

**Untersuchungen zum
Einfluss des Faltungszustandes von Vorläuferproteinen auf den
Tat-abhängigen Proteintransport
sowie zur subzellulären Lokalisierung
potentieller Thylakoidprozessierungspeptidasen
in *Arabidopsis thaliana***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

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



von

Peter Hanner

geboren am 18.06.1978 in Halle/Saale

Gutachter:

1. Prof. Dr. Ralf Bernd Klösgen
2. PD Dr. Thomas Brüser
3. Prof. Dr. Roland Freudl

eingereicht am: 03.07.2008

verteidigt am: 05.11.2008

urn:nbn:de:gbv:3-000014582

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000014582>]

Vieles geht in der Welt verloren, weil man es zu geschwind für verloren gibt.

Johann Wolfgang von Goethe

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	X
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Bedeutung und Struktur der Transitpeptide	5
2.2 Transportwege über die Thylakoidmembran	8
2.2.1 Der SRP-abhängige Weg	9
2.2.2 Der Sec-abhängige Weg	10
2.2.3 Der „spontane“ Weg	10
2.2.4 Der Δ pH/Tat-Weg	11
2.2.5 Der Transport gefalteter Proteine über den Δ pH/Tat-Weg	13
2.3 Die TPP – eine Typ I-Signalpeptidase	14
2.4 GFP/EGFP als Reporter-Protein	15
2.5 Zielsetzung	20
2.5.1 Einfluss des Faltungszustandes des Substrats auf den Δ pH/Tat-abhängigen Transport	20
2.5.2 Charakterisierung der Thylakoidprozessierungspeptidase in <i>Arabidopsis thaliana</i>	20
3 Ergebnisse	21
3.1 Verhalten gefalteter und ungefalteter Tat-Substrate beim Thylakoidtransport	21
3.1.1 <i>In thylakoido</i> Transport authentischer Tat- und Sec-Substrate	23
3.1.2 EGFP als Tat-Substrat	25
3.1.2.1 i16/EGFP und i16/EGFP	26
3.1.3 Das <i>in vitro</i> Transportverhalten der chimären EGFP-Substrate	27

3.1.4	Expression, Faltung und Reinigung des EGFP und der chimären Substrate	28
3.1.4.1	Überexpression in <i>E. coli</i>	29
3.1.4.2	Reinigung der <i>inclusion bodies</i>	31
3.1.4.3	Rückfaltung	33
3.1.4.4	Substratreinigung	33
3.1.4.5	Bestimmung des Faltungsgrads	36
3.1.4.6	Stabilität und Löslichkeit der chimären EGFP-Substrate	38
3.1.5	Spektrometrische Analyse der EGFP-Substrate	40
3.1.5.1	Chromophoranalysen mittels UV/VIS-Spektroskopie	40
3.1.5.2	CD-Spektren	43
3.1.6	Strukturanalysen der entfalteten EGFP-Substrate	45
3.1.7	Vergleichende Konkurrenzexperimente gefalteter und ungefalteter Substrate	46
3.1.7.1	16/EGFP als Konkurrent	48
3.1.7.2	i16/EGFP als Konkurrent	51
3.1.7.3	Konkurrenz des 16/23 Imports – Analyse der Transportintermediate	52
3.1.8	<i>In vitro</i> Import rückgefalteter EGFP-Substrate	55
3.1.9	Verhalten des i16/EGFP bei Interaktion mit Lipid-Monoschichten und hydrophoben Grenzflächen	56
3.1.9.1	Filmwaage-Messungen von i16/EGFP und EGFP	58
3.1.9.2	IRRAS Untersuchungen des i16/EGFP und EGFP	59
3.2	Die Thylakoidprozessierungspeptidase (TPP) und deren Homologe	62
3.2.1	<i>In silico</i> Analysen der TPP-Homologen	62
3.2.1.1	Homologievergleiche (ClustalW)	63
3.2.1.2	Analyse potentieller Transmembranbereiche	65
3.2.1.3	Vorhersagen zur subzellulären Lokalisierung	68
3.2.1.4	Expressionsanalysen mittels DNA-Array-Datenbanken	69
3.2.1.5	Zusammenfassung der <i>in silico</i> Analysen	70
3.2.2	Lokalisierungsstudien der TPP1, TPP2 und TPP3 durch <i>in organello</i> Importe	71
3.2.2.1	Vergleichender <i>in organello</i> Import in Chloroplasten und Mitochondrien	71
3.2.2.2	Chloroplastenimport der TPP3 mit Subfraktionierung	73
3.2.2.3	Analyse möglicher Komplexe der TPP3 mittels Native-PAGE	75

3.2.3	Lokalisierungsstudien der TPP1, TPP2 und TPP3 durch <i>in vivo</i> Studien	76
3.2.3.1	Biolistische Transformation und Fluoreszenzmikroskopie	78
3.2.3.2	<i>In vivo</i> Lokalisierung der verkürzten TPP/EYFP-Fusionen	79
3.2.3.3	<i>In organello</i> Analysen der verkürzten TPP/EYFP-Fusionen	82
3.2.3.4	<i>In vivo</i> Lokalisierung der Vollängen-TTP/EYFP-Fusionen	84
3.2.4	Zusammenfassung der <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Experimente der TPP-Varianten und deren EYFP-Fusionen	85
4	Diskussion	87
4.1	Verhalten gefalteter und ungefalteter Tat-Substrate beim Thylakoidtransport	87
4.1.1	Die chimären EGFP-Substrate 16/EGFP und i16/EGFP werden <i>in vitro</i> über den Δ pH/Tat-Weg transportiert und zeigen ein Translokationsintermediat	88
4.1.2	Expressionsverhalten der EGFP-Chimäre	89
4.1.3	Reinigung der <i>inclusion bodies</i> – ein wichtiger Schritt bei der denaturierenden Präparation von Proteinen	90
4.1.4	Faltung und Faltungsgrad der exprimierten und <i>in vitro</i> translatierten EGFP-Substrate	91
4.1.5	Stabilitätsprobleme der EGFP-Substrate	92
4.1.6	Zustandsänderungen des EGFP-Chromophors bei der Entfaltung	93
4.1.7	Das Signalpeptid des i16/EGFP bildet bei der Interaktion mit membranähnlichen Grenzschichten α -helikale Strukturen aus	95
4.1.8	Sowohl 16/EGFP als auch i16/EGFP kompetieren die Translokation	97
4.1.9	Aktivierungseffekte der Tat-Translokase bei geringen Konkretorkonzentrationen	99
4.1.10	Das exprimierte gefaltete 16/EGFP wird <i>in vitro</i> transportiert	100
4.2	Die Thylakoidprozessierungspeptidase	101
4.2.1	Gibt es in Plastiden nur eine TPP?	101
4.2.2	Die TPP3 zeigt die höchste Homologie zu den bakteriellen Leaderpeptidasen	101
4.2.3	Nur die TPP3 wird <i>in vitro</i> in Chloroplasten importiert	102
4.2.4	Die TPP3 insertiert in die Thylakoidmembran	104
4.2.5	<i>In vivo</i> Studien der TPP	106
4.2.5.1	<i>In vivo</i> Lokalisierung der verkürzten EYFP-Konstrukte	107
4.2.5.2	<i>In vitro</i> Importversuche bestätigen die <i>in vivo</i> Lokalisierung der verkürzten EYFP-Konstrukte	107

4.2.5.3	<i>In vivo</i> Lokalisierung der Vollängen-EYFP-Konstrukte von TPP1 und TPP3	108
4.2.5.4	Überlegungen über mögliche Funktionen der TPP1 und TPP2	108
5	Material und Methoden	110
5.1	Materialien	110
5.1.1	Chemikalien	110
5.1.2	Antibiotika	110
5.1.3	Kulturmedien	110
5.1.4	Enzyme	111
5.1.5	Längenstandards/Marker	112
5.1.6	Reaktionskits	112
5.1.7	Säulenmaterialien und FPLC-Säulen	112
5.1.8	Nukleotide/Oligonukleotide	112
5.1.9	Bakterienstämme	113
5.1.10	Vektoren	114
5.1.11	cDNA-Klone für die <i>in vitro</i> Transkription und <i>in vitro</i> Translation	114
5.1.12	Klone für die heterologe Überexpression in <i>E. coli</i>	115
5.1.13	Klone für die <i>in vivo</i> Analysen	115
5.1.14	Antikörper	115
5.1.15	„Tag“-freies EGFP	115
5.2	Methoden	116
5.2.1	Pflanzenanzucht	116
5.2.2	Anzucht und Transformation der <i>E. coli</i> Zellen	116
5.2.2.1	Herstellung elektrokompenter Zellen	116
5.2.2.2	<i>E. coli</i> Transformation mittels Elektroporation	116
5.2.2.3	Herstellung Hitzeschock-kompetenter Zellen	116
5.2.2.4	<i>E. coli</i> Transformation mittels Hitzeschock	117
5.2.3	Molekularbiologische Methoden	117
5.2.3.1	Klonierung der cDNAs für die <i>in vitro</i> Transkription und <i>in vitro</i> Translation	117
5.2.3.2	Klonierung in die Expressionsvektoren	118
5.2.3.3	Klonierung für die <i>in vivo</i> Analysen	118
5.2.3.4	Übersicht der Klonierungen	118
5.2.3.5	Kolonien-PCR	119
5.2.3.6	<i>In vitro</i> Transkription	119
5.2.3.7	<i>In vitro</i> Translation	120

5.2.3.8	Sequenzierung	121
5.2.4	Biochemische Methoden	121
5.2.4.1	TCA-Fällung	121
5.2.4.2	Proteinbestimmung nach Gill & von Hippel	121
5.2.4.3	Proteinbestimmung nach Bradford	121
5.2.4.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	122
5.2.4.5	Native Gelelektrophorese (BN-PAGE, CN-PAGE)	123
5.2.4.6	Coomassie-Colloidal-Färbung	123
5.2.4.7	Silberfärbung	123
5.2.4.8	Western-Analyse	123
5.2.5	Heterologe Überexpression in <i>E. coli</i>	124
5.2.5.1	Analytische Überexpression in <i>E. coli</i>	124
5.2.5.2	Präparative Überexpression in <i>E. coli</i> und Reinigung der <i>inclusion bodies</i>	126
5.2.6	Rückfaltung der EGFP-Substrate	127
5.2.7	Ni-Affinitätschromatographie	127
5.2.8	Ionenenaustauschchromatographie (FPLC)	128
5.2.9	Methoden zum <i>in vitro</i> Import	130
5.2.9.1	Isolierung von Thylakoidvesikeln	130
5.2.9.2	<i>In thylakoido</i> Importexperimente	130
5.2.9.3	Variationen des <i>in thylakoido</i> Importansatzes – Kompeti- tionen	131
5.2.9.4	Berechnung der IC ₅₀ -Werte	132
5.2.9.5	Präparation von Chloroplasten und Mitochondrien aus <i>Pi-</i> <i>sum sativum</i>	132
5.2.9.6	Zellaufschluss und differentielle Zentrifugation	134
5.2.9.7	Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation	134
5.2.9.8	Chlorophyllbestimmung	135
5.2.9.9	Proteinbestimmung der Mitochondrien (nach Bradford)	135
5.2.10	<i>In organello</i> Import (paralleler Ansatz)	135
5.2.11	Chloroplastenimport mit Subfraktionierung	137
5.2.12	Biolistische Transformation	137
5.2.13	Filmwaage/IRRAS	138
 Literaturverzeichnis		 139
 Erklärung		 162
 Danksagung		 163

Publikationsliste	165
Lebenslauf	166

Abbildungsverzeichnis

2.1	Transitpeptide	7
2.2	Transportwege	8
2.3	GFP-Chromophor	15
2.4	GFP-Struktur	16
2.5	Chromophor H-Brücken	17
2.6	GFP-Standardspektren	19
3.1	<i>In thylakoido</i> Import (schematisch)	22
3.2	<i>In thylakoido</i> import 23/23 und PC/PC	24
3.3	zeitabhängiger Import des 23/23	25
3.4	EGFP-Chimera (Übersicht)	27
3.5	EGFP-Chimera (<i>in vitro</i> Transport)	28
3.6	Strategie – Expression, Rückfaltung, Reinigung	29
3.7	Expression und Subfraktionierung	30
3.8	Reinigung der <i>inclusion bodies</i>	32
3.9	Ni-Affinitätsreinigung des 16/EGFP	34
3.10	IEX-Reinigung 16/EGFP (Ettan-FPLC)	35
3.11	IEX-Reinigung i16/EGFP, EGFP (Ettan-FPLC)	36
3.12	Faltungsgrad	37
3.13	Stabilität und Präzipitation	38
3.14	Degradation der EGFP-Substrate	39
3.15	UV/VIS-Spektren i16/EGFP, EGFP	40
3.16	UV/VIS-Spektren 16/EGFP, i16/EGFP	41
3.17	UV/VIS-Spektrum i16/EGFP (nativ/denaturiert)	42
3.18	CD-Spektren allgemein	44
3.19	CD-Spektren 16/EGFP und i16/EGFP	45
3.20	CD-Spektren von entfalteten i16/EGFP	46
3.21	Kompetitionsmodell	47
3.22	Kompetition 16/EGFP	48
3.23	Kompetition 16/EGFP (Verdünnungsreihe)	49
3.24	Kompetition 16/EGFP, i16/EGFP (Zusammenfassung, IC ₅₀)	50

3.25	Translokationsintermediate des 16/23	52
3.26	Kompetition des 16/23 mit 16/EGFP	53
3.27	Kompetition des 16/23 mit 16/EGFP (Zusammenfassung, IC ₅₀)	54
3.28	<i>In vitro</i> Import des gereinigten 16/EGFP	55
3.29	IRRAS und Filmwaage (Schema)	57
3.30	Filmwaage (Schema)	58
3.31	Membraninsertion von i16/EGFP (Filmwaagemessungen)	59
3.32	Strukturbildung des i16/EGFP (IRRA-Spektren)	60
3.33	i16/EGFP und EGFP an der Luft/Wasser-Grenzfläche (IRRA-Spektren)	61
3.34	Proteinalignment TPP und SynLeps	63
3.35	Proteinalignment von TPP1,2 und 3 untereinander	64
3.36	Proteinalignment Übersicht	65
3.37	TMHMM	66
3.38	Hydrophobizitätsplots	67
3.39	Hydrophobizitätsplots (verkürzte TPP3)	68
3.40	DNA-Array-Analyse) (GENESTIGATOR)	70
3.41	<i>In organello</i> Import der TPP (Chloroplasten und Mitochondrien)	72
3.42	<i>In organello</i> Import der TPP3 mit Subfraktionierung	74
3.43	Import und Native-PAGE der TPP3	76
3.44	TPP/EYFP-Konstrukte	77
3.45	Biolistische Transformation	78
3.46	TPP1-AS/EYFP (Erbse) - CLSM	80
3.47	TPP2-AS/EYFP (Erbse) - CLSM	81
3.48	TPP3-AS/EYFP (Erbse) - CLSM	81
3.49	<i>In organello</i> Import der TPP-AS/EYFPs (Chloroplasten und Mitochondrien)	82
3.50	TPP1/EYFP (Erbse) - CLSM	84
3.51	TPP3/EYFP (Erbse) - CLSM	85
4.1	TPP-Modell	104
5.1	Verdünnungsreihe (Modell)	131

