0,15 μM , siehe Hauer *et al.*, 2013). Geht man jedoch davon aus, dass TatA eine dem Passagierprotein angepasste Translokationspore ausbildet, würde man bei den eingesetzten hohen TatA-Konzentrationen allgemein eine wesentliche höhere Dissoziationseffizienz der kleinsten Substrate vom TatBC-Rezeptor gegenüber den größeren bzw. längeren Passagierproteinen erwarten, was jedoch in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden konnte. Dennoch bedarf es weiterführender Arbeiten, um im Detail die Transport- und Dissoziationsraten von verschiedenen Proteinen in Anwesenheit unterschiedlicher TatA-Konzentrationen, wie schon für das 16/23 Protein gezeigt (Hauer *et al.*, 2013), zu quantifizieren.

Neben der bemerkenswert hohen Toleranz des TatA Proteins gegenüber verschiedenen Passagierproteinen hinsichtlich deren Dissoziationsverhaltens, deuten *Blue-Native*-PAGE-Analysen von *chase*-Experimenten mit dem 16 kDa Transitpeptid stark darauf hin, dass möglicherweise überhaupt kein Passagier für die TatA-Funktion benötigt wird (Abb.10B). Dies würde zumindest im Einklang mit früheren *crosslinking* Studien stehen, die zeigen konnten, dass es für eine Δ pH abhängige Bindung des TatA Proteins mit dem TatBC-Rezeptorkomplex nur der Anwesenheit von gebundenem Signalpeptid bedarf (Mori und Cline, 2002). Im Gegensatz dazu könnte sich jedoch die Annahme, dass TatA unabhängig von der Anwesenheit eines Passagierproteins seine Funktion ausübt, neuerlichen *crosslinking*-Experimenten widersprechen, die eine direkte Interaktion zwischen dem reifen Proteinteil des Tat-Substrats und TatA während des Tat-abhängigen Transports eines modifizierten 16 kDa Proteins verdeutlichen (Pal *et al.*, 2013). Dennoch bleibt bei diesen Studien die Frage bestehen, ob diese nachgewiesenen Interaktionen eine Voraussetzung für die Funktion des Tat-Transports sind oder nur die Folge eines temporären Kontaktes beider Proteine während ihrer Assoziation am TatBC-Komplex sind.

Auch wenn im Allgemeinen Transport und Dissoziation der Substrate miteinander in Korrelation stehen, so verweisen die Daten zur Quantifizierung der Dissoziation des 16/23 Proteins in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen an überexprimiertem TatA auf einen Unterschied hinsichtlich des TatA-Bedarfs für beide Prozesse (Abschnitt 2.3.3). Während im Zuge von Thylakoidtransportexperimenten eine vollständige Transportrekonstitution bereits bei einer TatA-Konzentration von 0,2 μ M nachgewiesen werden konnte, befindet sich laut *BN*-PAGE-Analysen der entsprechenden Transportansätze die Dissoziation des 16/23 Proteins vom TatBC-Komplex in diesem Konzentrationsbereich noch nicht in der Sättigung. Es scheint so, als ob mehr TatA benötigt wird, um das Substrat vom Komplex dissoziieren zu lassen als für dessen Translokation über die Thylakoidmembran. Die bereits erwähnte Dissoziation des 16 kDa Transitpeptids in Anwesenheit von *in vitro*-synthetisiertem TatA könnte die Vermutung nahe legen, dass die Dissoziation der Substrate vom TatBC-Rezeptorkomplex ein von der eigentlichen Translokation unabhängiger Prozess ist. So wäre denkbar, dass die Dissoziation erst nach der eigentlichen Translokation erfolgt und dass zur Ausführung beider Prozesse TatA benötigt wird. Dabei könnte eine erneute Bindung des Substrats und dessen Translokation direkt abhängig von der erfolgten Dissoziation des bereits translozierten Proteins sein. Da Gérard und Cline (2007) trotz lichtinduzierter kovalenter Verknüpfung des Tat-Signalpeptids eines photoreaktiven Derivats des 16 kDa Proteins mit dem TatBC-Komplex eine signifikante Translokation des Passagierproteins ins Thylakoidlumen nachweisen konnten, scheint es eher unwahrscheinlich, dass die Dissoziation des Substrats konzertiert mit dessen Translokation einhergeht oder diese möglicherweise gar induziert.

Darüber hinaus könnte der höhere TatA-Bedarf für die Intensitätsabnahme in den TatBC-Komplexbanden durchaus auch in einer Entfernung des bereits abgespalteten Transitpeptids vom TatBC-Komplex begründet liegen. Dass die finale Prozessierung zumindest an der TatC-Untereinheit stattfinden kann, wurde erst kürzlich mittels mehrerer chimärer Proteine, die ein N-terminales TorA-Signalpeptid besitzen, am bakteriellen Tat-Transportweg nachgewiesen. So konnte gezeigt werden, dass das bakterielle TatC als eine Art Insertase die Insertion des TorA-Signalpeptids in einer Orientierung vermittelt, die dessen Abspaltung durch die *leader peptidase* an der periplasmatischen Seite der Membran, ohne Transport des Passagierproteins, ermöglicht (Fröbel *et al.*, 2012). Dennoch bleibt anzumerken, dass die Anwesenheit von TatB diese vorzeitige, transportabgekoppelte Prozessierung der untersuchten Proteine verhindert. Darüber hinaus belegen vorläufige 2D-PAGE-Analysen von Thylakoidtransportexperimenten mit dem authentischen 16 kDa Vorläuferprotein, die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, den temporären Verbleib vom bereits abgespalteten Transitpeptid am TatBC-Komplex (Daten nicht gezeigt).

Andererseits zeigen *chase*-Experimente mit dem 16/23A83L Protein, dass die finale Prozessierung scheinbar keine notwendige Voraussetzung für die TatA-induzierte Dissoziation des Proteins vom TatBC-Komplex ist (siehe Abschnitt 2.2.3). Ebenso verdeutlichen neuerliche Transportexperimente mit einer TPP-Schnittstellenmutante des bakteriellen YedY-Proteins, dass die Blockierung der Prozessierung zu einer Akkumulation des Proteins in der Plasmamembran führt, jedoch den Transport von anderen Tat-Substratproteinen nicht blockiert (Ren *et al.*, 2013). Die Autoren nehmen an, dass das nichtprozessierte Vorläuferprotein nach erfolgtem Transport lateral in die Membran entlassen wird. Diese Daten korrelieren mit dem Tat-Transport des thylakoidalen Rieske Fe/S Proteins, welches zwar über die Thylakoidmembran transloziert wird, in dieser aber aufgrund des Fehlens einer TPP-Spaltstelle über das Signalpeptid „verankert“ bleibt und in den Cytochrom b_6/f -Komplex assembliert wird (Molik *et al.*, 2001).

Ein weiteres Argument, das gegen eine Entfernung des abgespalteten Transitpeptids als Ursache für den höheren TatA-Bedarf bei der Substratdissoziation spricht, ist die Tatsache, dass in den *chase*-Experimenten die Komplexbanden bei keiner der gewählten TatA-Konzentrationen einen sichtbaren *shift* in ihrem Laufverhalten aufweisen. Wie in Abbildung 14 zu sehen, lässt sich mittels *BN*-PAGE-Analysen durchaus unterscheiden, ob beispielsweise das 16/23 Protein oder nur das 16 kDa Transitpeptid an den TatBC-Komplexen gebunden vorliegt, da die transitpeptidbeladenen Komplexe im Nativgel eine höhere Mobilität zeigen, als solche die das Volllängen-16/23 Protein gebunden haben.