Tabellenverzeichnis

2.1	GFP-Spektrenmutanten	18
3.1	Absorptionskoeffizienten	34
3.2	TPP-Homologe	62
3.3	Lokalisierungsvorhersagen	69
3.4	Zusammenfassung TPP-Lokalisierung	86

Abkürzungsverzeichnis

Allgemeine Abkürzungen, Chemikalien, Nukleinsäuren und Maßeinheiten:

°C	Grad Celsius
Δ pH	Protonengradient
ϵ	Molarer Absorptionskoeffizient (Epsilon)
λ	Wellenlänge (Lambda)
Ψ	Membranpotential (Psi)
Θ	Eliptizität (Theta)
A	Adenin
Abs _x	Absorption bei der Wellenlänge x
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
<i>Arabidopsis</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Arbeitskonz.	Arbeitskonzentration
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BN	<i>Blue Native</i>
BSA	Rinderserumalbumin
c	Konzentration
C	Cytosin
C-terminal	Carboxy-terminal
Cam ^R	Chloramphenicol-Resistenz
CAP	CAP-Strukturanalogon (m7G(5')ppp(5')G)
CD	Circulardichroismus
cDNA	komplementäre DNA (<i>copy</i> -DNA)
CLSM	<i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i> (konvokale Laser-scanning Mikroskopie)
CN	<i>Colorless Native</i>
Col-0	Columbia-0, Ökotyp von <i>Arabidopsis thaliana</i>
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DGDG	Digalactosyldiacylglycerol
dmol	Dezimol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Didesoxynukleosid-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat

DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EB	Extraktionspuffer
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
G	Guanin
GP	Gradientpuffer
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
Gua	Guanidin
Gua/HCl	Guanidinhydrochlorid
h	Stunde
<i>hcf</i>	<i>High Chlorophyll Fluorescence</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HM	HEPES Magnesium
HME	HM inkl. EDTA
HRP	<i>Horse Radish Peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
IEX	<i>Ion Exchange Chromatography</i> Ionenaustauschchromatographie
IgG	Immunglobulin G
IR	Infrarot
IRRAS	Externe Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IVTL	<i>in vitro</i> Translation
Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	Molar
MGDG	Monogalactosyldiacylglycerol
min	Minute
mM	Millimolar
mN	Millinewton
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> (Boten-)RNA
MRW	<i>Mean Residue Weight</i> (mittleres Aminosäuregewicht)
nm	Nanometer
N-terminal	Amino-terminal
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
ng	Nanogramm
Nig	Nigericin
OD _x	Optische Dichte bei der Wellenlänge x
PAA	Polyacrylamid
³⁵ S	radioaktives Schwefelisotop
p.a.	<i>per analysis</i> , zur Analyse
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
pBSC	Bluescript-Vektor
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PG	Phosphatidylglycerol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RB	Resuspensionspuffer
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
Sec	<i>secretory</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SQDG	Sulfochinovosyldiacylglycerol
SRM	Saccharoseresuspensionsmedium
Strep	Streptavidin
T	Thymin
t/d	Zeit in Tagen
Tab.	Tabelle
Ti	Translokationsintermediat
TL	Thermolysin
„tag“	Anhang/Markierung (z.B. Histidin-Tag)
Tat	<i>Twin Arginine Translocation</i>
<i>Taq</i> -Polymerase	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i> (Einheit der Enzymaktivität)
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV/VIS	Spektroskopie im ultravioletten (UV) und sichtbaren (VIS) Wellenlängenbereich
V	Volt
v/v	Volumen zu Volumen
WB	Waschpuffer
wl	Wellenlänge
wt	Wildtyp
w/v	Masse/Gewicht pro Volumen
x g	das x-fache der Erdbeschleunigung

Abkürzungen für Polypeptide und Proteinkomplexe:

16 kDa-Protein (16/16)	16 kDa-Protein des Wasserspaltungsapparates von Photosystem II
23 kDa-Protein (23/23)	23 kDa-Protein des Wasserspaltungsapparates von Photosystem II
33 kDa-Protein (33/33)	33 kDa-Protein des Wasserspaltungsapparates von Photosystem II
CF ₀ II	Untereinheit II der ATP-Synthase

CP24	CP24-Komplex von Photosystem II
Cpn60	<i>Chaperonin 60</i>
cpTatC	plastidäres Homologe des bakteriellen TatC
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EYFP	<i>Enhanced Yellow Fluorescent Protein</i>
FNR	Ferredoxin-NADP ⁺ -Oxidoreduktase
Hcf106	plastidäres Homologe des bakteriellen TatB
IMP	<i>Inner Membrane Peptidase</i>
Lep	<i>Leader Peptidase</i>
LHC-II	Antennenkomplex von Photosystem II
LHCP	Apoprotein des Lichtsammelkomplexes von Photosystem II
LTD	<i>Lumen Targeting Domain</i> (lumendirigierende Domäne)
<i>mature</i> (m)	reifes Protein
MPP	Matrixprozessierungspeptidase
<i>precursor</i> (p)	Vorläuferprotein
PC (PC/PC)	Plastocyanin
PS-II	Photosystem II
Rieske (Ri)	Rieske[2Fe-2S]-Protein des Cytochrom <i>b₆/f</i> -Komplex
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
SRP	<i>Signal Recognition Particle</i> (Signalerkennungspartikel)
SPP	Stromaprozessierungspeptidase
STD	<i>Stroma Targeting Domain</i> (stromadirigierende Domäne)
TatA,B,C	Untereinheiten der Tat-Translokase
Tic	<i>Translocon at the Inner envelope membrane of Chloroplasts</i>
Tim	<i>Translocon of the Inner Mitochondrial membrane</i>
Tha4	plastidäres Homologe des bakteriellen TatA
Toc	<i>Translocon at the Outer envelope membrane of Chloroplasts</i>
Tom	<i>Translocon of the Outer Mitochondrial membrane</i>
TPP	Thylakoidprozessierungspeptidase
TTD	<i>Thylakoid Targeting Domain</i> (thylakoiddirigierende Domäne)

Aminosäuren mit Drei- und Einbuchstabencode:

Alanin	(Ala)	A	Leucin	(Leu)	L
Arginin	(Arg)	R	Lysin	(Lys)	K
Asparagin	(Asn)	N	Methionin	(Met)	M
Asparaginsäure	(Asp)	D	Phenylalanin	(Phe)	F
Cystein	(Cys)	C	Prolin	(Pro)	P
Glutamin	(Gln)	Q	Serin	(Ser)	S
Glutaminsäure	(Glu)	E	Threonin	(Thr)	T
Glycin	(Gly)	G	Tryptophan	(Trp)	W
Histidin	(His)	H	Tyrosin	(Tyr)	Y
Isoleucin	(Ile)	I	Valin	(Val)	V

1 Zusammenfassung

Der $\Delta\text{pH}/\text{Tat}$ -Weg ist einer von vier Wegen über die Proteine in die Thylakoide transportiert werden können. Der Transport selbst ist dabei *in vitro* nur von dem Protonengradient der Thylakoidmembran abhängig. Stromale Faktoren oder Nukleosidtriphosphate werden für den Transport nicht benötigt. Die Substrate dieses Weges tragen ein konserviertes Zwillingsarginin-Motiv, welches namensgebend für diesen Transportweg ist (*Tat – Twin Arginine Translocation*). Eine Besonderheit des $\Delta\text{pH}/\text{Tat}$ -Weges ist die Fähigkeit, vollständig gefaltete Proteine zu transportieren. Der Faltungsgrad der authentischen $\Delta\text{pH}/\text{Tat}$ -Substrate kann nicht direkt bestimmt werden. Aus diesem Grund wurden im ersten Teil der vorliegenden Arbeit chimäre Substrate erstellt, bei denen die Transportinformation eines authentischen Substrats mit einer Variante des Grün Fluoreszierenden Proteins (EGFP) als Passagier fusioniert wurde. Auf dieser Basis sollte untersucht werden, inwiefern der Faltungszustand des $\Delta\text{pH}/\text{Tat}$ -Substrats einen Einfluss auf dessen Transport besitzt und welche Struktur die Transportinformation in Lösung bzw. bei Interaktion mit hydrophoben Grenzflächen annimmt.

Als chimäre EGFP-Substrate wurden ein vollständiges Vorläuferprotein 16/EGFP (Transitpeptid des 16 kDa-Proteins des Wasserspaltungsapparates und EGFP) und ein Stromaintermediat i16/EGFP erstellt. Das 16/EGFP entspricht dabei dem kerncodierten Substrat nach der Translation im Cytosol und das i16/EGFP dem Intermediat, welches entsteht, wenn der stromadirigierende Teil des Transportsignals nach dem Transport in den Chloroplasten von der stromalen Prozessierungspeptidase abgespalten wurde. Dieses Intermediat entspricht damit der Form eines Substrats, wie es *in vivo* auf die Thylakoidmembran treffen würde. Beide Substrate wurden für *in vitro* Untersuchungen und für die Überexpression in *E. coli* in entsprechende Vektoren kloniert. Es konnte ein Protokoll entwickelt werden, dass es ermöglichte exprimierte Substrate zu gewinnen, die eine Reinheit von über 95% und einen Faltungsgrad von mehr als 90% besitzen.

Mit Hilfe von CD-Messungen der gereinigten und gefalteten Substrate konnte gezeigt werden, dass das vollständige Transitpeptid sowie die thylakoiddirigierende Domäne (Signalpeptid) in wässriger Lösung keine Sekundärstrukturen besitzen und in einer Zufallsstruktur (*random coil*) vorliegen. Allerdings konnte mit Filmwaagemessungen gezeigt werden, dass das i16/EGFP in thylakoidähnliche Monolipidschichten insertiert. IRRAS-Messungen haben gezeigt, dass es dabei zur Ausbildung α -helikaler Strukturen kommt.

Vergleichende Experimente an der Luft/Wasser-Grenzfläche zeigten, dass die Strukturbildung nur durch die Wechselwirkung des Signalpeptids mit der hydrophoben Grenzfläche erzeugt wird. Eine Membran ist demnach dafür nicht notwendig, verstärkt jedoch diesen Effekt.

In *in vitro* Konkurrenzexperimenten konnte gezeigt werden, dass sowohl die gefalteten als auch die ungefalteten Substrate den Transport eines authentischen $\Delta\text{pH}/\text{Tat}$ -Substrats beeinflussen. Dabei besitzen gefaltete EGFP-Fusionsproteine einen mehr als 10fach stärkeren Effekt als das Ungefaltete. Mit Hilfe der Analyse der Konkurrenzwirkung auf das chimäre 16/23 konnte gezeigt werden, dass weder die initiale Insertion des Tat-Substrats in die Membran noch die Prozessierung des Substrats den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellen. Demzufolge muss die Konkurrenz entweder nach der Bindung des Substrats an die Translokase oder beim eigentlichen Translokationsschritt erfolgen.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Analyse der Thylakoidprozessierungspeptidase (TPP) aus *Arabidopsis thaliana*. Diese Typ I-Signalpeptidase spaltet die Transportinformation von Substraten ab, nachdem diese in die Thylakoide transportiert wurden. In Pflanzen ist bisher über die TPP wenig bekannt. In *Arabidopsis thaliana* existieren drei Gene, die zu den Leaderpeptidasen aus *Synechocystis sp.* und *E.coli* homolog sind. Das Ziel dieses Teils der Arbeit war zu analysieren, welche Lokalisierung und damit verbunden, welche Funktion die einzelnen Homologen in *Arabidopsis thaliana* besitzen.

Bereits umfangreiche *in silico* Analysen legten nahe, dass die drei TPP (TPP1, TPP2 und TPP3) eine unterschiedliche Lokalisierung zeigen. Es konnte gezeigt werden, dass die TPP3 eine deutlich höhere Ähnlichkeit zur essentiellen Leaderpeptidase LepB2 aus *Synechocystis sp.* aufweist. Vorhersageprogramme deuteten nur im Fall der TPP3 eindeutig auf eine chloroplastidäre Lokalisierung hin.

Experimente zum Transport von radioaktiv markierten Vorläuferproteinen der TPP in Chloroplasten und Mitochondrien (*in organello* Import) zeigten für die authentischen TPP1 und TPP2 eine ausschließliche Mitochondrienlokalisierung. Allerdings konnten EYFP-Fusionen der TPP1 und TPP2 durch transiente Transformation in Erbsenblätter *in vivo* sowohl in Mitochondrien als auch in Plastiden nachgewiesen werden.

Für die TPP3 konnte sowohl *in organello* als auch *in vivo* eine plastidäre Lokalisierung gezeigt werden. Dabei inseriert die TPP3 als integrales Membranprotein mit transmembraner Topologie in die Thylakoidmembran. Weiterhin konnte ein Komplex im Stroma identifiziert werden, der auf eine Interaktion der TPP3 mit stromalen Komponenten schließen lässt. Aufgrund dieser Ergebnisse muss davon ausgegangen werden, dass vermutlich nur die TPP3 die Funktion der Prozessierungspeptidase in den Thylakoiden erfüllt.

2 Einleitung

Die Photosynthese bildet durch den bei der lichtgetriebenen Wasserspaltung freiwerdenden Sauerstoff die Grundlage des aeroben Lebens. Durch sie ist es möglich, die Sonnenenergie in Form von ATP und makromolekularen Kohlenwasserstoffen zu konservieren. Die Photosynthese findet in höheren Pflanzen in speziellen Organellen statt, den Chloroplasten. Diese gehören zur Gruppe der Plastiden und sind ubiquitär in den Pflanzenzellen verbreitet (Whatley, 1978). Die Chloroplasten bilden in den Pflanzenzellen das Zentrum der Kohlenstofffixierung und sind ein wichtiger Bestandteil des primären und sekundären Stoffwechsels (Nelson & Ben-Shem, 2004; Lopez-Juez & Pyke, 2005). Der Ursprung photosyntheseähnlicher Prozesse der Kohlenstofffixierung geht bis auf die Purpurbakterien zurück. Diese sind mit einem Urtyp des Photosyntheseapparates bereits in der Lage, durch lichtgetriebenen, zyklischen Elektronentransport einen Protonengradienten aufzubauen. Die Elektronen für die Redoxäquivalente beziehen diese Bakterien unter ATP-Verbrauch zunächst von externen Elektronendonatoren (z.B. H_2S). Erst die Cyanobakterien waren vor ca. drei Milliarden Jahren erstmals in der Lage, Wasser als Elektronendonator zu nutzen. Der dabei freiwerdende Sauerstoff ermöglichte die Entwicklung aeroben Lebens und stellte damit einen bedeutenden Evolutionssprung in der Entwicklung höherer Lebensformen dar.

Schon länger galten aufgrund der Ähnlichkeit der Photosynthesemaschinerie Cyanobakterien als Vorläufer der Chloroplasten. Diese Verwandtschaft konnte durch aktuelle Genomvergleiche bestätigt werden (McFadden, 1999; Larkum et al., 2007; Reyes-Prieto et al., 2007). Als Vorläufer der Mitochondrien gelten die α -Proteobakterien (Gray et al., 1999). Die Entstehung der eukaryotischen Organellen, wie Chloroplasten und Mitochondrien, erfolgte dabei entsprechend der heute weitestgehend akzeptierten Endosymbiontentheorie (Mereschkowsky, 1905; Weeden, 1981; Gray & Doolittle, 1982). Diese beschreibt die Bildung der Organellen als Folge der Einwanderung von Prokaryonten in Eukaryonten. Im weiteren Verlauf der Evolution verlagerte sich ein Großteil des bakteriellen Genoms in den Zellkern, wodurch die Endosymbionten ihre Eigenständigkeit verloren (Martin et al., 2002). Dieser Gentransfer erfolgte jedoch nicht nur in Richtung des Zellkerns, auch ursprünglich kerncodierte Gene wanderten in die Organellen (Mühlenhoff et al., 1993). Die Organellen behielten allerdings ein funktionelles Restgenom (Mereschkowsky, 1905; Weeden, 1981; Gray & Doolittle, 1982) und gelten aufgrund der Abhängigkeit vom Zellkern als

„semiautonom“. Heute werden nur noch 100–150 Gene vom plastidären Genom codiert (Sugiura, 1995; Martin et al., 2002; Leister, 2003; Timmis et al., 2004). Die restlichen ca. 2900 Gene (mehr als 90%), die der Chloroplast für seine vollständige Funktionalität benötigt, sind kerncodiert (Richly & Leister, 2004; Keegstra & Cline, 1999; Leister, 2003).

Die Chloroplasten selbst sind ellipsoide Organellen mit einem Durchmesser zwischen 5 und 10 μm . Pro Pflanzenzelle variiert die Anzahl der Chloroplasten im Bereich von 1–50. Die Chloroplastenhülle besteht aus einer Doppelmembran, die ihrerseits das Stroma und die darin liegenden Thylakoide umschließt. Die Thylakoide sind der eigentliche Ort der Lichtreaktion der Photosynthese und enthalten ein Membransystem, bestehend aus stapelförmig übereinander liegenden Granathylakoiden, die durch Stromathylakoide miteinander verbunden sind. Die Thylakoidmembran grenzt das innenliegende Lumen vom Stroma ab. Der Photosyntheseapparat der Thylakoide besteht aus vier Komplexen und ist in den Thylakoidmembranen lokalisiert. Dabei liegen die Multiproteinkomplexe des Photosystems I und der ATP-Synthase überwiegend in den Stromathylakoiden, die des Photosystems II innerhalb der Granathylakoide. Der Cytochrom b_6/f -Komplex ist dagegen gleichmäßig in der Thylakoidmembran verteilt.

Die Proteine der Photosynthesekomplexe sind sowohl kerncodiert als auch zum Teil plastidencodiert, wobei die kerncodierten Proteine den weitaus größten Anteil ausmachen. Diese Proteine werden im Cytosol synthetisiert und müssen an ihren Wirkort transportiert werden. Daraus ergibt sich jedoch ein wichtiges Problem. Bei diesem Transport müssen diese Proteine z.T. mehrere Membranen überqueren (Agarraberes & Dice, 2001). Im Fall der lumenalen Thylakoidproteine sind dies drei Membranen, die beiden Hüllmembranen des Chloroplasten und die Thylakoidmembran. Bei den Transportvorgängen wird zwischen zwei Formen unterschieden. Werden Proteine aus plasmatischen Räumen (z.B. Cytosol, Stroma) in nicht plasmatische Räume (z.B. Periplasma, Thylakoidlumen) transportiert, wird dieser Prozess als „Export“ bezeichnet. Transportvorgänge zwischen zwei plasmatischen Räumen, wie z.B. der Transport von Proteinen aus dem Cytosol in das Stroma der Chloroplasten werden dagegen als „Import“ bezeichnet (Schatz & Dobberstein, 1996). Im Gegensatz zu dieser „Definition“ hat sich sowohl für Transportvorgänge vom Cytosol in die Organellen als auch für den Transport vom Stroma ins Lumen die Bezeichnung Proteinimport durchgesetzt. Auch innerhalb dieser Arbeit wurde diese Beschreibung verwendet.

2.1 Bedeutung und Struktur der Transitpeptide

Die kerncodierten plastidär oder mitochondriell lokalisierten Proteine werden im Cytosol als Vorläuferproteine, sogenannte „*Precursor*“, synthetisiert. Sie tragen eine N-terminale Erweiterung, welche die Information für ihren entsprechenden Bestimmungsort enthält und nach dem erfolgreichen Transport partiell oder vollständig abgespalten wird (Hageman et al., 1986; James et al., 1989; Michl et al., 1994; Nielsen et al., 1994). Die Transportsignale der Chloroplastenproteine (Transitpeptide) umfassen durchschnittlich 50 Aminosäurereste, die der mitochondrialen Proteine (Präsequenzen) im Mittel 40 Aminosäurereste (Glaser et al., 1998; von Heijne et al., 1989). Allerdings ist die Sortierung zwischen Chloroplasten und Mitochondrien nicht immer nur auf ein Organell beschränkt. Es gibt Proteine, die in beide Organellen transportiert werden. Das Transportverhalten von Proteinen mit einer solchen dualen Lokalisierung wird als „*Dual Targeting*“ bezeichnet (Small et al., 1998). Als Beispiel sind Aminoacyl-tRNA-Synthetasen zu nennen, die in beiden Organellen die gleiche Funktion erfüllen (Duchene et al., 2005). Die Ursache für das „*Dual Targeting*“ ist bisher nicht geklärt und wird unterschiedlich diskutiert (Peeters & Small, 2001; Pujol et al., 2007).

Im Fall der Chloroplastenproteine werden die Transitpeptide von Rezeptoren der plastidären Hüllmembran erkannt und posttranslationell und unter Energieverbrauch ins Stroma transportiert. Dieser Transport wird von zwei Multiproteinkomplexen in den Hüllmembranen vermittelt, dem TOC-Komplex (*Translocon at the Outer envelope membrane of Chloroplasts*) in der äußeren Hüllmembran und dem TIC-Komplex (*Translocon at the Inner envelope membrane of Chloroplasts*) in der inneren Hüllmembran (Keegstra & Cline, 1999; Soll & Schleiff, 2004; Bedard & Jarvis, 2005; Gutensohn et al., 2006; Kessler & Schnell, 2006; Jarvis, 2008). Der Transport in die Mitochondrien wird ebenfalls über zwei analoge Transportkomplexe vermittelt, dem TOM-Komplex (*Translocon of the Outer Mitochondrial membrane*) und dem TIM-Komplex (*Translocon of the Inner Mitochondrial membrane*) (Bohnert et al., 2007; Neupert & Herrmann, 2007).

Die plastidären Transitpeptide lassen sich in zwei Klassen unterteilen, die einfachen und die zusammengesetzten Transitpeptide. Die erste Klasse sind einfache Transitpeptide, die nur das Transportsignal für den Import über die Hüllmembran des Chloroplasten enthalten. Nach dem erfolgreichen Transport werden diese von der stromalen Prozessierungspeptidase (SPP) abgespalten (Robinson & Ellis, 1984; Robinson et al., 1994; Richter & Lamppa, 2002; Tamura et al., 2008). Die weitere Funktion innerhalb des Stromas (z.B. Einbau in stromale Komplexe) wird durch den reifen Teil des Proteins bestimmt (z.B. FNR, kleine Untereinheit der Rubisco). Für diese Klasse der einfachen Transitpeptide

existieren allerdings Ausnahmen. So gibt es einige Thylakoidproteine mit einem Transitpeptid, bei dem das thylakoiddirigierende Signal nicht abgespalten wird und dementsprechend Bestandteil des reifen Proteins ist (z.B. Rieske, LHCP – Apoprotein des LHC-II Komplexes, CP24 – 20 kDa-Apoprotein des CP24-Komplexes von PS-II) (Viitanen et al., 1988; Madueno et al., 1993; Molik et al., 2001).

Die zweite Klasse von Transitpeptiden sind zusammengesetzte Transitpeptide (Smeekens et al., 1986; Ko & Cashmore, 1989; Hageman et al., 1990). Diese bestehen aus einem Teil, der für den Transport ins Stroma verantwortlich ist und als stromadirigierende Domäne (STD, *Stroma Targeting Domain*) bezeichnet wird. Dieser stromadirigierende Teil wird, wie bei den einfachen Transitpeptiden, in den meisten Fällen von der SPP abgespalten (Robinson & Ellis, 1984; Robinson et al., 1994; Richter & Lamppa, 2002). Es entsteht ein Transportintermediat, welches nur noch den thylakoid- bzw. lumendirigierenden Teil (TTD bzw. LTD, *Thylakoid/Lumenal Targeting Domain*) des Transportsignals enthält. Dieser Teil wird nach dem Transport in das Thylakoidlumen durch die Thylakoidprozessierungspeptidase abgespalten (Hageman et al., 1986; Kirwin et al., 1987, 1988). Eine Ausnahme stellen das CF₀II und die Untereinheit N des Photosystems I (PsaN) dar. Diese werden durch die SPP nicht prozessiert, inserieren spontan in die Membran und das vollständige Transportsignal wird nach der Insertion von der TPP abgespalten (Michl et al., 1994; Nielsen et al., 1994). Eine Übersicht über die Struktur und die Prozessierung der Transitpeptide ist in Abbildung 2.1, A+B dargestellt.

Sequenzvergleiche verschiedener stromadirigierender Domänen (STD) untereinander ergaben bisher keine Sequenzhomologien, allerdings sind die STD reich an Serin- und Threoninresten und es gibt kaum Aminosäuren mit negativ geladenen Seitenketten (von Heijne et al., 1989; Schatz & Dobberstein, 1996). Weiterhin sind für die STD in wässriger Lösung keine Strukturen bekannt. Es konnte jedoch in hydrophober Umgebung die Bildung von α -helikalen Strukturen beobachtet werden (Wienk et al., 1999, 2000; Bruce, 2001).

Die thylakoiddirigierenden Domänen (TTD) sind den Signalpeptiden der Proteine des Endoplasmatischen Retikulums (ER) sehr ähnlich (Schatz & Dobberstein, 1996; Settles & Martienssen, 1998; Dalbey & Robinson, 1999) und zeigen strukturell einen einheitlichen Aufbau (siehe Abbildung 2.1, C). Deshalb werden sie häufig ebenfalls als Signalpeptid bezeichnet. Sie unterteilen sich in drei Bereiche, eine hydrophile und positiv geladene N-terminale Region (N-Region), eine hydrophobe Kernregion (H-Region) und eine polare C-terminale Region (C-Region). Die polare Region endet mit einem charakteristischen Ala-X-Ala Motiv (an Position -3 und -1, relativ zur Spaltstelle) (von Heijne et al., 1989; von Heijne, 1985; Bassham et al., 1991), welches von der TPP der bakteriellen Leaderpep-

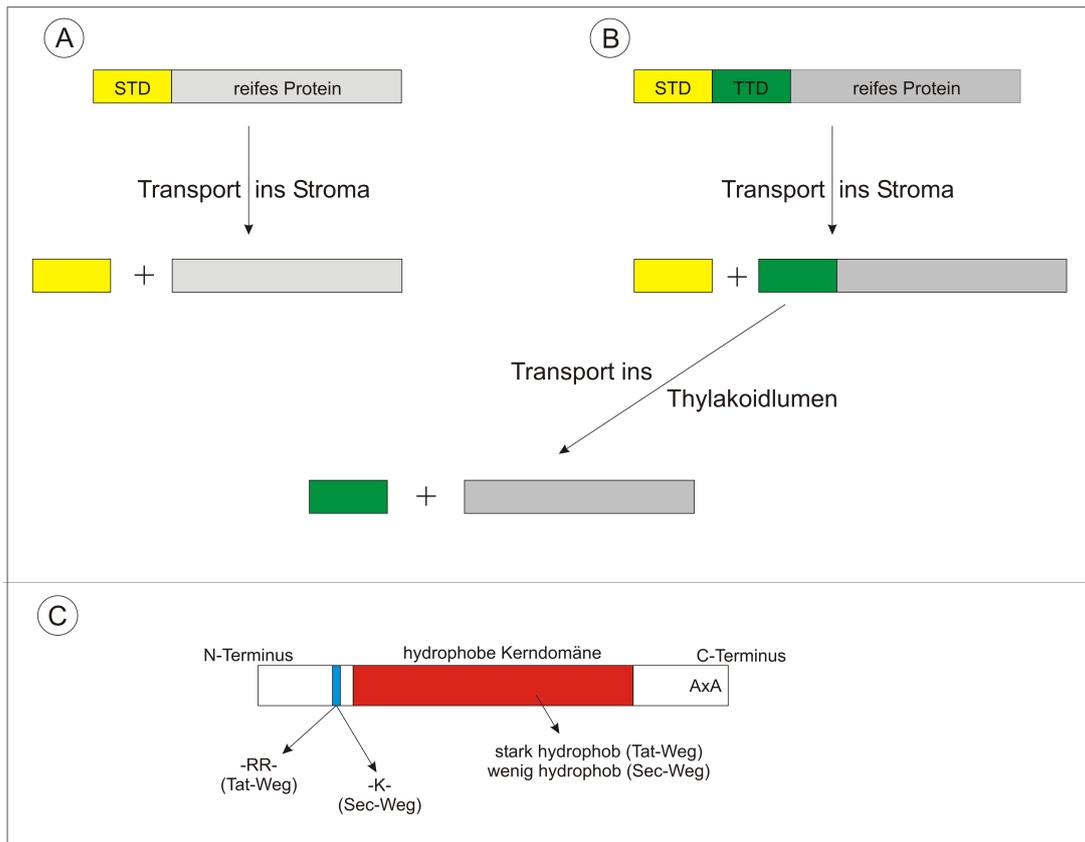


Abb. 2.1: Aufbau kerncodierter Vorläuferproteine und Struktur der Transitpeptide und thylakoiddirigierender Signalsequenzen. Die Abbildung zeigt die Spaltung des einfachen Transitpeptids beim Transport ins Stroma (**A**) bzw. des zusammengesetzten Transitpeptids beim Transport ins Thylakoidlumen (**B**). Die stromadirigierende Domäne des Transitpeptids (STD) wird nach dem Transport ins Stroma von der stromalen Prozessierungspeptidase (SPP), die thylakoiddirigierende Domäne (TTD) nach dem Transport in die Thylakoide von der Thylakoidprozessierungspeptidase (TPP) abgespalten. Der untere Teil (**C**) stellt die allgemeine Struktur eines thylakoiddirigierenden Transitpeptids dar und zeigt die für den Tat- und Sec-Weg bestehenden spezifischen Unterschiede.