Zieht man nun die bisher aufgeführten Studien in Betracht, lässt sich vermuten, dass das TatA-induzierte Dissoziationsverhalten sowie der Zeitpunkt bzw. die Lokalisierung der finalen Prozessierung durchaus abhängig vom jeweiligen Tat-Substratprotein sind. Es wäre vorstellbar,

dass einige Proteine wie z.B. das chimäre 16/23 Protein so langsam von der TPP prozessiert werden, dass dieser Schritt erst nach der TatA-vermittelten Freisetzung vom Rezeptorkomplex vonstattgeht. Hingegen kann vermutlich bei anderen Substraten das Transitpeptid bzw. Signalpeptid bereits direkt an der funktionellen Translokase nach erfolgtem Transport des Passagierproteins abgespalten werden. Demnach könnte bei diesen Proteinen nur noch das abgespaltene Peptid TatA-vermittelt vom Rezeptor dissoziieren. Aufschluss darüber könnten letztendlich *chase*-Experimente zur Quantifizierung des TatA-Bedarfs für die Dissoziation von unterschiedlich effektiv prozessierbaren Substratproteinen geben.

3.4 Modifiziertes Modell des Tat-abhängigen Proteintransports

Im Folgenden sind die Ergebnisse aus dieser Arbeit, aber auch aus teils kürzlich veröffentlichten Studien von anderen Arbeitsgruppen in einem modifizierten und in weiten Teilen noch sehr spekulativen Modell des Tat-abhängigen Proteintransports zusammengefasst (siehe hierzu vergleichend die Abbildungen 4 und 22).

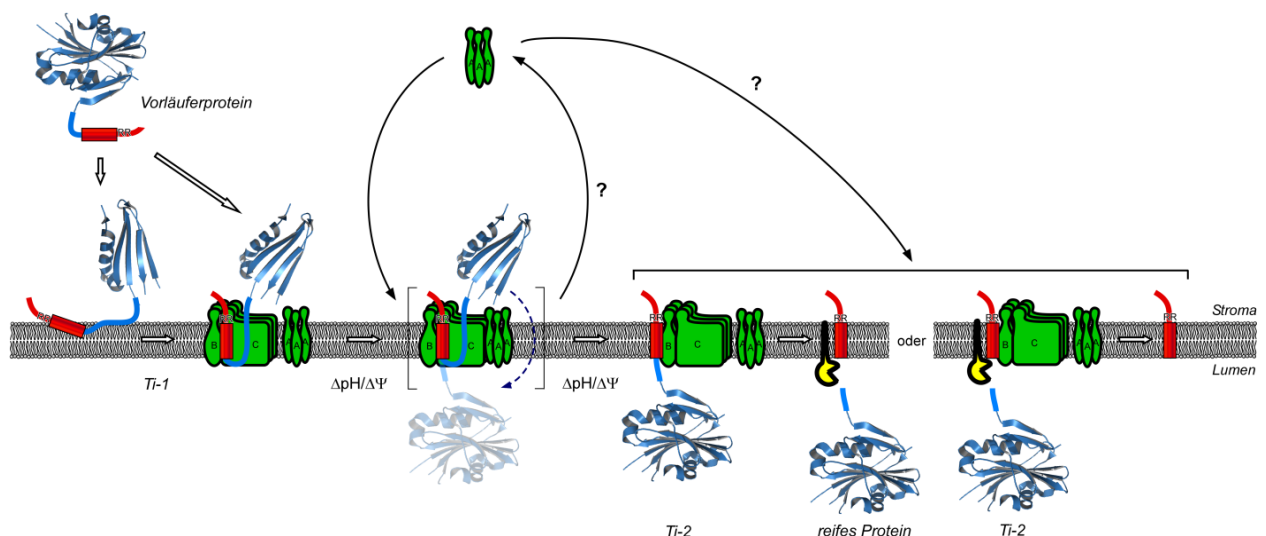


Abb.23 Modifiziertes Modell des Tat-abhängigen 16/23 Proteintransports. Für weitere Details, siehe Abb.4 oder Beschreibung im Text.

Nach diesem Modell bindet beim chimären 16/23 Protein in einem ersten Schritt das Vorläuferprotein in Ti-1 Konformation an bzw. teilweise in die äußere Lipidschicht der Thylakoidmembran, sodass ein Großteil des Proteins auf der stromalen Seite zwar proteasegeschützt vorliegt, aber dennoch weitestgehend für thiolreaktive Moleküle zugänglich ist. Da annähernd ein Drittel des reifen 23 kDa Proteins an der Membraninteraktion beteiligt ist, lässt sich zumindest eine partielle Entfaltung bzw. Konformationsänderung an dessen N-Terminus vermuten. Andererseits muss zur Ausbildung des Ti-1 der C-terminale Bereich in

seiner Struktur erhalten bleiben. Zudem lässt sich nicht ausschließen, dass es über den C-Terminus zur Oligomerisierung von einzelnen Vorläuferproteinen während der Membranbindung kommt. Einmal an der Thylakoidmembran gebunden, könnte das Protein anschließend an den TatBC-Rezeptorkomplex assoziieren. Jedoch stellt die spontane Membraninteraktion keine notwendige Voraussetzung für die Rezeptorbindung des Substratproteins dar. Vielmehr ist denkbar, dass ein gewisser Anteil an Tat-Substratproteinen aus der löslichen Phase kommend direkt mit dem Komplex assoziiert. Hierbei können mehrere Substratproteine gleichzeitig mit ihren jeweiligen Tat-Signalpeptiden an einem Rezeptor binden. Für diesen Schritt ist vermutlich nicht primär eine gefaltete Konformation des Passagierproteins an sich entscheidend, sondern vielmehr ob das Signalpeptid für eine effektive Bindung am Rezeptor zugänglich ist.

Die Ausbildung des TatBC-Substratkomplexes generiert vermutlich TatA-Bindestellen und ermöglicht somit in Anwesenheit eines ΔpH bzw. $\Delta\psi$ an der Thylakoidmembran die Rekrutierung des ambivalenten Proteins möglicherweise direkt aus dem Stroma heraus. Auch wenn die Stöchiometrie der einzelnen Tat-Komponenten noch nicht eindeutig geklärt ist, wäre denkbar, dass mehrere TatA Proteine allosterisch an den aus mehreren Untereinheiten bestehenden Rezeptor-Substrat-Komplex binden. Die Assoziation von TatA könnte anschließend Konformationsänderungen in den TatBC-Untereinheiten induzieren, in deren Verlauf der Rezeptorkomplex temporär eine Pore bildet und das Passagierprotein über diese ins Thylakoidlumen transloziert wird. Diese Konformationsänderungen könnten nun ebenso dazu führen, dass die Prozessierungsstelle des bereits transportierten Proteins zugänglich für die TPP ist und bei einigen Proteinen das Signalpeptid abgespalten wird. Es wäre vorstellbar, dass das Signalpeptid dabei so lange am Komplex assoziiert bleibt, bis eine erneute Translokationsrunde, induziert durch Substrat- und TatA-Bindung, beginnt. Im Fall von Tat-Substratproteinen, bei denen die finale Prozessierung relativ langsam verläuft, wie beim 16/23 Protein, dissoziiert ein Großteil des Proteins in Ti-2 Topologie vom TatBC-Komplex lateral in die Membran und wird erst dort durch die TPP prozessiert.