tidase erkannt wird (Zwizinski & Wickner, 1980; Dierstein & Wickner, 1986; Fikes et al., 1990; Shackleton & Robinson, 1991; Shen et al., 1991; Karamyshev et al., 1998). Genauere Untersuchungen an den Signalpeptiden von Substraten des Sec- bzw. des Δ pH/TAT-abhängigen Weges ergaben, dass eine Lysin-Seitenkette am Übergang der N-Region zur H-Region charakteristisch ist (Chaddock et al., 1995). Zwei aufeinander folgende Arginin-Reste (Zwillingsarginin-Motiv), gefolgt von einer positiven Ladung an Position +2 oder +3, leiten dagegen ein Protein zum Δ pH/TAT-abhängigen Weg (Chaddock et al., 1995; Bogsch et al., 1997; Henry et al., 1997; Brink et al., 1998). Δ pH/TAT-dirigierende Signalpeptide weisen stärker hydrophobe H-Regionen auf als Sec-dirigierende Signalpeptide (Henry et al., 1997). Einige Signalpeptide weisen positive Ladungen in ihrer C-Region auf, die einen Sec-Transport verhindern und als „*Sec-avoidance*“ Motiv diskutiert werden (Bogsch et al., 1997).

2.2 Transportwege über die Thylakoidmembran

Bisher sind vier verschiedene Transportwege bekannt, auf denen Proteine über die Thylakoidmembran transportiert bzw. in diese inseriert werden können (Cline & Henry, 1996; Klösgen, 1997; Robinson, 2000; Mori & Cline, 2001; Müller & Klösgen, 2005; Gutensohn et al., 2006). Dabei wird neben dem spontanen Transport, zwischen dem Sec-abhängigen (*SECretory*), dem SRP-abhängigen (*Signal Recognition Particle*) und dem Δ pH/Tat-abhängigen Transportweg (*Twin Arginine Translocation*) unterschieden. Eine Übersicht über die Transportwege ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

Die Information, über welchen der vier Wege ein Protein transportiert wird, befindet sich in den meisten Fällen innerhalb des Signalpeptids (Henry et al., 1994; Robinson et al., 1994). Eine Ausnahme bilden die SRP-Substrate, deren Transportinformation im reifen

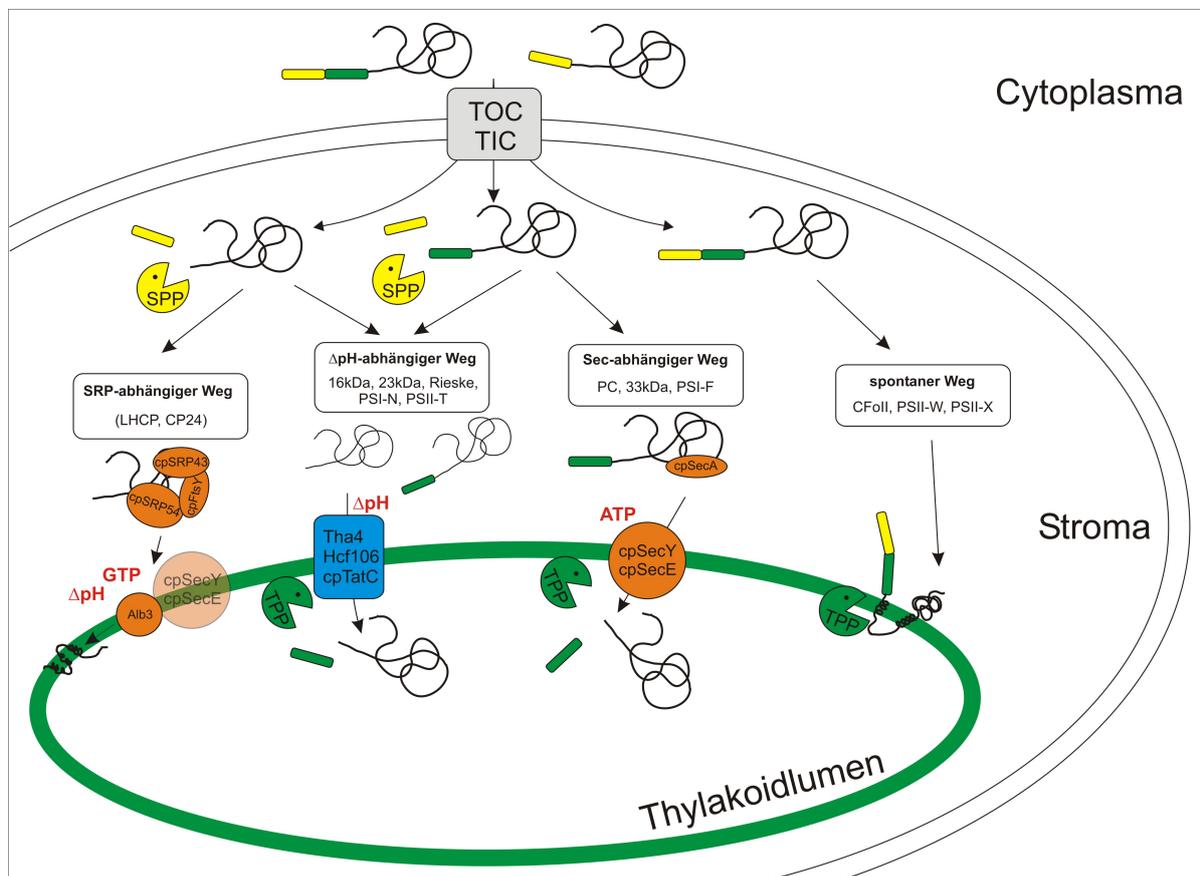


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Transportwege kerncodierter Proteine in die Thylakoide. Die Abbildung zeigt den Transport von kerncodierten Proteinen mit einfachen oder zusammengesetzten Transitpeptiden in die Thylakoide. Dabei wird in den meisten Fällen im Anschluss an den Import in die Chloroplasten der stromadirigierende Teil des Transitpeptids durch eine stromale Prozessierungspeptidase (SPP) abgespalten. Der folgende Transport in die Thylakoide wird durch thylakoiddirigierende Sequenzen im restlichen Transitpeptid oder wie im Fall des Rieske-Proteins im reifen Teil des Proteins bestimmt. Substrate des Sec- und SRP-abhängigen Weges benutzen dabei vermutlich die selbe Translokase. Die Reste des Transitpeptids werden nach erfolgreichem Thylakoidtransport durch die Thylakoidprozessierungspeptidase (TPP) abgespalten.

Teil des Proteins codiert ist (DeLille et al., 2000). Mit Ausnahme des spontanen Weges ist bei den anderen Transportwegen immer eine Art von Transportkomplex beteiligt, einer für den $\Delta\text{pH}/\text{Tat}$ -Weg sowie vermutlich ein gemeinsamer für den Sec-abhängigen und den SRP-Weg (Asai et al., 1999). Bezieht man sich dabei auf das bakterielle System, in welchem vom Sec- und SRP-Weg die selbe Translokase benutzt wird (Valent et al., 1998), so könnte auch in den Plastiden eine gemeinsame Translokase von den Substraten des Sec- und des SRP-Weges benutzt werden. Über den Sec- bzw. $\Delta\text{pH}/\text{Tat}$ -Weg werden hauptsächlich lösliche Proteine transportiert, bi- und polytope Membranproteine inserieren spontan in die Membran oder werden über den SRP-Weg in die Thylakoidmembran inseriert (Müller et al., 2001; Eichacker & Henry, 2001). Ausnahmen bilden das Cytochrom *f* und das Rieskeprotein. Diese zeigen, dass auch Membranproteine über den Sec- bzw. $\Delta\text{pH}/\text{Tat}$ -Weg transportiert werden können (Nohara et al., 1996; Molik et al., 2001).

2.2.1 Der SRP-abhängige Weg

Über diesen Transportweg werden ausschließlich integrale Membranproteine transportiert und in die Thylakoidmembran inseriert (Müller et al., 2001). Er wurde als Transportweg der polytopen LHC-Apoproteine (LHC – *Light Harvesting Complex*) entdeckt und charakterisiert (Li et al., 1995). Der SRP-abhängige Transport ist energetisch von der Hydrolyse des GTP und dem Protonengradient der Thylakoidmembran (in bisher nicht geklärter Form) abhängig (Hoffman & Franklin, 1994; Eichacker & Henry, 2001). Weiterhin sind die stromalen Komponenten cpSRP54 (Franklin & Hoffman, 1993; Li et al., 1995) und cpSRP43 (Schuenemann et al., 1998; Groves et al., 2001) sowie der stromale SRP-Rezeptor cpFtsY (analog dem bakteriellen FtsY) essentiell (Kogata et al., 1999; Tu et al., 1999). Ein weiteres Substrat dieses Weges ist das 20 kDa-Protein des CP24-Komplexes von Photosystem II (nahe verwandt mit LHCP) (Cai et al., 1993; Berghöfer, 1998). Neben den LHC-Proteinen und deren Verwandten konnte für das D1-Protein eine Interaktion mit dem cpSRP54 nachgewiesen werden (Nilsson et al., 1999). Allerdings wird das D1-Protein co-translationell in die Thylakoidmembran inseriert (Zhang & Aro, 2002). Zusätzlich wurde dabei eine Interaktion mit der SecY-Untereinheit der Sec-Translokase nachgewiesen (Zhang et al., 2001). Die Insertion der Proteine erfolgt über das membranständige Alb3. Dieses zeigt Homologien zu dem Oxa1p der inneren Membran der Mitochondrien und dem YidC in der Plasmamembran der Bakterien, die ebenso essentiell für die Insertion von Membranproteinen sind (Moore et al., 2000; Bellafore et al., 2002; Kuhn et al., 2003). Die gezeigte Interaktion des Alb3 mit der plastidären Sec-Translokase ist ein weiterer Hinweis für die enge Verbindung zwischen SRP- und Sec-abhängigem Weg (Klostermann et al., 2002; Dalbey & Chen, 2004). Es gibt erste Hinweise, das Alb3 möglicherweise auch bei der „spontanen“ Insertion einiger Proteine eine Rolle spielt

(Samuelson et al., 2000), wobei für sechs Substrate des plastidären „Spontanen Weges“ ein Einfluss von Alb3 ausgeschlossen werden konnte (Woolhead et al., 2001; Mant et al., 2001).

2.2.2 Der Sec-abhängige Weg

Der Sec-abhängige Weg dient hauptsächlich dem Transport von hydrophilen, lumenalen Proteinen, die dabei im ungefalteten Zustand transportiert werden (Schatz & Dobberstein, 1996). Er ist ATP-abhängig (Robinson et al., 1994), ein ΔpH unterstützt den Transport, ist jedoch nicht essentiell (Mant et al., 1995; Berghöfer, 1998). Neben der stromalen ATPase cpSecA (Hulford et al., 1994; Nakai et al., 1994; Yuan et al., 1994; Berghöfer et al., 1995; Voelker et al., 1997) konnte die Translokase bestehend aus cpSecY (Laidler et al., 1995; Berghöfer & Klösgen, 1996) und cpSecE identifiziert werden (Roy & Barkan, 1998; Schuenemann et al., 1999). Die Azidsensitivität des Transportwegs ist dabei auf das SecA zurückzuführen (Oliver et al., 1990; Knott & Robinson, 1994). Zu jeder Komponente existieren bakterielle Homologe. Als Beispiele für Substrate des Sec-abhängigen Weges seien hier das 33 kDa-Protein des Wasserspaltungsapparates, das Plastocyanin (PC) und die Untereinheit F des Photosystem I (PsaF) genannt (Hulford et al., 1994; Karnauchov et al., 1994; Robinson et al., 1994).

2.2.3 Der „spontane“ Weg

Der sogenannte „spontane“ Weg wurde erstmals in Bakterien (*E. coli*) beschrieben (Kuhn et al., 1986). In Pflanzen konnte das CF₀II (Untereinheit II des CF₀II-Membranankers der ATP-Synthase) als erstes Substrat dieses Weges nachgewiesen werden (Michl et al., 1994; Schleiff & Klösgen, 2001). Die „Spontanität“ dieses Weges basiert auf der Unabhängigkeit des Transports von Nukleosidtriphosphaten oder dem ΔpH der Thylakoidmembran (Michl et al., 1994; Schleiff & Klösgen, 2001). Da der Transport auch mit proteasevorbehandelten Thylakoiden funktioniert, kann der Einfluss von stromalen Komponenten und transmembranen Proteinen ausgeschlossen werden (Robinson et al., 1996; Kim et al., 1998). Die Integration der Proteine, die über diesen Weg transportiert werden, ist von zwei hydrophoben Domänen abhängig. Eine dieser Domänen liegt im reifen Teil des Proteins, die andere im Signalpeptid (TTD) (Michl et al., 1994, 1999). Als weitere Substrate dieses Weges sind die Untereinheiten W (PsbW), X (PsbX) und Y (PsbY) des Photosystems II (Kim et al., 1998; Lorkovic et al., 1995; Kim et al., 1998; Thompson et al., 1999) sowie die Untereinheit K (PsaK) des Photosystems I zu nennen (Mant et al., 2001). Das Protein Elip2 (*Early Light Inducible Protein 2*) und die Untereinheit S (PsbS) des Photosystems II inserieren, bei nicht funktionierenden SRP, ebenfalls spontan in die Thylakoidmembran (Kim et al., 1999).