4 Literaturverzeichnis

4.1 Literaturverzeichnis

- Alami M., Luke I., Deitermann S., Eisner G., Koch H. G., Brunner J. and Müller M. (2003)** Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in *Escherichia coli*. *Mol Cell* 12, 937-946
- Albiniak A. M., Baglieri J. and Robinson C. (2012)** Targeting of luminal proteins across the thylakoid membrane. *J Exp Bot* 63, 1689-1698
- Aldridge C., Ma X., Gerard F. and Cline K. (2014)** Substrate-gated docking of pore subunit Tha4 in the TatC cavity initiates Tat translocase assembly. *J Cell Biol* 205, 51-65
- Auchincloss A. H., Alexander A. and Kohorn B. D. (1992)** Requirement for three membrane-spanning alpha-helices in the post-translational insertion of a thylakoid membrane protein. *J Biol Chem* 267, 10439-10446
- Bageshwar U. K. and Musser S. M. (2007)** Two electrical potential-dependent steps are required for transport by the *Escherichia coli* Tat machinery. *J Cell Biol* 179, 87-99
- Bageshwar U. K., Whitaker N., Liang F. C. and Musser S. M. (2009)** Interconvertibility of lipid- and translocon-bound forms of the bacterial Tat precursor pre-Sufl. *Mol Microbiol* 74, 209-226
- Baglieri J., Beck D., Vasisht N., Smith C. J. and Robinson C. (2012)** Structure of TatA paralog, TatE, suggests a structurally homogeneous form of Tat protein translocase that transports folded proteins of differing diameter. *J Biol Chem* 287, 7335-7344
- Barnett J. P., Eijlander R. T., Kuipers O. P. and Robinson C. (2008)** A minimal Tat system from a gram-positive organism: a bifunctional TatA subunit participates in discrete TatAC and TatA complexes. *J Biol Chem* 283, 2534-2542
- Behrendt J., Standar K., Lindenstrauss U. and Brüser T. (2004)** Topological studies on the twin-arginine translocase component TatC. *FEMS Microbiol Lett* 234, 303-308
- Bellafiore S., Ferris P., Naver H., Gohre V. and Rochaix J. D. (2002)** Loss of Albino3 leads to the specific depletion of the light-harvesting system. *Plant Cell* 14, 2303-2314
- Berghöfer J., Karnauchov I., Herrmann R. G. and 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 in spinach. *J Biol Chem* 270, 18341-18346
- Berghöfer J. and Klösigen R. B. (1996)** Isolation and characterization of a cDNA encoding the SecY protein from spinach chloroplasts. *Plant Physiol* 112, 863
- Berghöfer J. and Klösigen R. B. (1999)** Two distinct translocation intermediates can be distinguished during protein transport by the Tat (ΔpH) pathway across the thylakoid membrane. *FEBS Lett* 460, 328-332
- Berks B. C. (1996)** A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol Microbiol* 22, 393-404
- Berks B. C., Sargent F., De Leeuw E., Hinsley A. P., Stanley N. R., Jack R. L., Buchanan G. and Palmer T. (2000)** A novel protein transport system involved in the biogenesis of bacterial

electron transfer chains. *Biochim Biophys Acta* 1459, 325-330

- Berthelmann F., Mehner D., Richter S., Lindenstrauss U., Lunsdorf H., Hause G. and Brüser T. (2008)** Recombinant expression of tatABC and tatAC results in the formation of interacting cytoplasmic TatA tubes in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 283, 25281-25289
- Bogdanov M., Zhang W., Xie J. and Dowhan W. (2005)** Transmembrane protein topology mapping by the substituted cysteine accessibility method (SCAM(TM)): application to lipid-specific membrane protein topogenesis. *Methods* 36, 148-171
- Brambillasca S., Yabal M., Makarow M. and Borgese N. (2006)** Unassisted translocation of large polypeptide domains across phospholipid bilayers. *J Cell Biol* 175, 767-777
- Braun N. A., Davis A. W. and Theg S. M. (2007)** The chloroplast Tat pathway utilizes the transmembrane electric potential as an energy source. *Biophys J* 93, 1993-1998
- Brown J. R. (2003)** Ancient horizontal gene transfer. *Nat Rev Genet* 4, 121-132
- Bruce B. D. (2000)** Chloroplast transit peptides: structure, function and evolution. *Trends Cell Biol* 10, 440-447
- Celedon J. M. and Cline K. (2012)** Stoichiometry for binding and transport by the twin arginine translocation system. *J Cell Biol* 197, 523-534
- Chaddock A. M., Mant A., Karnauchoff I., Brink S., Herrmann R. G., Klösgen R. B. and Robinson C. (1995)** A new type of signal peptide: central role of a twin-arginine motif in transfer signals for the delta pH-dependent thylakoidal protein translocase. *Embo J* 14, 2715-2722
- Chan C. S., Zlomislic M. R., Tieleman D. P. and Turner R. J. (2007)** The TatA subunit of *Escherichia coli* twin-arginine translocase has an N-in topology. *Biochemistry* 46, 7396-7404
- Clark S. A. and Theg S. M. (1997)** A folded protein can be transported across the chloroplast envelope and thylakoid membranes. *Mol Biol Cell* 8, 923-934
- Clausmeyer S. (1992)** Import, Sortierung, Assemblierung von kerncodierten Proteinen des Chloroplasten. *Dissertation der Ludwig-Maximilians-Universität München*
- Clayton A. H. and Sawyer W. H. (2002)** Site-specific tryptophan fluorescence spectroscopy as a probe of membrane peptide structure and dynamics. *Eur Biophys J* 31, 9-13
- Cline K., Ettinger W. F. and Theg S. M. (1992)** Protein-specific energy requirements for protein transport across or into thylakoid membranes. Two luminal proteins are transported in the absence of ATP. *J Biol Chem* 267, 2688-2696
- Cline K. and McCaffery M. (2007)** Evidence for a dynamic and transient pathway through the TAT protein transport machinery. *Embo J* 26, 3039-3049
- Cline K. and Mori H. (2001)** Thylakoid Δ pH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport. *J Cell Biol* 154, 719-729
- Colletier J. P., Chaize B., Winterhalter M. and Fournier D. (2002)** Protein encapsulation in liposomes: efficiency depends on interactions between protein and phospholipid bilayer. *BMC Biotechnol* 2, 9
- Creighton A. M., Hulford A., Mant A., Robinson D. and Robinson C. (1995)** A monomeric,

- tightly folded stromal intermediate on the delta pH-dependent thylakoidal protein transport pathway. *J Biol Chem* 270, 1663-1669
- Dabney-Smith C., Mori H. and Cline K. (2003)** Requirement of a Tha4-conserved transmembrane glutamate in thylakoid Tat translocase assembly revealed by biochemical complementation. *J Biol Chem* 278, 43027-43033
- De Keersmaecker S., Van Mellaert L., Lammertyn E., Vrancken K., Anne J. and Geukens N. (2005)** Functional analysis of TatA and TatB in *Streptomyces lividans*. *Biochem Biophys Res Commun* 335, 973-982
- Dittmar J., Schlesier R. and Klösgen R. B. (2014)** Tat transport of a Sec passenger leads to both completely translocated as well as membrane-arrested passenger proteins. *Biochim Biophys Acta* 1843, 446-453
- Dünschede B., Bals T., Funke S. and Schünemann D. (2011)** Interaction studies between the chloroplast signal recognition particle subunit cpSRP43 and the full-length translocase Alb3 reveal a membrane-embedded binding region in Alb3 protein. *J Biol Chem* 286, 35187-35195
- Eichacker L. A. and Henry R. (2001)** Function of a chloroplast SRP in thylakoid protein export. *Biochim Biophys Acta* 1541, 120-134
- Endo T., Kawakami M., Goto A., America T., Weisbeek P. and Nakai M. (1994)** Chloroplast protein import. Chloroplast envelopes and thylakoids have different abilities to unfold proteins. *Eur J Biochem* 225, 403-409
- Falk S. and Sinning I. (2010)** The C terminus of Alb3 interacts with the chromodomains 2 and 3 of cpSRP43. *J Biol Chem* 285, 1e25-26; author reply 1e26-28
- Fan E., Jakob M. and Klösgen R. B. (2010)** One signal is enough: Stepwise transport of two distinct passenger proteins by the Tat pathway across the thylakoid membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 398, 438-443
- Finazzi G., Chasen C., Wollman F. A. and De Vitry C. (2003)** Thylakoid targeting of Tat passenger proteins shows no delta pH dependence in vivo. *Embo J* 22, 807-815
- Fincher V., Dabney-Smith C. and Cline K. (2003)** Functional assembly of thylakoid delta pH-dependent/Tat protein transport pathway components in vitro. *Eur J Biochem* 270, 4930-4941
- Franklin A. E. and Hoffman N. E. (1993)** Characterization of a chloroplast homologue of the 54-kDa subunit of the signal recognition particle. *J Biol Chem* 268, 22175-22180
- Frielingsdorf S., Jakob M. and Klösgen R. B. (2008)** A stromal pool of TatA promotes Tat-dependent protein transport across the thylakoid membrane. *J Biol Chem* 283, 33838-33845
- Frielingsdorf S. and Klösgen R. (2007)** Prerequisites for terminal processing of thylakoidal Tat substrates. *J Biol Chem* 282, 24455-24462
- Fröbel J., Rose P., Lausberg F., Blummel A. S., Freudl R. and Müller M. (2012)** Transmembrane insertion of twin-arginine signal peptides is driven by TatC and regulated by TatB. *Nat Commun* 3, 1311
- 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. *J Biol Chem* 282,

5263-5272

- Gohlke U., Pullan L., Mcdevitt C. A., Porcelli I., De Leeuw E., Palmer T., Saibil H. R. and Berks B. C. (2005)** The TatA component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10482-10486
- Gouffi K., Gerard F., Santini C. L. and Wu L. F. (2004)** Dual topology of the Escherichia coli TatA protein. *J Biol Chem* 279, 11608-11615
- Gray M. W. and Doolittle W. F. (1982)** Has the endosymbiont hypothesis been proven? *Microbiol Rev* 46, 1-42
- Gutensohn M., Fan E., Frielingsdorf S., Hanner P., Hou B., Hust B. and Klösgen R. B. (2006)** Toc, Tic, Tat *et al.*: structure and function of protein transport machineries in chloroplasts. *J Plant Physiol* 163, 333-347
- 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. and Weisbeek P. (1986)** A thylakoid processing protease is required for complete maturation of the lumen protein plastocyanin. *Nature* 324, 567-569
- Halpin C., Elderfield P. D., James H. E., Zimmermann R., Dunbar B. and Robinson C. (1989)** The reaction specificities of the thylakoidal processing peptidase and Escherichia coli leader peptidase are identical. *Embo J* 8, 3917-3921
- Hasan S., Platta H. W. and Erdmann R. (2013)** Import of proteins into the peroxisomal matrix. *Front Physiol* 4, 261
- Hauer R. S., Schlesier R., Heilmann K., Dittmar J., Jakob M. and Klösgen R. B. (2013)** Enough is enough: TatA demand during Tat-dependent protein transport. *Biochim Biophys Acta* 1833, 957-965
- Hou B., Frielingsdorf S. and Klösgen R. B. (2006)** Unassisted membrane insertion as the initial step in Δ pH/Tat-dependent protein transport. *J Mol Biol* 355, 957-967
- Hu Y., Zhao E., Li H., Xia B. and Jin C. (2010)** Solution NMR structure of the TatA component of the twin-arginine protein transport system from gram-positive bacterium Bacillus subtilis. *J Am Chem Soc* 132, 15942-15944
- Hulford A., Hazell L., Mould R. M. and 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. *J Biol Chem* 269, 3251-3256
- Hynds P. J., Robinson D. and Robinson C. (1998)** The sec-independent twin-arginine translocation system can transport both tightly folded and malfolded proteins across the thylakoid membrane. *J Biol Chem* 273, 34868-34874
- Jack R. L., Sargent F., Berks B. C., Sawers G. and Palmer T. (2001)** Constitutive expression of Escherichia coli tat genes indicates an important role for the twin-arginine translocase during aerobic and anaerobic growth. *J Bacteriol* 183, 1801-1804
- Jakob M., Kaiser S., Gutensohn M., Hanner P. and Klösgen R. B. (2009)** Tat subunit stoichiometry in Arabidopsis thaliana challenges the proposed function of TatA as the

- translocation pore. *Biochim Biophys Acta* 1793, 388-394
- Jarvis P. and Robinson C. (2004)** Mechanisms of protein import and routing in chloroplasts. *Curr Biol* 14, R1064-1077
- Jongbloed J. D., Martin U., Antelmann H., Hecker M., Tjalsma H., Venema G., Bron S., Van Dijk J. M. and Muller J. (2000)** TatC is a specificity determinant for protein secretion via the twin-arginine translocation pathway. *J Biol Chem* 275, 41350-41357
- Jongbloed J. D., Van Der Ploeg R. and Van Dijk J. M. (2006)** Bifunctional TatA subunits in minimal Tat protein translocases. *Trends Microbiol* 14, 2-4
- Karlsson A. J., Lim H. K., Xu H., Rocco M. A., Bratkowski M. A., Ke A. and Delisa M. P. (2012)** Engineering antibody fitness and function using membrane-anchored display of correctly folded proteins. *J Mol Biol* 416, 94-107
- Kerth A., Brehmer T., Meister A., Hanner P., Jakob M., Klösigen R. B. and Blume A. (2012)** Interaction of a Tat substrate and a Tat signal peptide with thylakoid lipids at the air-water interface. *Chembiochem* 13, 231-239
- Kim S. J., Robinson C. and Mant A. (1998)** Sec/SRP-independent insertion of two thylakoid membrane proteins bearing cleavable signal peptides. *FEBS Lett* 424, 105-108
- Kirwin P. M., Elderfield P. D. and Robinson C. (1987)** Transport of proteins into chloroplasts. Partial purification of a thylakoidal processing peptidase involved in plastocyanin biogenesis. *J Biol Chem* 262, 16386-16390
- Kirwin P. M., Elderfield P. D., Williams R. S. and Robinson C. (1988)** Transport of proteins into chloroplasts. Organization, orientation, and lateral distribution of the plastocyanin processing peptidase in the thylakoid network. *J Biol Chem* 263, 18128-18132
- Klösigen R. B., Brock I. W., Herrmann R. G. and Robinson C. (1992)** Proton gradient-driven import of the 16 kDa oxygen-evolving complex protein as the full precursor protein by isolated thylakoids. *Plant Mol Biol* 18, 1031-1034
- Knott T. G. and Robinson C. (1994)** The secA inhibitor, azide, reversibly blocks the translocation of a subset of proteins across the chloroplast thylakoid membrane. *J Biol Chem* 269, 7843-7846
- Ko K. and Cashmore A. R. (1989)** Targeting of proteins to the thylakoid lumen by the bipartite transit peptide of the 33 kd oxygen-evolving protein. *Embo J* 8, 3187-3194
- Koch S., Fritsch M. J., Buchanan G. and Palmer T. (2012)** Escherichia coli TatA and TatB proteins have N-out, C-in topology in intact cells. *J Biol Chem* 287, 14420-14431
- Kogata N., Nishio K., Hirohashi T., Kikuchi S. and Nakai M. (1999)** Involvement of a chloroplast homologue of the signal recognition particle receptor protein, FtsY, in protein targeting to thylakoids. *FEBS Lett* 447, 329-333
- Kopecky V., Jr., Kohoutova J., Lapkouski M., Hofbauerova K., Sovova Z., Ettrichova O., Gonzalez-Perez S., Dulebo A., Kaftan D., Smatanova I. K., Revuelta J. L., Arellano J. B., Carey J. and Ettrich R. (2012)** Raman spectroscopy adds complementary detail to the high-resolution x-ray crystal structure of photosynthetic PsbP from Spinacia oleracea. *PLoS One* 7, e46694