2.2.4 Der ΔpH /Tat-Weg

Dieser Transportweg zeichnet sich durch eine Reihe von Besonderheiten aus. Neben der Eigenschaft gefaltete Proteine zu transportieren (siehe Abschnitt 2.2.5), ist der Transport *in vitro* von einem Protonengradienten über der Thylakoidmembran abhängig. Stromale Faktoren oder Nukleosidtriphosphate werden nicht benötigt (Mould & Robinson, 1991; Hulford et al., 1994; Brock et al., 1995; Cline et al., 1992; Klösigen et al., 1992; Musser & Theg, 2000b). Allerdings gibt es erste Hinweise auf eine teilweise Unabhängigkeit vom ΔpH (Finazzi et al., 2003; Braun et al., 2007). So konnten von Finazzi et al. (2003) in *Chlamydomonas reinhardtii* Hinweise für einen ΔpH -unabhängigen Tat-Transport *in vivo* gefunden werden. Braun et al. (2007) konnten zeigen, dass das bakterielle Tat-System in der Lage ist, das transmembrane elektrische Potential $\Delta\Psi$ als Energiequelle zu nutzen und postulieren die Abhängigkeit des Tat-Systems von der protonenmotorischen Kraft (PMF – *Proton Motive Force*) als Energiequelle. Aus diesem Grund wird die ΔpH -Abhängigkeit intensiv diskutiert (Theg et al., 2005). Eine aktuelle Veröffentlichung von Braun & Theg (2008) zeigt, dass der Tat-abhängige Transport selbst nach einiger Zeit im Dunkeln noch funktioniert, obwohl die PMF kurz nach Eintritt der Dunkelheit bereits verschwindet. Als Ursache für den dennoch sichtbaren Transport werden Protonen vermutet, die durch aktive chemische Prozesse mobilisiert werden können. Dementsprechend verdichten sich die Hinweise, dass der Tat-Transport vom gesamten PMF (ΔpH und $\Delta\Psi$) abhängig ist und die Thylakoide in der Lage sind, fehlende Lichteinstrahlung zumindest zeitweise zu überbrücken.

Erstmals entdeckt wurde dieser Transportweg durch Untersuchungen an der Maismutante *hcf106*. Diese Mutante zeigte eine erhöhte Chlorophyllfluoreszenz (*hcf*) sowie eine gestörte Assemblierung des Photosystems I+II und des Cytochrom b_6/f Komplexes (Martienssen et al., 1989). Weiterhin konnte im Stroma eine Akkumulation des 16 kDa- und 23 kDa-Proteins des Wasserspaltungsapparates beobachtet werden, während andere Proteine (33 kDa-Protein, PC, LHCP) unbeeinflusst blieben (Voelker & Barkan, 1995). Die Aminosäuresequenz des Proteins Hcf106, welches in der Maismutante defekt war, wurde von Settles et al. (1997) aufgeklärt. Homologievergleiche mit Bakterien zeigten in *E. coli* drei Homologe – TatA, TatB des *tatABCD* Operons und das monocistronische TatE (Bogsch et al., 1998; Weiner et al., 1998; Sargent et al., 1998, 1999). Von dem *tatABCD*-Operon sind alle bis auf das TatD Bestandteil des Tat-Systems (Wexler et al., 1998). Auf Basis dieser Homologen wurden auch in Pflanzen, neben dem bereits bekannten Hcf106 (TatB) (Martienssen et al., 1989; Voelker & Barkan, 1995; Settles et al., 1997), die entsprechenden plastidären Varianten Tha4 (TatA/E) (Mori et al., 1999; Walker et al., 1999) und cpTatC (TatC) (Bogsch et al., 1998; Mori et al., 1999, 2001; Motohashi et al., 2001) identifiziert. Zum besseren Verständnis werden heute auch die plastidären Tat-Proteine

mit TatA, TatB und TatC bezeichnet. Strukturvorhersagen ergaben für das TatA und TatB je eine Transmembrandomäne, für das TatC sechs. (Berks et al., 2000). Der N- und C-Terminus des bakteriellen TatC liegt dabei auf der cytosolischen Seite (Gouffi et al., 2002).

Neben dem 16 kDa- und 23 kDa-Protein (Mould & Robinson, 1991; Cline et al., 1992; Klösgen et al., 1992) wurden im Laufe der Zeit u.a. die Untereinheit N des Photosystems I (PsaN), die Untereinheit T des Photosystems II (PsbT), der Photosystemassemblierungsfaktor Hcf136 und das Rieskeprotein als Substrate des ΔpH /Tat-Weges identifiziert (Mant et al., 1994; Nielsen et al., 1994; Kapazoglou et al., 1995; Hynds et al., 2000; Molik et al., 2001). Namensgebend für diesen Transportweg (Tat – *Twin Arginine Translocation*) ist ein konserviertes Zwillingsarginin (RR) vor der hydrophoben Domäne des Signalpeptids (Chaddock et al., 1995). Die Suche nach Sec-unabhängigen Substraten in Bakterien führte zur Identifikation einer Reihe von Cofaktor-haltigen Periplasmaproteinen. Deren Signalpeptide hatten eine hohe Ähnlichkeit zu den pflanzlichen Signalpeptiden und wiesen ein konserviertes RR-tragendes Motiv auf (Konsensusmotiv S/T-R-R-x-F-L-K) (Berks, 1996). Damit waren auch in Bakterien erste Tat-Substrate identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass bakterielle Substrate im pflanzlichen System transportiert werden können (Mori & Cline, 1998; Wexler et al., 1998; Halbig et al., 1999a). Weiterhin charakteristisch ist in einigen Fällen ein „*Sec-avoidance*“ Motiv (positive Ladungen in der C-Region des Signalpeptids), dass den Sec-Transport unterbindet (Bogsch et al., 1997; Henry et al., 1997).

Mittlerweile konnten Tat-Komplexe in einem Größenbereich von 440–700 kDa sowohl in Pflanzen als auch Bakterien nachgewiesen werden (Berghöfer & Klösgen, 1999; Cline & Mori, 2001; Bolhuis et al., 2001; Sargent et al., 2001). Dabei wird ein Komplex bestehend aus TatBC als möglicher Rezeptor diskutiert (Bolhuis et al., 2001). Ein Komplex, bestehend aus TatBC und TatA bildet sich erst in Anwesenheit von Substrat und ΔpH (Mori & Cline, 2002). Aufgrund des Transports von Substraten bis zu einer Größe von 100 kDa wird bei der Tat-Pore von einer Mindestgröße im Bereich von 60 Å ausgegangen (Berks et al., 2000). Aufgrund der unterschiedlichen Größe der Substrate muss die Translokase sich anpassen können und in ihrem Durchmesser variabel sein, wobei TatA als zentrale Komponente der „Pore“ diskutiert wird (Gohlke et al., 2005; Dabney-Smith et al., 2006; Lange et al., 2007). Über den Mechanismus dieses Transportweges ist bisher wenig bekannt. Es konnten jedoch, u.a. mit chimären Substraten, Translokationsintermediate identifiziert werden, die darauf hinweisen, dass die Substrate mit ihrem Signalpeptid zunächst mit der Thylakoidmembran interagieren bzw. in diese insertieren (Berghöfer & Klösgen, 1999; Hou et al., 2006). Dieser erste Schritt der Translokation beschränkt sich nicht auf das pflanzliche System (Shanmugham et al., 2006) und ist vom ΔpH unabhängig (Cola et al., 2005).

2.2.5 Der Transport gefalteter Proteine über den Δ pH/Tat-Weg

Eine der herausragenden Eigenschaften des Δ pH/Tat-Weges ist die Fähigkeit zum Transport gefalteter Proteine. Erste Hinweise auf den Transport von gefalteten Substraten konnten bereits von [Creighton et al. \(1995\)](#) beim *in vitro* Import des *in vitro* translatierten 23 kDa-Proteins beobachtet werden. [Clark & Theg \(1997\)](#) konnten zeigen, dass ein durch Crosslinking erzeugter Komplex aus 16 kDa-Protein und Rinderpankreasinhibitor über den Tat-Weg transportiert wird. Weiterhin konnte von [Hynds et al. \(1998\)](#) gezeigt werden, dass die Dihydrofolatreduktase (DHFR) sowohl gefaltet als auch ungefaltet über die Thylakoidmembran transportiert wird. Später folgten Experimente mit gefalteten EGFP-Fusionen *in vivo* ([Marques et al., 2004](#)). Die Fähigkeit des Transports gefalteter Proteine beschränkt sich dabei nicht auf das pflanzliche Tat-System.

Auch für das bakterielle System konnte in verschiedenen Ansätzen gezeigt werden, dass Tat-Substrate gefaltet transportiert werden. Dabei wurden heterologe Tat-Substrate konstruiert, deren Faltungszustand klar definiert war. So konnte neben dem Transport von GFP-Substraten ([Thomas et al., 2001](#); [Santini et al., 2001](#)) vor allem der Transport Cofaktor-haltiger Substrate gezeigt werden ([Santini et al., 1998](#); [Weiner et al., 1998](#); [Halbig et al., 1999b](#); [Sanders et al., 2001](#)). Dabei fiel jedoch auf, dass ungefaltete Substrate, im Gegensatz zum Thylakoidsystem ([Hynds et al., 1998](#)), nicht transportiert werden konnten. Eine Ausnahme bilden kleine hydrophile Proteine, die auch in Bakterien ungefaltet transportiert werden ([Richter et al., 2007](#)). Des Weiteren konnte der Transport gefalteter bakterieller Hydrogenasen gezeigt werden. Diese werden als Hetero-Oligomere transportiert, wobei nur eine Untereinheit das RR-Motiv trägt und dementsprechend die andere Untereinheit passiv „huckepack“ („*hitch hiker*“, „*piggypack*“) co-transloziert wird ([Rodrigue et al., 1999](#); [Wu et al., 2000](#)). Ein weiteres Beispiel für den gefalteten Zustand als Voraussetzung für den Δ pH/Tat-abhängigen Transport, sind Experimente mit Fusionsproteinen aus der Alkalischen Phosphatase (AP) und einem bakteriellen Signalpeptid. Dabei konnte nur dann ein Transport über den Δ pH/Tat-Weg festgestellt werden, wenn Bakterienstämme verwendet wurden, in denen die Bildung von Disulfidbrücken im Cytosol möglich war. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die Möglichkeit der Bildung von Disulfidbrücken die Voraussetzung für die vollständige Faltung der AP ist ([DeLisa et al., 2003](#)). Da es essentiell ist, dass die Cofaktor-haltigen Substrate, vor Beginn des Transports, vollständig gefaltet sein müssen, wird ein sogenanntes „*quality control*“- bzw. „*proofreading*“-System diskutiert ([Santini et al., 1998](#); [Sargent et al., 2002](#); [Brüser & Sanders, 2003](#); [DeLisa et al., 2003](#); [Dubini & Sargent, 2003](#); [Palmer et al., 2005](#)).

2.3 Die TPP – eine Typ I-Signalpeptidase

Die Thylakoidprozessierungspeptidase (TPP) gehört zur Gruppe der Signalpeptidasen. Unabhängig von deren Typ und Lokalisierung spalten sie N-terminale Signalpeptide von Vorläuferproteinen ab und erzeugen dadurch das reife, funktionelle Protein (Blobel & Dobberstein, 1975). Die Signalpeptidasen werden in vier Gruppen unterteilt (Tjalsma et al., 2000; Paetzel et al., 2002b). Die TPP gehört, wie auch die bakteriellen Leaderpeptidasen und die mitochondriellen IMP1 und IMP2, zu der Klasse der Typ I-Signalpeptidasen (Paetzel et al., 2002b). Die bakterielle Form war dabei die Erste, die kloniert und sequenziert wurde (Date & Wickner, 1981; Wolfe et al., 1983). Bis auf die Signalpeptidase des ER, nutzen diese Serinproteasen eine ungewöhnliche katalytische Serin/Lysin Dyade, anstelle der sonst typischen Triade (Sung & Dalbey, 1992; Black, 1993; Tschantz et al., 1993; van Dijl et al., 1995; Barbrook et al., 1996; Chen et al., 1999; VanValkenburgh et al., 1999). Die Kristallstruktur der *E.coli* Leaderpeptidase bestätigte, dass es sich um eine Serinprotease handelt, deren nucleophiles Serin-90 und das Lysin-145 die katalytische Dyade bilden (Paetzel et al., 1998, 2000, 2002a). Auch wenn bei den Typ I-Signalpeptidasen ein nucleophiles Serin katalytisch beteiligt ist, lassen sich diese Peptidasen jedoch nicht durch die sonst üblichen Serin-Proteaseinhibitoren (z.B. PMSF) inaktivieren bzw. hemmen. Der einzige bisher bekannte Inhibitor ist ein sogenannter „Penem“-Inhibitor (Penem SB216357), der zur Gruppe der β -lactam Inhibitoren gehört (Barbrook et al., 1996; Kirwin et al., 1987; Tschantz et al., 1993; Black, 1993).

Sowohl in prokaryotischen als auch eukaryotischen Organismen sind die strukturellen Anforderungen an die Substrate für die Spezifität der Typ I-Signalpeptidase gleich. Mit Ausnahme der IMP1 erkennen alle Typ I-Signalpeptidasen spezifisch kleine Aminosäuren an Position -1 und einen kleinen ungeladenen Aminosäurerest an Position -3 relativ zur Spaltstelle (Zwizinski & Wickner, 1980; Dierstein & Wickner, 1986; Fikes et al., 1990; Shackleton & Robinson, 1991; Shen et al., 1991; Karamyshev et al., 1998). Weit verbreitet ist dabei ein Ala-X-Ala Motiv (von Heijne, 1983). Im Fall des Transports von Proteinen in Mitochondrien bzw. Chloroplasten liegt diese Spaltstelle am Ende eines zusammengesetzten Transitpeptids (Ko & Cashmore, 1989; Hartl & Neupert, 1990).