- Kühlbrandt W. and Wang D. N. (1991)** Three-dimensional structure of plant light-harvesting complex determined by electron crystallography. *Nature* 350, 130-134
- Ladig R., Sommer M. S., Hahn A., Leisegang M. S., Papatotiriou D. G., Ibrahim M., Elkehal R., Karas M., Zickermann V., Gutensohn M., Brandt U., Klosgen R. B. and Schleiff E. (2011)** A high-definition native polyacrylamide gel electrophoresis system for the analysis of membrane complexes. *Plant J* 67, 181-194
- Laidler V., Chaddock A. M., Knott T. G., Walker D. and Robinson C. (1995)** A SecY homolog in *Arabidopsis thaliana*. Sequence of a full-length cDNA clone and import of the precursor protein into chloroplasts. *J Biol Chem* 270, 17664-17667
- Lange C., Muller S. D., Walther T. H., Burck J. and Ulrich A. S. (2007)** Structure analysis of the protein translocating channel TatA in membranes using a multi-construct approach. *Biochim Biophys Acta* 1768, 2627-2634
- Le Guernevé C., Seigneuret M. and Marion D. (1998)** Interaction of the wheat endosperm lipid-binding protein puroindoline-a with phospholipids. *Arch Biochem Biophys* 360, 179-186
- Leister D. (2003)** Chloroplast research in the genomic age. *Trends Genet* 19, 47-56
- Lewis N. E., Marty N. J., Kathir K. M., Rajalingam D., Kight A. D., Daily A., Kumar T. K., Henry R. L. and Goforth R. L. (2010)** A dynamic cpSRP43-Albino3 interaction mediates translocase regulation of chloroplast signal recognition particle (cpSRP)-targeting components. *J Biol Chem* 285, 34220-34230
- Li M., Hanford M. J., Kim J. W. and Peeples T. L. (2007)** Amyloglucosidase enzymatic reactivity inside lipid vesicles. *J Biol Eng* 1, 4
- Li X., Henry R., Yuan J., Cline K. and 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3789-3793
- Lorkovic Z. J., Schroder W. P., Pakrasi H. B., Irrgang K. D., Herrmann R. G. and Oelmüller R. (1995)** Molecular characterization of PsbW, a nuclear-encoded component of the photosystem II reaction center complex in spinach. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8930-8934
- Ma X. and Cline K. (2010)** Multiple precursor proteins bind individual Tat receptor complexes and are collectively transported. *Embo J* 29, 1477-1488
- Madueno F., Bradshaw S. A. and Gray J. C. (1994)** The thylakoid-targeting domain of the chloroplast Rieske iron-sulfur protein is located in the N-terminal hydrophobic region of the mature protein. *J Biol Chem* 269, 17458-17463
- Mant A., Schmidt I., Herrmann R. G., Robinson C. and Klosgen R. B. (1995)** Sec-dependent thylakoid protein translocation. Delta pH requirement is dictated by passenger protein and ATP concentration. *J Biol Chem* 270, 23275-23281
- Manting E. H. and Driessen A. J. (2000)** Escherichia coli translocase: the unravelling of a molecular machine. *Mol Microbiol* 37, 226-238
- Margulis L. (1970)** Origin of eukaryotic cells. *Yale University Press, New Haven*
- Marques J. P., Dudeck I. and Klösigen R. B. (2003)** Targeting of EGFP chimeras within chloroplasts. *Mol Genet Genomics* 269, 381-387

- Marques J. P., Schattat M. H., Hause G., Dudeck I. and Klösgen R. B. (2004)** In vivo transport of folded EGFP by the DeltapH/TAT-dependent pathway in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 55, 1697-1706
- Martin W. and Herrmann R. G. (1998)** Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and Why? *Plant Physiol* 118, 9-17
- McFadden G. I. (1999)** Endosymbiosis and evolution of the plant cell. *Curr Opin Plant Biol* 2, 513-519
- Mereschkowsky C. (1905)** Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biol Zentralbl* 25, 593-604
- Michl D., Karnauchov I., Berghöfer J., Herrmann R. G. and Klösgen R. B. (1999)** Phylogenetic transfer of organelle genes to the nucleus can lead to new mechanisms of protein integration into membranes. *Plant J* 17, 31-40
- Michl D., Robinson C., Shackleton J. B., Herrmann R. G. and Klösgen R. B. (1994)** Targeting of proteins to the thylakoids by bipartite presequences: CFoll is imported by a novel, third pathway. *Embo J* 13, 1310-1317
- Mitra K., Frank J. and Driessen A. (2006)** Co- and post-translational translocation through the protein-conducting channel: analogous mechanisms at work? *Nat Struct Mol Biol* 13, 957-964
- Molik S., Karnauchov I., Weidlich C., Herrmann R. G. and 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? *J Biol Chem* 276, 42761-42766
- Monteferrante C. G., Baglieri J., Robinson C. and Van Dijk J. M. (2012)** TatAc, the third TatA subunit of *Bacillus subtilis*, can form active twin-arginine translocases with the TatCd and TatCy subunits. *Appl Environ Microbiol* 78, 4999-5001
- Mori H. and Cline K. (2002)** A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid [Delta]pH/Tat translocase. *J Cell Biol* 157, 205-210
- Mori H., Summer E. J. and Cline K. (2001)** Chloroplast TatC plays a direct role in thylakoid (Delta)pH-dependent protein transport. *FEBS Lett* 501, 65-68
- Mori H., Summer E. J., Ma X. and Cline K. (1999)** Component specificity for the thylakoidal Sec and ΔpH-dependent protein transport pathways. *J Cell Biol* 146, 45-56
- Mould R. M. and Robinson C. (1991)** A proton gradient is required for the transport of two luminal oxygen-evolving proteins across the thylakoid membrane. *J Biol Chem* 266, 12189-12193
- Müller M. and Klösgen R. B. (2005)** The Tat pathway in bacteria and chloroplasts (review). *Mol Membr Biol* 22, 113-121
- Müller S. D., De Angelis A. A., Walther T. H., Grage S. L., Lange C., Opella S. J. and Ulrich A. S. (2007)** Structural characterization of the pore forming protein TatAd of the twin-arginine translocase in membranes by solid-state 15N-NMR. *Biochim Biophys Acta* 1768, 3071-3079
- Musser S. M. and Theg S. M. (2000)** Characterization of the early steps of OE17 precursor transport by the thylakoid ΔpH/Tat machinery. *Eur J Biochem* 267, 2588-2598