In Mitochondrien sind die IMP1 und IMP2 als Vertreter der Typ I-Signalpeptidasen beschrieben, wobei beide Teil eines Komplexes sind und unterschiedliche Substratspezifitäten aufweisen (Behrens et al., 1991; Schneider et al., 1991; Nunnari et al., 1993; Schneider et al., 1994; Luo et al., 2006). In Cyanobakterien sind zwei Homologe identifiziert worden (LepB1 und LepB2), wobei nur eine (LepB2) essentiell ist (Zhibanko et al., 2005). In Pflanzen ist bisher verhältnismäßig wenig über die TPP bekannt. Im Gegensatz zu den bakteriellen Signalpeptidasen ist die TPP weniger tolerant gegenüber Änderungen

im Ala-X-Ala-Motiv (Shackleton & Robinson, 1991; Peltier et al., 2000). Die einzige bisher partiell gereinigte und charakterisierte pflanzliche TPP ist die aus *Pisum sativum*. Dabei konnte gezeigt werden, dass die TPP-Aktivität an der lumenalen Seite der Thylakoidmembran lokalisiert ist, ein pH-Optimum im Bereich von 6,5–7,0 besitzt und durch EDTA bzw. EGTA aktiviert wird (Kirwin et al., 1987, 1988). In *Arabidopsis thaliana* ist bisher nur eine Typ I-Signalpeptidase als TPP beschrieben (Chaal et al., 1998). Allerdings gibt es zu dieser zwei weitere Homologe, wovon eine bereits in Proteomanalysen von Chloroplasten nachgewiesen wurde (Kleffmann et al., 2004). Selbige wurde ebenfalls als Typ I-Signalpeptidase identifiziert und im Zusammenhang mit der Reifung des Toc75 charakterisiert (Inoue et al., 2005).

2.4 GFP/EGFP als Reporter-Protein

Das GFP (*Green Fluorescent Protein*) aus der Qualle *Aequorea aequorea/victoria* bzw. *Aequorea forskalea* war das Erste, welches kloniert und exprimiert wurde (Wildtyp GFP, PDB-Code 1GFL, Prasher et al. (1992); Chalfie et al. (1994)). Die Fluoreszenz des GFP ist allerdings *in vivo* an ein weiteres Protein gekoppelt, das Aequorin. Die eigentliche licht-erzeugende Reaktion ist die des Aequorins mit Coelenterazin, drei Calcium-Ionen und einem proteingebundenen Sauerstoff zum Ca_3 -apo-aequorin-coelenteramid. Diese Reaktion emittiert *in vitro* blaues Licht (Shimomura et al., 1988; Shimomura, 1995). Die Qualle *in vivo* emittiert allerdings grünes Licht, welches durch einen strahlungsfreien Energietransfer vom Aequorinkomplex hin zum GFP erfolgt (Morin & Hastings, 1971; Ward & Cormier, 1979). Die Struktur des Aequorins ist von Head et al. (2000) aufgelöst worden.

Das GFP-Chromophor wird von dem Tripeptid Ser65–Tyr–Gly67 gebildet. Die funktionelle Struktur (siehe Abbildung 2.3) ist ein 4-(*p*-Hydroxybenzylidene)-imidazolid-5-one, die durch eine Zyklisierung mit anschließender Oxidation des Tripeptids gebildet wird (Shimomura, 1979; Cody et al., 1993).

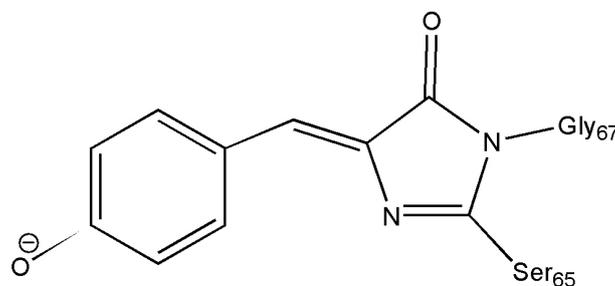


Abb. 2.3: Chromophor des GFP. Das Chromophor des GFP wird durch eine Zyklisierung und Oxidation des Tripeptids Ser65–Tyr–Gly67 gebildet, wobei sich eine photochemisch wirksame 4-(*p*-Hydroxybenzylidene)-imidazolid-5-one Struktur ausbildet.

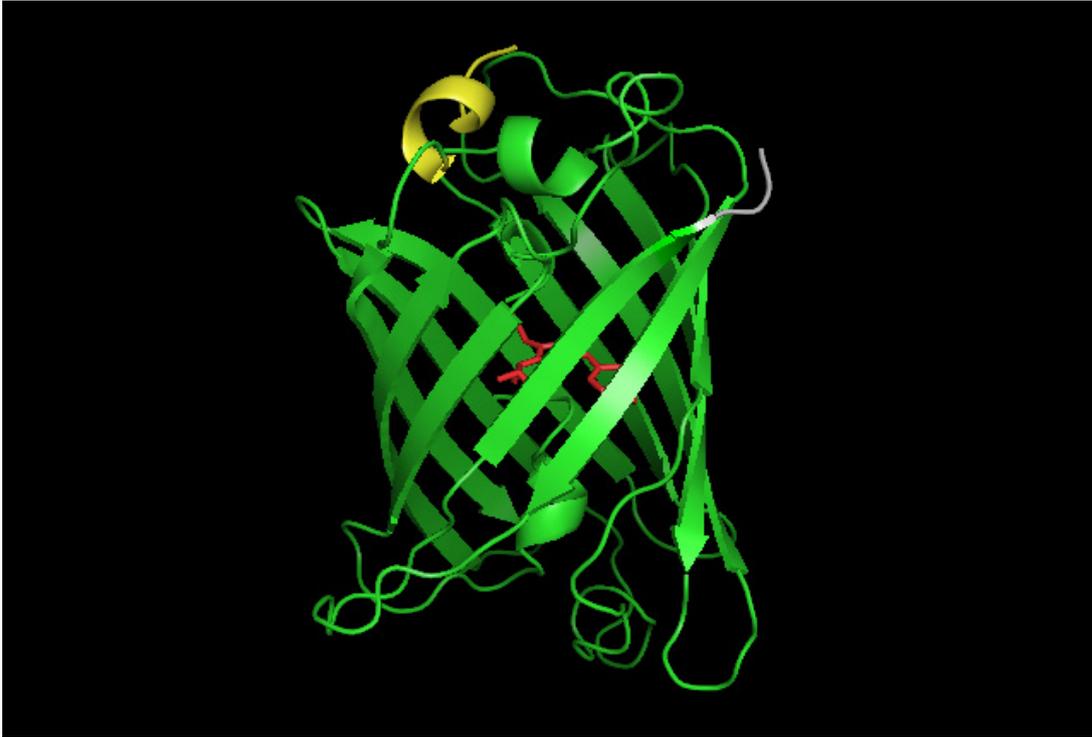


Abb. 2.4: 3D-Struktur des GFP. Die Abbildung zeigt die dreidimensionale Struktur des S65T-GFP nach [Ormö et al. \(1996\)](#). Das Chromophor ist **rot**, der N-Terminus **gelb** und der C-Terminus **grau** markiert.

Bis heute steigt die Zahl der GFP-Mutanten stetig an. Bei jeder GFP-Variante wird versucht bestimmte Eigenschaften zu verändern, wie z.B. Fluoreszenzausbeute, Stabilität, pH-Abhängigkeit und Expressionsverhalten. Von fast jeder GFP-Variante gibt es entsprechende Kristallstrukturen. Die ersten GFP-Strukturen wurden vom wtGFP ([Yang et al., 1996](#)) und der häufig verwendeten S65T-Variante ([Ormö et al., 1996](#)) erstellt. Auch wenn sich viele der GFP-Analoga in ihren Absorptions- und Emissionsspektren zum Teil stark unterscheiden, so sind sich die Strukturen doch sehr ähnlich. Die meisten GFP-Mutanten kristallisieren, wie auch das wtGFP, als Dimere, wobei die Dimerisierung stark von den Kristallisationsbedingungen abhängt ([Phillips, 1997](#)). Die räumliche Struktur des GFP gleicht einem Fass, wobei die Wand von elf β -Faltblattdomänen gebildet wird. Der Durchmesser dieser Struktur beträgt ca. 24 Å und die Höhe 42 Å. Das Innere wird von einer α -Helix durchzogen, welche im Zentrum das Chromophor enthält. An beiden Enden der Struktur befinden sich kurze α -helikale Bereiche, die quasi den „Deckel“ und den „Boden“ des Fasses bilden. In [Abbildung 2.4](#) ist die 3D-Struktur des S65T-GFP zu sehen.

Das Chromophor selbst ist durch eine Vielzahl von Wasserstoffbrücken stabilisiert (siehe [Abbildung 2.5](#)). Deletionsversuche ([Dopf & Horiagon, 1996](#); [Li et al., 1997](#)) haben gezeigt, dass nahezu das gesamte Protein (Aminosäure 2–232) für eine erfolgreiche Chromophorbildung und funktionierende Fluoreszenz nötig ist. Die Chromophorbildung selbst geschieht

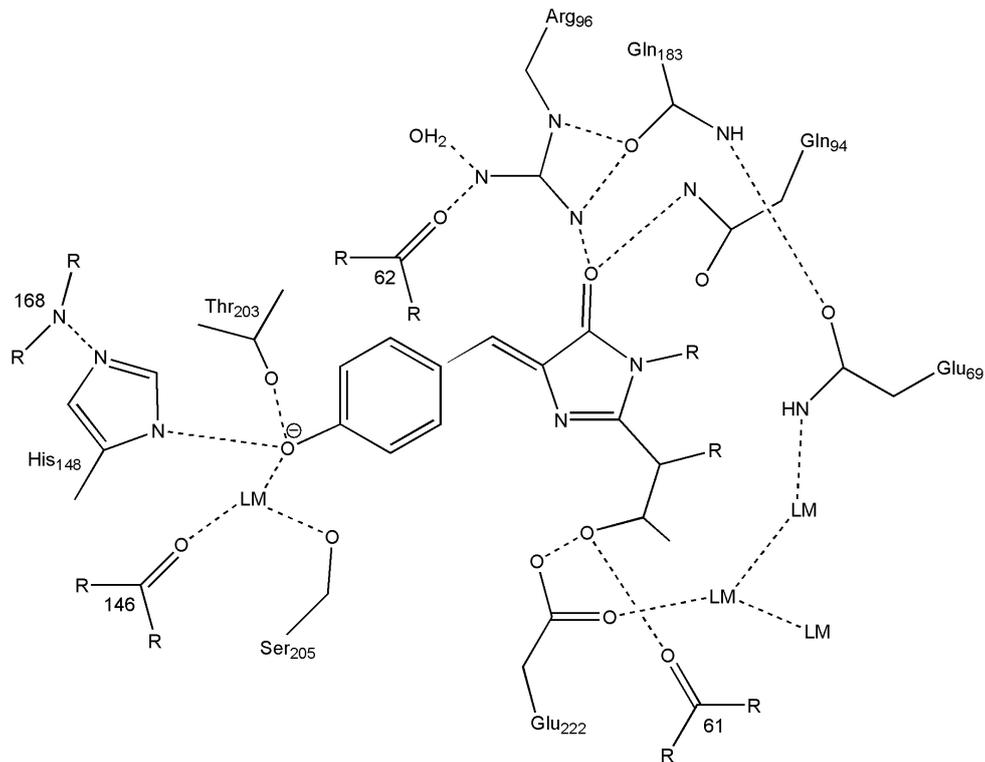


Abb. 2.5: Stabilisierung des Chromophors innerhalb des GFP durch H-Brücken. Die Abbildung zeigt die Stabilisierung des Chromophors durch eine Vielzahl von Wasserstoffbrücken im Inneren des GFP. Lösungsmittelmoleküle (meist H_2O) sind als LM dargestellt.

durch eine Zyklisierung von Ser65–Tyr–Gly67. Diese Zyklisierung verläuft autokatalytisch und ist von der Proteinsequenz selbst sowie dem Vorhandensein von Sauerstoff abhängig (Chalfie et al., 1994; Heim et al., 1994). Es konnte gezeigt werden, dass chemisch synthetisiertes GFP selbstständig rückfaltet und die selben spektroskopischen Eigenschaften besitzt wie das „natürliche“ GFP (Nishiuchi et al., 1998). Die räumliche Struktur der β -Faltblätter (Fass) schützt das innenliegende Chromophor und ist damit wesentlich für die Stabilität des GFP verantwortlich. Sauer denaturiertes GFP (z.B. durch mit Glycin auf pH 2,5 gepuffertes Guanidin/HCl) kann durch einfache Verdünnung und Neutralisation rückgefaltet werden, wobei die Halbwertszeit der Rückfaltung zwischen 24 Sekunden (mit Chaperon-Unterstützung, Makino et al. (1997)) und 5 Minuten liegt (Ward & Bokman, 1982). Mit der Denaturierung der β -Faltblätter verschwindet die Fluoreszenz zwar vollständig, unterscheidet sich nach erneuter Rückfaltung jedoch nicht vom nativem GFP (Bokman & Ward, 1981). Dementsprechend kann die Fluoreszenz als Marker für die korrekte Bildung des 11-Strang- β -Fasses benutzt werden. Die Faltung des GFP ($t_{\frac{1}{2}} = 10$ min) selbst geschieht relativ schnell, ebenso die Zyklisierung des Chromophors ($t_{\frac{1}{2}} = 3$ min), die Oxidation des Chromophors allerdings ist mit ($t_{\frac{1}{2}} = 76$ min) im Vergleich dazu langsam (Reid & Flynn, 1997).

Tab. 2.1: Mutantengruppen eingeteilt nach ihren spektralen Eigenschaften. Dargestellt ist die Einteilung der GFP-Mutanten nach Tsien (1998) in sieben verschiedene Gruppen in Abhängigkeit ihrer spektrometrischen Eigenschaften.