- Natale P., Brüser T. and Driessen A. J. (2008)** Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane--distinct translocases and mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1778, 1735-1756
- Nicolas P., Mader U., Dervyn E., Rochat T., Leduc A., Pigeonneau N., Bidnenko E., Marchadier E., Hoebeke M., Aymerich S., Becher D., Bisicchia P., Botella E., Delumeau O., Doherty G., Denham E. L., Fogg M. J., Fromion V., Goelzer A., Hansen A., Hartig E., Harwood C. R., Homuth G., Jarmer H., Jules M., Klipp E., Le Chat L., Lecointe F., Lewis P., Liebermeister W., March A., Mars R. A., Nannapaneni P., Noone D., Pohl S., Rinn B., Rugheimer F., Sappa P. K., Samson F., Schaffer M., Schwikowski B., Steil L., Stulke J., Wiegert T., Devine K. M., Wilkinson A. J., Van Dijk J. M., Hecker M., Volker U., Bessieres P. and Noirot P. (2012)** Condition-dependent transcriptome reveals high-level regulatory architecture in *Bacillus subtilis*. *Science* 335, 1103-1106
- Nielsen V. S., Mant A., Knoetzel J., Moller B. L. and 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 delta pH in translocation across the thylakoid membrane. *J Biol Chem* 269, 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 J* 18, 733-742
- Oates J., Barrett C. M., Barnett J. P., Byrne K. G., Bolhuis A. and 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. *J Mol Biol* 346, 295-305
- Pal D., Fite K. and Dabney-Smith C. (2013)** Direct interaction between a precursor mature domain and transport component Tha4 during twin arginine transport of chloroplasts. *Plant Physiol* 161, 990-1001
- Palmer T. and Berks B. C. (2003)** Moving folded proteins across the bacterial cell membrane. *Microbiology* 149, 547-556
- Palmer T. and Berks B. C. (2012)** The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nat Rev Microbiol* 10, 483-496
- Peltier J. B., Emanuelsson O., Kalume D. E., Ytterberg J., Friso G., Rudella A., Liberles D. A., Soderberg L., Roepstorff P., Von Heijne G. and Van Wijk K. J. (2002)** Central functions of the lumenal and peripheral thylakoid proteome of *Arabidopsis* determined by experimentation and genome-wide prediction. *Plant Cell* 14, 211-236
- Perry S. E. and Keegstra K. (1994)** Envelope membrane proteins that interact with chloroplastic precursor proteins. *Plant Cell* 6, 93-105
- Pop O., Martin U., Abel C. and Müller J. P. (2002)** The twin-arginine signal peptide of PhoD and the TatAd/Cd proteins of *Bacillus subtilis* form an autonomous Tat translocation system. *J Biol Chem* 277, 3268-3273
- Pop O. I., Westermann M., Volkmer-Engert R., Schulz D., Lemke C., Schreiber S., Gerlach R., Wetzker R. and Müller J. P. (2003)** Sequence-specific binding of prePhoD to soluble TatAd indicates protein-mediated targeting of the Tat export in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 278, 38428-38436
- Ramasamy S., Abrol R., Suloway C. J. and Clemons W. M., Jr. (2013)** The glove-like

structure of the conserved membrane protein TatC provides insight into signal sequence recognition in twin-arginine translocation. *Structure* 21, 777-788

Rath A. and Deber C. M. (2012) Protein structure in membrane domains. *Annu Rev Biophys* 41, 135-155

Ren C., Patel R. and Robinson C. (2013) Exclusively membrane-inserted state of an uncleavable Tat precursor protein suggests lateral transfer into the bilayer from the translocon. *Febs J* 280, 3354-3364

Richter S. and Brüser T. (2005) Targeting of unfolded PhoA to the TAT translocon of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 280, 42723-42730

Richter S., Lindenstrauss U., Lucke C., Bayliss R. and Brüser T. (2007) Functional Tat transport of unstructured, small, hydrophilic proteins. *J Biol Chem* 282, 33257-33264

Robinson C. and Bolhuis A. (2001) Protein targeting by the twin-arginine translocation pathway. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 350-356

Robinson C., Cai D., Hulford A., Brock I. W., Michl D., Hazell L., Schmidt I., Herrmann R. G. and Klosgen 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 J* 13, 279-285

Robinson C. and Ellis R. J. (1984) Transport of proteins into chloroplasts. Partial purification of a chloroplast protease involved in the processing of important precursor polypeptides. *Eur J Biochem* 142, 337-342

Robinson C., Karnauchoff I., Herrmann R. G. and Klösigen R. B. (1996) Protease-sensitive thylakoidal import machinery for the Sec-, Δ pH- and signal recognition particle-dependent protein targeting pathways, but not for CF₀-II integration. *Plant J* 10, 149-155

Robinson C., Matos C. F., Beck D., Ren C., Lawrence J., Vasisht N. and Mendel S. (2011) Transport and proofreading of proteins by the twin-arginine translocation (Tat) system in bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1808, 876-884

Rocco M. A., Waraho-Zhmeyev D. and Delisa M. P. (2012) Twin-arginine translocase mutations that suppress folding quality control and permit export of misfolded substrate proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 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. *J Biol Chem* 274, 13223-13228

Rodriguez F., Rouse S. L., Tait C. E., Harmer J., De Riso A., Timmel C. R., Sansom M. S., Berks B. C. and Schnell J. R. (2013) Structural model for the protein-translocating element of the twin-arginine transport system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E1092-1101

Roffey R. A. and Theg S. M. (1996) Analysis of the Import of Carboxyl-Terminal Truncations of the 23-Kilodalton Subunit of the Oxygen-Evolving Complex Suggests That Its Structure Is an Important Determinant for Thylakoid Transport. *Plant Physiol* 111, 1329-1338

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., Högbohm M., Berks B. C. and Lea S. M. (2012) Structure of the TatC core of the twin-arginine protein

transport system. *Nature* 492, 210-214

- Samuelson J. C., Jiang F., Yi L., Chen M., De Gier J. W., Kuhn A. and Dalbey R. E. (2001)** Function of YidC for the insertion of M13 procoat protein in *Escherichia coli*: translocation of mutants that show differences in their membrane potential dependence and Sec requirement. *J Biol Chem* 276, 34847-34852
- Santini C. L., Bernadac A., Zhang M., Chanal A., Ize B., Blanco C. and Wu L. F. (2001)** Translocation of jellyfish green fluorescent protein via the Tat system of *Escherichia coli* and change of its periplasmic localization in response to osmotic up-shock. *J Biol Chem* 276, 8159-8164
- Santini C. L., Ize B., Chanal A., Müller M., Giordano G. and Wu L. F. (1998)** A novel sec-independent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli*. *Embo J* 17, 101-112
- Sargent F., Bogsch E. G., Stanley N. R., Wexler M., Robinson C., Berks B. C. and Palmer T. (1998)** Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. *Embo J* 17, 3640-3650
- Schatz G. and Dobberstein B. (1996)** Common principles of protein translocation across membranes. *Science* 271, 1519-1526
- Schimper A. (1883)** Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. *Bot Zeitung* 41, 105-114
- Schleiff E. and Klösgen R. B. (2001)** Without a little help from 'my' friends: direct insertion of proteins into chloroplast membranes? *Biochim Biophys Acta* 1541, 22-33
- Schlesier R. and Klösgen R. B. (2010)** Twin arginine translocation (Tat)-dependent protein transport: the passenger protein participates in the initial membrane binding step. *Biol Chem* 391, 1411-1417
- Schubert M., Petersson U. A., Haas B. J., Funk C., Schroder W. P. and Kieselbach T. (2002)** Proteome map of the chloroplast lumen of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 277, 8354-8365
- Schünemann D. (2007)** Mechanisms of protein import into thylakoids of chloroplasts. *Biol Chem* 388, 907-915
- Schünemann D., Amin P., Hartmann E. and 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. *J Biol Chem* 274, 12177-12182
- Schünemann D., Gupta S., Persello-Cartieaux F., Klimyuk V. I., Jones J. D., Nussaume L. and Hoffman N. E. (1998)** A novel signal recognition particle targets light-harvesting proteins to the thylakoid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10312-10316
- Shanmugham A., Wong Fong Sang H. W., Bollen Y. J. and Lill H. (2006)** Membrane binding of twin arginine preproteins as an early step in translocation. *Biochemistry* 45, 2243-2249
- 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. and Weisbeek P. (1986)** The role of the transit peptide in the routing of precursors toward different chloroplast compartments. *Cell*

46, 365-375

- Stanley N. R., Palmer T. and Berks B. C. (2000)** The twin arginine consensus motif of Tat signal peptides is involved in Sec-independent protein targeting in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 275, 11591-11596
- Steiner J. M., Köcher T., Nagy C. and Löffelhardt W. (2002)** Chloroplast SecE: evidence for spontaneous insertion into the thylakoid membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 747-752
- Sundberg E., Slagter J. G., Fridborg I., Cleary S. P., Robinson C. and Coupland G. (1997)** ALBINO3, an Arabidopsis nuclear gene essential for chloroplast differentiation, encodes a chloroplast protein that shows homology to proteins present in bacterial membranes and yeast mitochondria. *Plant Cell* 9, 717-730
- Tarry M. J., Schäfer E., Chen S., Buchanan G., Greene N. P., Lea S. M., Palmer T., Saibil H. R. and Berks B. C. (2009)** Structural analysis of substrate binding by the TatBC component of the twin-arginine protein transport system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 13284-13289
- Teter S. A. and Theg S. M. (1998)** Energy-transducing thylakoid membranes remain highly impermeable to ions during protein translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1590-1594
- Theg S. M., Bauerle C., Olsen L. J., Selman B. R. and Keegstra K. (1989)** Internal ATP is the only energy requirement for the translocation of precursor proteins across chloroplastic membranes. *J Biol Chem* 264, 6730-6736
- Theg S. M., Cline K., Finazzi G. and Wollman F. A. (2005)** The energetics of the chloroplast Tat protein transport pathway revisited. *Trends Plant Sci* 10, 153-154
- Thompson S. J., Robinson C. and Mant A. (1999)** Dual signal peptides mediate the signal recognition particle/Sec-independent insertion of a thylakoid membrane polyprotein, PsbY. *J Biol Chem* 274, 4059-4066
- Tsukazaki T., Mori H., Echizen Y., Ishitani R., Fukai S., Tanaka T., Perederina A., Vassilyev D. G., Kohno T., Maturana A. D., Ito K. and Nureki O. (2011)** Structure and function of a membrane component SecDF that enhances protein export. *Nature* 474, 235-238
- Viitanen P. V., Doran E. R. and Dunsmuir P. (1988)** What is the role of the transit peptide in thylakoid integration of the light-harvesting chlorophyll a/b protein? *J Biol Chem* 263, 15000-15007
- Voelker R. and Barkan A. (1995)** Two nuclear mutations disrupt distinct pathways for targeting proteins to the chloroplast thylakoid. *Embo J* 14, 3905-3914
- von Heijne G. (1989)** Control of topology and mode of assembly of a polytopic membrane protein by positively charged residues. *Nature* 341, 456-458
- Walde P. and Ichikawa S. (2001)** Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications. *Biomol Eng* 18, 143-177
- Walde P. and Marzetta B. (1998)** Bilayer permeability-based substrate selectivity of an enzyme in liposomes. *Biotechnol Bioeng* 57, 216-219
- Walker M. B., Roy L. M., Coleman E., Voelker R. and Barkan A. (1999)** The maize *tha4* gene functions in sec-independent protein transport in chloroplasts and is related to *hcf106*, *tatA*,

and tatB. *J Cell Biol* 147, 267-276

- Weiner J. H., Bilous P. T., Shaw G. M., Lubitz S. P., Frost L., Thomas G. H., Cole J. A. and Turner R. J. (1998)** A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins. *Cell* 93, 93-101
- Westermann M., Pop O. I., Gerlach R., Appel T. R., Schlormann W., Schreiber S. and Müller J. P. (2006)** The TatAd component of the *Bacillus subtilis* twin-arginine protein transport system forms homo-multimeric complexes in its cytosolic and membrane embedded localisation. *Biochim Biophys Acta* 1758, 443-451
- Wittig I., Karas M. and Schägger H. (2007)** High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Mol Cell Proteomics* 6, 1215-1225
- Wu L. F., Ize B., Chanal A., Quentin Y. and Fichant G. (2000)** Bacterial twin-arginine signal peptide-dependent protein translocation pathway: evolution and mechanism. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2, 179-189
- Xu X., Costa A. and Burgess D. J. (2012)** Protein encapsulation in unilamellar liposomes: high encapsulation efficiency and a novel technique to assess lipid-protein interaction. *Pharm Res* 29, 1919-1931
- Yi L. and Dalbey R. E. (2005)** Oxa1/Alb3/YidC system for insertion of membrane proteins in mitochondria, chloroplasts and bacteria (review). *Mol Membr Biol* 22, 101-111
- Young M. E., Keegstra K. and Froehlich J. E. (1999)** GTP promotes the formation of early-import intermediates but is not required during the translocation step of protein import into chloroplasts. *Plant Physiol* 121, 237-244
- Yuan J. and 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. *J Biol Chem* 269, 18463-18467

5 Anhang

5.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AMS	4-Azetamido-4'-Maleimidylstilben-2,2'-disulfonsäure
<i>A. th.</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BN	Blau nativ (<i>blue native</i>)
BrCN	Bromcyan
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
c	Konzentration
CD	Circulardichroismus
CF ₀	Untereinheit der ATP-Synthase
cp	chloroplastidär
C-Terminus	Carboxyterminus
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNS (<i>complementary DNA</i>)
Chl	Chlorophyll
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
ΔpH	Protonengradient
DSG	Disuccinimidylglutarat
DSS	Disuccinimidylsuberat
DTT	Dithiothreitol
ΔΨ	elektrochemischer Gradient
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EK	Enterokinase
Emal	EGFP-SMCC