Mutante	Name	λ_{ex}	λ_{em}	ϵ
Klasse 1 – Wildtyp				
keine bzw. Q80R	wtGFP	398/475	508/503	25–30/9,5–14
Klasse 2 – Phenolatanion				
F64L, S65T	EGFP	488	507–509	55–57
Klasse 3 – neutrales Phenol				
S202F, T203I	H9	399	511	20
Klasse 4 – Phenolatanion mit gestapeltem π -System (gelb fluoreszierende Proteine)				
S65G, V68L, S72A, T203Y	10C o. EYFP	514	527	83,4
Klasse 5 – Indol im Chromophor (cyan fluoreszierende Proteine)				
N146I, M153T, V163A	ECFP	452	505	–
Klasse 6 – Imidazol im Chromophor (blau fluoreszierende Proteine)				
Y66H	BFP	384	448	21
F64L, Y66H, Y145F	EBFP	380–383	440–447	26,3–31

Die Rückfaltungstemperaturen des wtGFP liegen deutlich unter 37°C, was seinen Einsatzbereich stark einschränkt. Aus diesem Grund wurden zunächst vor allem Mutanten gesucht, die bei höheren Temperaturen effizient falten können, ohne dabei in *inclusion bodies* auszufallen (Cramer et al., 1996; Cormack et al., 1996; Siemering et al., 1996; Kimata et al., 1999; Delagrave et al., 1995; Heim & Tsien, 1996; Yang et al., 1998). Die Mutationen können zum einen strukturell (relative Lage der Mutation zum Chromophor) unterschieden werden (Cubitt et al., 1999). Diese unterscheiden sich in Eigenschaften wie Expressionsverhalten, Faltung, Hydrophobizität oder Fluoreszenzausbeute. Zum anderen können die Mutationen entsprechend ihrer spektralen Eigenschaften (Anregungs- und Emissionsverhalten) unterschieden werden. Das wtGFP absorbiert hauptsächlich bei 398 nm und emittiert bei 508 nm. Neben dieser Hauptabsorption gibt es noch ein zweites Absorptionsmaximum bei 475 nm und ein dazugehöriges Emissionsmaximum von 503 nm (Ward & Bokman, 1982; Heim et al., 1994). Die einzelnen spektralen Mutanten können in sieben Klassen unterteilt werden (Tsien, 1998). Diese sind in Tabelle 2.1 mit einigen ausgewählten Beispielen dargestellt. Dabei richtet sich die Einteilung nach dem Zustand bzw. der Struktur des Chromophors. Jede dieser Mutanten unterscheidet sich vom Wildtyp nicht zwingend im Faltungs- oder Expressionsverhalten, sondern in seiner Anregungswellenlänge und der Wellenlänge des emittierten Lichtes.

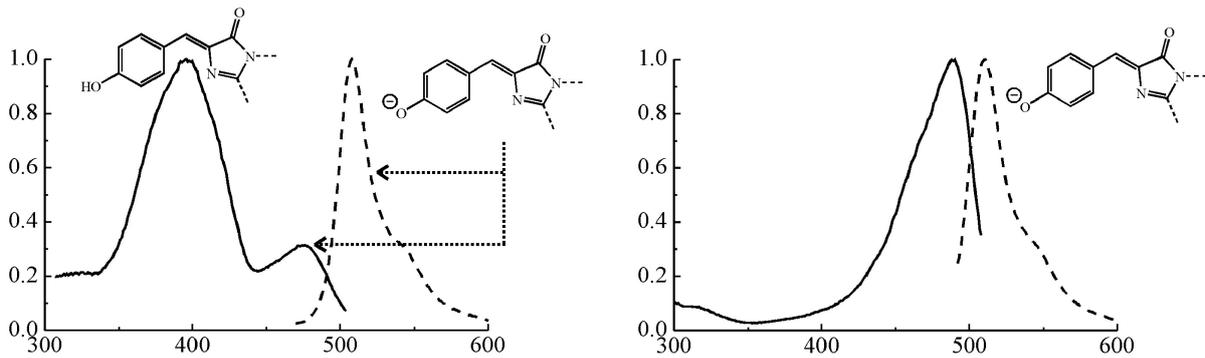


Abb. 2.6: Spektren des wtGFP und EGFP aus Tsien (1998). Die Abbildung zeigt die Absorptions- und Emissionsspektren des wtGFP (links) und das in dieser Arbeit verwendete EGFP (rechts) mit ihren jeweiligen Maxima. Zusätzlich sind die jeweiligen Strukturen der einzelnen Chromophorzustände dargestellt.

Die in dieser Arbeit als Reporter verwendete GFP-Variante ist das EGFP. Dieses zeichnet sich hauptsächlich durch eine Chromophorfaltungsmutation (S65T) aus. Diese führt zu einer schnelleren Zyklisierung und Oxidation des Chromophors (Heim et al., 1995). Neben der S65T-Mutation enthält das EGFP eine zweite Mutation F64L, welche die Faltung und Fluoreszenzausbeute verbessert (Cormack et al., 1996). Eine Anzahl zusätzlicher „stillere“ Mutationen (Änderungen einzelner Codons) ermöglichen eine bessere Expression in eukaryotischen Systemen wie Hefe oder tierischen Zellen (Haas et al., 1996; Kozak, 1987). Während das wtGFP je zwei Absorptions- und Emissionsmaxima besitzt (resultierend aus dem Gleichgewicht des Chromophors zwischen dem Phenolat-Zustand und der phenolischen Form), absorbiert und emittiert EGFP bei jeweils nur einer Wellenlänge (Phenolat-Zustand des Chromophors). Die Spektren beider GFP-Formen sind in Abbildung 2.6 dargestellt.

Die Vorteile des EGFP als Reporter lassen sich wie folgt zusammenfassen: EGFP besitzt als GFP-Derivat nur eine geringe Toxizität und hat keinen bzw. nur einen geringen physiologischen Einfluss (Cubitt et al., 1999). Die spektrometrischen Eigenschaften lassen sich aufgrund von nur einem Absorptions- und einem Emissionsmaximum einfacher analysieren als beim wtGFP (Cormack et al., 1996). Außerdem ist das EGFP im Vergleich zum wtGFP und anderen Mutanten deutlich unempfindlicher gegenüber Photobleichung (Harms et al., 2001) und es besitzt eine 30–32-fach höhere Fluoreszenzintensität als das wtGFP (Cormack et al., 1996).

2.5 Zielsetzung

2.5.1 Einfluss des Faltungszustandes des Substrats auf den $\Delta\text{pH}/\text{Tat}$ -abhängigen Transport

Die in der Einleitung erwähnten Experimente zum Transport gefalteter Substrate beziehen sich immer indirekt auf den Faltungszustand, d.h. der Rückschluss auf den Transport des gefalteten Substrats basiert auf Aktivitäten bzw. Cofaktoren oder speziellen Faltungsbedingungen, die nur im Cytosol bzw. im Stroma vorliegen. So könnte eine gemessene GFP-Fluoreszenz auch die Folge der Rückfaltung des GFP sein, nachdem es ungefaltet ins Thylakoidlumen bzw. ins Periplasma transportiert wurde. Aus diesen Gründen sollten im Rahmen dieser Arbeit chimäre EGFP-Substrate konstruiert, exprimiert und gereinigt werden. Es sollte ein Protokoll entwickelt werden, das es ermöglicht, sowohl die Reinheit als auch den Faltungsgrad der Substrate eindeutig kontrollieren zu können. Damit sollte bei anschließenden Untersuchungen zum Einfluss des Faltungszustandes des Substrats auf den $\Delta\text{pH}/\text{Tat}$ -abhängigen Transport eine klare Unterscheidung zwischen gefaltetem und ungefaltetem Zustand möglich sein. Weiterhin sollte die Struktur der Transit- bzw. Signalpeptide analysiert werden. Dabei sollte untersucht werden, ob Unterschiede in der Struktur existieren wenn die Substrate zum einen in wässriger Lösung vorliegen oder zum anderen mit hydrophoben Grenzflächen interagieren.

2.5.2 Charakterisierung der Thylakoidprozessierungspeptidase in *Arabidopsis thaliana*

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit den in der Einleitung angesprochenen TPP-Homologen in *Arabidopsis thaliana*. Dabei sollten diese zunächst mittels *in silico*-Analysen näher bestimmt werden, um erste Hinweise über ihre Lokalisierung bzw. Funktion zu erhalten. Anschließend sollte die jeweils vorhergesagte Lokalisierung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht und Rückschlüsse auf deren Funktion gezogen werden.

3 Ergebnisse

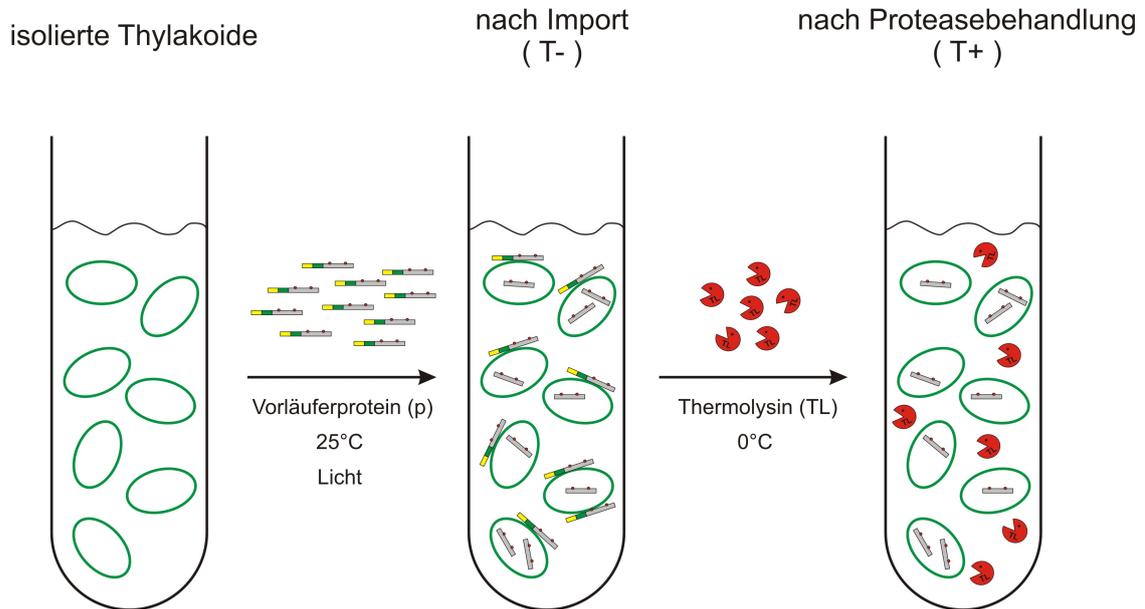
3.1 Verhalten gefalteter und ungefalteter Tat-Substrate beim Thylakoidtransport

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss des Faltungszustandes der Transportsubstrate auf den ΔpH -abhängigen Proteintransport über die plastidäre Thylakoidmembran. Dabei wurde neben dem Faltungszustand des gesamten Substrats auch der des Signalpeptids genauer untersucht.

Für die Analyse von Proteintransportprozessen bietet sich ein *in vitro* Analysesystem an, welches in unserer Arbeitsgruppe bereits sowohl für Chloroplasten als auch für isolierte Thylakoide etabliert war. Der größte Vorteil des *in vitro* Systems liegt darin, dass die Importbedingungen an den Membranen der Chloroplasten bzw. Thylakoide klar und reproduzierbar definiert und variiert werden können (z.B. Einsatz von Kompetitoren, Beeinflussung des ΔpH). In *in vivo* Systemen ist dies nicht bzw. oft nur sehr eingeschränkt möglich. Beim *in organello* Import werden isolierte Chloroplasten aus Erbse (*Pisum sativum*) bzw. Spinat (*Spinacia oleracea*) verwendet. Beim *in thylakoido* Import können nur isolierte Thylakoide aus Erbse (*Pisum sativum*) verwendet werden, da Spinatthylakoide aus bislang ungeklärten Gründen *in vitro* nicht importieren. Als Markierung der Transportsubstrate eignen sich am besten radioaktiv markierte Aminosäuren, da die Radioaktivität die höchste Sensitivität liefert. Als Träger der Radioaktivität wurde ^{35}S -Methionin verwendet, das während der *in vitro* Translation in das Protein eingebaut wird.

Das Grundprinzip eines *in vitro* Imports ist in Abbildung 3.1 am Beispiel des Thylakoidimports (*in thylakoido* Import) schematisch dargestellt. Dabei werden die isolierten Thylakoide zunächst mit dem zuvor *in vitro* translatierten und dabei radioaktiv markierten Vorläuferprotein (*precursor*) bei 25°C im Licht inkubiert. Der Import wird durch Verdünnung (rapide Verringerung der Substratkonzentration) und niedrige Temperaturen (bei Temperaturen zwischen 0–4°C kommt der Transport nahezu zum Erliegen) abgestoppt und der Importansatz anschließend geteilt. Ein Teil der Thylakoide wird nur gewaschen und nicht weiter behandelt. Der zweite Teil wird im Gegensatz dazu mit einer

A



B

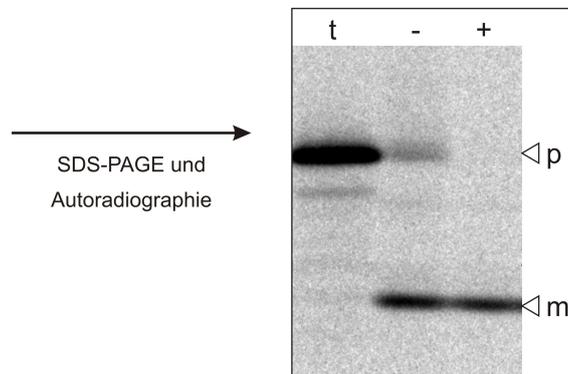


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des *in vitro* Imports in isolierte Thylakoidvesikel. Die Abbildung zeigt modellhaft den „Standard“-*in thylakoido* Import eines *in vitro* translatierten Proteins (A). Die radioaktive Markierung erfolgt durch Verwendung von ^{35}S -Methionin während der Translation. Nach der Inkubation der Thylakoide für 20 min bei 25°C im Licht, bleibt die Hälfte des Importansatzes unbehandelt (-), der zweite Teil wird mit Thermolysin behandelt (+). Unspezifisch an der Außenseite der Thylakoide haftende Vorläuferproteine (p) werden abgebaut, während die importierten Proteine im Inneren der Vesikel vor der Proteolyse geschützt sind. Die importierten Proteine werden durch die TPP zu ihrer reifen Form (m) prozessiert. Die jeweiligen Fraktionen werden in Laemmli-Probenpuffer (Laemmli, 1970) aufgenommen, 5 min bei 95°C erhitzt und können nach SDS-PAGE durch Autoradiographie (B) detektiert werden.