ER	Endoplasmatisches Retikulum
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GTP	Guanosin-5`-triphosphat
h	Stunde
HCl	Hydrochlorid
hrCN	<i>high resolution clear native</i>
HDN	<i>histidine- and deoxycholate based native</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N`-2-ethansulfonsäure
His- <i>tag</i>	Histidin- <i>tag</i>
HM	HEPES + Magnesium
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
KM	Michaelis-Menten-Konstante
KOH	Kaliumhydroxid
LHC	<i>light harvesting complex</i>
Lipo	Liposomen
M	Molar
m	reifes Protein (<i>mature protein</i>)
MalPEG ₅₀₀₀	Methoxypolyethylenglykolmalimid
μg	Mikrogramm
MgCl ₂	Magnesiumdichlorid
min	Minute
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mM	Millimolar
μM	Mikromolar
NaCl	Natriumchlorid
Ni	Nickel

nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NMR	Kernspinresonanz (nuclear magnetic resonance)
N-Terminus	Aminoterminus
OEC	Wasserspaltungsapparat (<i>oxygen evolving complex</i>)
p	Vorläuferprotein (<i>precursor protein</i>)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC	Phosphatidylcholin / Plastocyanin
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pdb	<i>protein data bank</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pmol	Pikomol
Psa	Proteine des Photosystems I
Psb	Proteine des Photosystems II
PTS	<i>peroxisome targeting signal</i>
RTS	<i>rapid translation system</i>
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase
SCAM	<i>substituted cysteine accessibility method</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec	<i>secretory</i>
SPP	stromale Prozessierungspeptidase
SRP	Signalerkennungspartikel (<i>signal recognition particle</i>)
SSU	kleine Untereinheit der RuBisCO (<i>small subunit</i>)
S-tag	Streptavidin-tag
STD	stromadirigierende Domäne (<i>stroma targeting domain</i>)
SulfoSMCC	Sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidoethyl) cyclohexan-1-carboxylat
t	<i>in vitro</i> -Translation
Tat	<i>twin arginine translocation</i>

Thy	Thylakoide
Ti-1	Translokationsintermediat 1
Ti-2	Translokationsintermediat 2
TIC	<i><u>t</u>ranslocon of the <u>i</u>nn<u>e</u>r envelope of <u>c</u>hloroplasts</i>
TMD	Transmembrandomäne
TP	Transitpeptid
TPP	Thylakoidprozessierungspeptidase
TOC	<i><u>t</u>ranslocon of the <u>o</u>u<u>t</u>er envelope of <u>c</u>hloroplasts</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-methylglycin
TTD	thylakoiddirigierende Domäne (<i>thylakoid targeting domain</i>)
TX-100	Triton X-100
UV	Ultraviolett
V	Volt
V_{\max}	Maximalgeschwindigkeit
Zn	Zink

5.2 Publikationsliste

Dittmar, J., Schlesier, R., and Klösgen, R.B. (2014) Tat transport of a Sec passenger leads to both completely translocated as well as membrane-arrested passenger proteins.

Biochim. Biophys. Acta, **1843**, 446-453.

Hauer, R.S., Schlesier, R., Heilmann, K., Dittmar, J., Jakob, M., and Klösgen, R.B. (2013)

Enough is enough: TatA demand during Tat-dependent protein transport. *Biochim.*

Biophys. Acta, **1833**, 957-965.

Schlesier, R. and Klösgen, R.B. (2010) Twin arginine translocation (Tat)-dependent protein transport: the passenger protein participates in the initial membrane binding step. *Biol.*

Chem., **391**,1411-1417.

Danksagung

Ich danke meinem Betreuer Rabe Klösigen für die Möglichkeit meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können und somit die faszinierende Welt des Proteintransports entdecken bzw. erkunden zu dürfen. Darüber hinaus danke ich ihm für viele wertvolle wissenschaftlichen Diskussionen und Debatten sowie für die zahlreichen Gespräche über „Gott und die Welt“.

Ebenso möchte ich mich bei der Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt für die Gewährung eines Stipendiums zur finanziellen Unterstützung meiner Dissertation bedanken.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der AG Klösigen danke ich für die tolle Unterstützung während meiner gesamten Promotionszeit. Ihr alle hattet stets ein offenes Ohr für viele mehr oder minder forschungsrelevante Alltagsprobleme aber auch für zahllose spaßige Witze und Blödeleien. Insbesondere danke ich allen Mitgliedern des Tat-Teams für die vielen inspirierenden Ideen und noch so absurdesten Theorien, kreierte aus scheinbar endlosen *brain storming* Momenten. Nichts hat so viel Spaß gemacht, als mit euch in banger Minuten vor dem PhosphorImager zu sitzen, um mal wieder ein mehr Fragen aufwerfendes als Antwort gebendes Ergebnis zu erhalten. Ich sage nur: „Team Tat“.

Vor allem aber danke ich meinen langjährigen Laborkollegen/Innen aus der 255 Hau1, Julia und Mandy. Ihr seid echt ein paar tolle Typen und es war mir eine Freude mit euch zusammen zu arbeiten. Ich werde die vielen humorvollen Momente, aber auch eure Ehrlichkeit und Offenheit im Laboralltag vermissen.

Gedankt sei aber auch allen Angehörigen des Instituts für Pflanzenphysiologie für die gemeinsamen Ausflüge, als auch für die zahlreichen interessanten interdisziplinären Gespräche.

Ebenso danke ich meinen Eltern Gisela und Fritz Schlesier sowie meinem Bruder Dirk für die stete moralische Unterstützung und notwendige Ablenkung von wissenschaftlichen Fragestellungen. Ihr wart immer für mich da, egal welche Hürde es für mich zu überspringen gab.

Ganz besonders aber möchte ich mich bei meiner lieben Anke und unserem zauberhaften Knöpfchen Fiona bedanken. Ihr zwei gibt mir in meinem Leben Kraft und Stärke, Liebe und Zuneigung. Ihr lasst mich stets erkennen, was wirklich wichtig ist.

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 entnommen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

René Schlesier

Halle (Saale), 15.10.2014

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname: Schlesier, René
Geburtsdatum/-ort: 29.08.1983 / Merseburg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Anschrift: Bernhardystr. 48 / 06110 Halle (Saale)
ab 01.12.2014 Bernhardystraße 20 / 06110 Halle (Saale)

Ausbildung

10/2008 – 02/2014 wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe Prof. Klösgen am Institut für Biologie – Pflanzenphysiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Thema: Zum Tat-abhängigen Proteintransport an der Thylakoidmembran: Membraninteraktion, Rezeptorbindung und Translokation des chimären 16/23 Proteins

09/2008 Diplom in Biochemie
Thema: Charakterisierung eines frühen Translokationsintermediates während des ΔpH /Tat-abhängigen Proteintransports über die Thylakoidmembran

10/2003 – 09/2008 Studium der Biochemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

07/2003 Abitur

08/1994 – 07/2003 Domgymnasium Merseburg

08/1990 – 07/1994 Astrid Lindgren Grundschule Schkopau