Protease (meist Thermolysin) inkubiert. Dabei werden die Vorläuferproteine, die nicht importiert wurden und zum Teil an der Außenseite der Thylakoidmembran haften, abgebaut. Importierte Proteine sind innerhalb der Thylakoidvesikel vor der Protease geschützt. Die importierten Vorläuferproteine werden nach dem Transport durch die Thylakoidprozessierungspeptidase (TPP) zu ihrer reifen Form prozessiert. Die Proteasebehandlung wird auf Eis durchgeführt, um einen weiteren Import während der Inkubation zu unterbinden. Beide Fraktionen werden nach mehrmaligen Wasch- und Zentrifugationsschritten einer SDS-PAGE nach Laemmli (1970) unterzogen, das resultierende Gel getrocknet und die Radioaktivität durch Autoradiographie detektiert. Auf dem so erhaltenen Bild ist in der unbehandelten Fraktion neben dem reifen Protein noch das Vorläuferprotein detektierbar, während in der proteasebehandelten Fraktion nur noch das reife und fertig prozessierte Protein zu sehen ist.

3.1.1 *In thylakoido* Transport authentischer Tat- und Sec-Substrate

Zunächst sollte das Transportverhalten einiger ausgewählter authentischer Substrate getestet werden, die später als Referenzsubstrate bei der Charakterisierung des Transportverhaltens in Konkurrenzexperimenten fungieren sollten.

Die Bezeichnung dieser Substrate und auch die der später verwendeten Chimären folgt grundsätzlich der Terminologie „Transitpeptid/reifes Protein“. In den Abbildungen dieser Arbeit werden die Vorläuferproteine mit „p“ und die reifen Proteine mit „m“ bezeichnet. Grund dafür sind die in der Literatur verwendeten englischen Begriffe für den Vorläufer (*precursor*) und das reife Protein (*mature protein*). Als Tat-Referenzsubstrat mit luminaler Lokalisierung wurde das 23 kDa-Protein des Wasserspaltungsapparates (23/23, PsbP) verwendet. Als Beispiel für ein chimäres Tat-Substrat wurde das 16/23 Protein aus Spinat verwendet. Dieses besteht aus dem Transitpeptid des 16 kDa-Proteins des Wasserspaltungsapparates von Photosystem II (PsbQ) und dem reifen Teil des 23 kDa-Proteins. Das 16/23 ist bereits in umfangreichen Studien zum Mechanismus des Tat-Transports verwendet worden und zeichnet sich durch einen im Vergleich zum 23/23 besonders langsamen Transport aus (Berghöfer & Klösgen, 1999; Hou et al., 2006; Frielingsdorf & Klösgen, 2007). Dadurch sind die einzelnen Schritte des Transports besser analysierbar. Als Referenz für den Sec-abhängigen Transport wurde Plastocyanin (PC/PC) verwendet.

In Abbildung 3.2 ist das Ergebnis des *in thylakoido* Transports des 23/23 und des PC/PC in Erbsenthylakoide zu sehen. Da das PC/PC Sec-abhängig transportiert wird und der Sec-abhängige Transport stromale Komponenten benötigt, werden die isolierten Thyla-

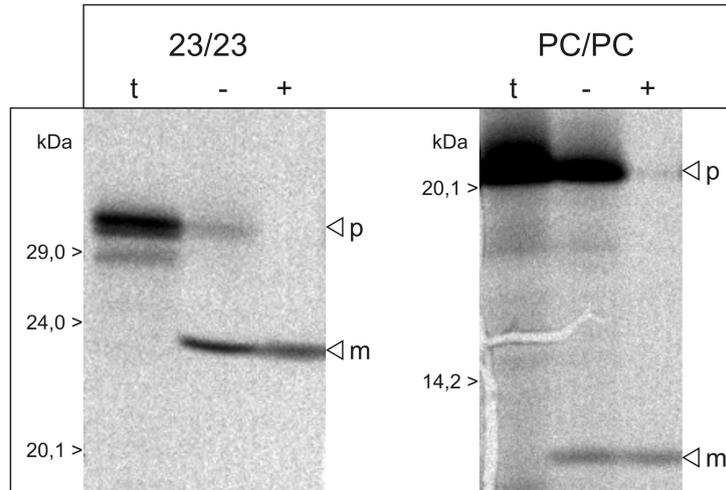


Abb. 3.2: *In thylakoido* Import des 23/23 und PC/PC in isolierte Erbsenthylakoide. Gezeigt ist ein Autoradiogramm des Imports des authentischen Tat-Substrats 23/23 und des Sec-Substrats PC/PC in isolierte Erbsenthylakoide nach SDS-PAGE und Autoradiographie. Die Translationen sind mit (t), die thermolysinbehandelten Fraktionen mit (+), die unbehandelten mit (-) bezeichnet. (p) markiert das vollständige Vorläuferprotein (*precursor*) und (m) das importierte reife (*mature*) Protein. **Bedingungen:** Import 20 min im Licht bei 25°C, SDS-PAGE mit 15%igem Midi-Polyacrylamidgel (20 x 20 x 0,1cm), Autoradiographie für 12 h, Auswertung durch Software FUJIFILM® ImageGauge V4.0.

koide im Fall des PC/PC in Stroma aufgenommen. Es ist zu erkennen, dass sowohl das 23/23 als auch das PC/PC importiert werden. Die apparenten Größen der prozessierten reifen Produkte liegen mit 23 kDa für das reife 23 kDa-Protein und 12 kDa für das Plastocyanin im erwarteten Bereich.

Neben dem eigentlichen Import ist die Kinetik des Transportes für spätere Konkurrenzexperimente (vgl. Abschnitt 3.1.7, S. 46) entscheidend. Dazu wurde der Import des 23/23 wiederholt, allerdings wurde der Transportversuch nach unterschiedlichen Zeitpunkten abgebrochen und so die Importkinetik des 23/23 im Bereich von 0–30 Minuten aufgenommen. Das Ergebnis dieses Experiments nach SDS-PAGE, Autoradiographie und Quantifizierung ist in Abbildung 3.3 dargestellt. Die Abbildung zeigt die grafische Darstellung dieses Importversuches. Dabei wurden die Signale aus dem Autoradiogramm (Insert) quantifiziert und die so erhaltenen Importsignale (Absolutwerte) gegen die Zeit aufgetragen. Der Import zeigt eine vergleichbare Kinetik wie sie für das 16 kDa-Protein beschrieben wurde (Alder & Theg, 2003). Die Kinetik zeigt einen sigmoiden Charakter. Der Verlauf dieser Kinetik lässt sich in drei Phasen unterteilen, eine Startphase (0–5 min), die auf Aktivierungsprozesse schließen lässt, gefolgt von einer zweiten Phase (5–20 min), die sich durch einen nahezu linearen Umsatz des Substrats auszeichnet und Phase 3 (ab 20–25 min), in der die Kinetik infolge des Substratverbrauchs abknickt. Werden Thylakoide mit Substrat vorinkubiert, verschwindet die Aktivierungsphase vollständig (Musser

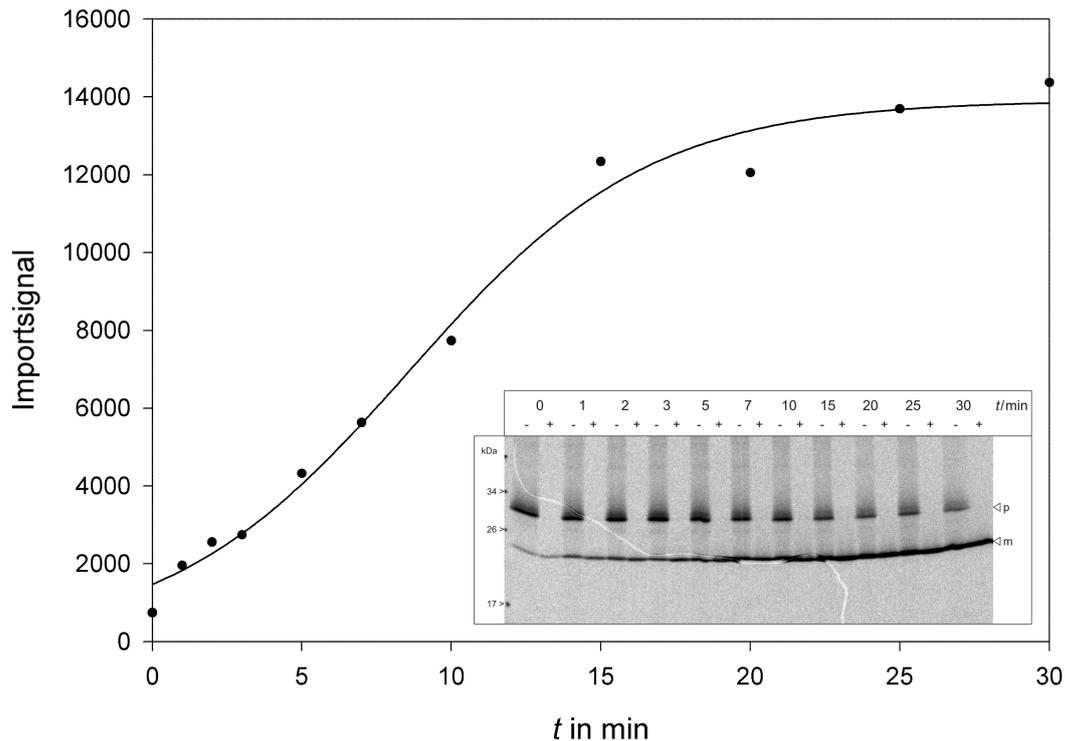


Abb. 3.3: Abhängigkeit des *in thylakoido* Imports des 23/23 von der Importzeit. Gezeigt ist die grafische Darstellung des Imports des authentischen 23/23 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (Importzeit) nach SDS-PAGE, Autoradiographie und Quantifizierung des importierten reifen Proteins. Das Insert zeigt die Autoradiographie des getrockneten SDS-Gels. **Bedingungen:** siehe Legende zu Abbildung 3.2.

& Theg, 2000a). Für spätere kinetische Untersuchungen zur Bestimmung der Kompetitionsparameter wurde deshalb versucht, im Bereich des linearen Anstiegs zu arbeiten (maximale Importzeit 20 min).

3.1.2 EGFP als Tat-Substrat

Da das pflanzliche Tat-System in der Lage ist, sowohl gefaltete als auch ungefaltete bzw. falsch gefaltete Substrate zu transportieren (Hynds et al., 1998), stellte sich die Frage inwiefern der Faltungszustand des Substrates einen direkten Einfluss auf den Transportprozess hat. Daraus ergab sich das Problem, wie der Faltungszustand des Substrats und dessen Einfluss auf das Transportverhalten zu überprüfen ist. Bei den meisten authentischen Substraten, wie dem 23/23, ist der Faltungszustand nicht direkt zu kontrollieren. Die meisten Substrate besitzen keine Cofaktoren oder spezielle Chromophore (wie z.B. fluoreszierende Proteine), die es ermöglichen den Faltungszustand direkt, z.B. über spezifische, Cofaktor-bedingte Absorptionen im UV/VIS-Spektrum oder Fluoreszenzen, zu detektieren. Aus diesem Grund wurde ein Substrat benötigt, welches physiologisch

möglichst inaktiv ist, d.h. kaum oder keinen Einfluss auf die Zelle bzw. das Organell und den Transport besitzt. Darüber hinaus sollte es Eigenschaften besitzen, die eine bessere Kontrolle des Faltungszustandes ermöglichen. Aufgrund der Tatsache, dass der Transport in Chloroplasten und der nachfolgende Transport in das Thylakoidlumen durch das Transit- bzw. Signalpeptid definiert ist (den Broeck et al., 1985; Schreier et al., 1985; Henry et al., 1994), bietet sich ein chimäres Substrat, bestehend aus Transitpeptid und dem Grün Fluoreszierenden Protein (GFP) bzw. seinen Derivaten an. In diesen Chimären wird der reife Teil eines authentischen Substrats durch das GFP als „Passagier“ ersetzt. GFP bietet sich als Reporter an, da es eine geringe Toxizität besitzt und keinen bzw. nur einen geringen physiologischen Einfluss zeigt (Cubitt et al., 1999).

Für die vorliegende Arbeit wurde das EGFP als Reporter gewählt (vgl. Abschnitt 2.4, S. 15). EGFP hat den Vorteil, dass der Faltungszustand leicht über die Fluoreszenz überprüfbar ist und die spektrometrischen Eigenschaften durch nur je ein Absorptions- und ein Emissionsmaximum einfacher analysierbar sind (Cormack et al., 1996). Außerdem ist das EGFP gegenüber dem ursprünglichen GFP und anderen Mutanten deutlich unempfindlicher gegenüber Photobleichung (Harms et al., 2001) und besitzt im Vergleich zum wtGFP eine 30-fach höhere Fluoreszenzintensität (Cormack et al., 1996).

3.1.2.1 16/EGFP und i16/EGFP

Um das EGFP als Tat-Substrat nutzen zu können, wurde die Tat-Transportinformation in Form des Transit- bzw. Signalpeptids mit dem EGFP fusioniert. Dazu wurde in dieser Arbeit das Transportsignal des authentischen 16kDa-Proteins des Wasserspaltungsapparates verwendet (16/16, PsbQ). Zum einen wurde das vollständige Transitpeptid verwendet. Dieses entspricht dem Signal des vollständigen Vorläuferproteins, welches neben dem plastidären Importsignal (stromadirigierende Domäne, *Stroma Targeting Domain*, STD) auch die thylakoiddirigierende Information (thylakoiddirigierende Domäne, *Thylakoid Targeting Domain*, TTD) enthält. Zum anderen wurde nur die TTD mit dem EGFP fusioniert, so dass ein Protein entsteht, das dem Stromaintermediat entspricht, welches nach der Prozessierung durch die stromale Prozessierungspeptidase (SPP) im Anschluss an den Transport ins Stroma entsteht. Beide Formen (vollständiges Transitpeptid und Intermediatsform) wurden an das N-terminale Ende des EGFP fusioniert. Dies ist möglich, da selbst im gefalteten Zustand der N-Terminus des EGFP frei für Modifikationen ist (vgl. Abbildung 2.4, S. 16).

Es resultieren zwei chimäre Transportsubstrate, die zum einen dem vollständigen EGFP-Vorläuferprotein entsprechen (bezeichnet als 16/EGFP – optimal für den Einsatz in *in organello* Ansätzen) und zum anderen der Stromaintermediatsform (i16/EGFP), wie sie

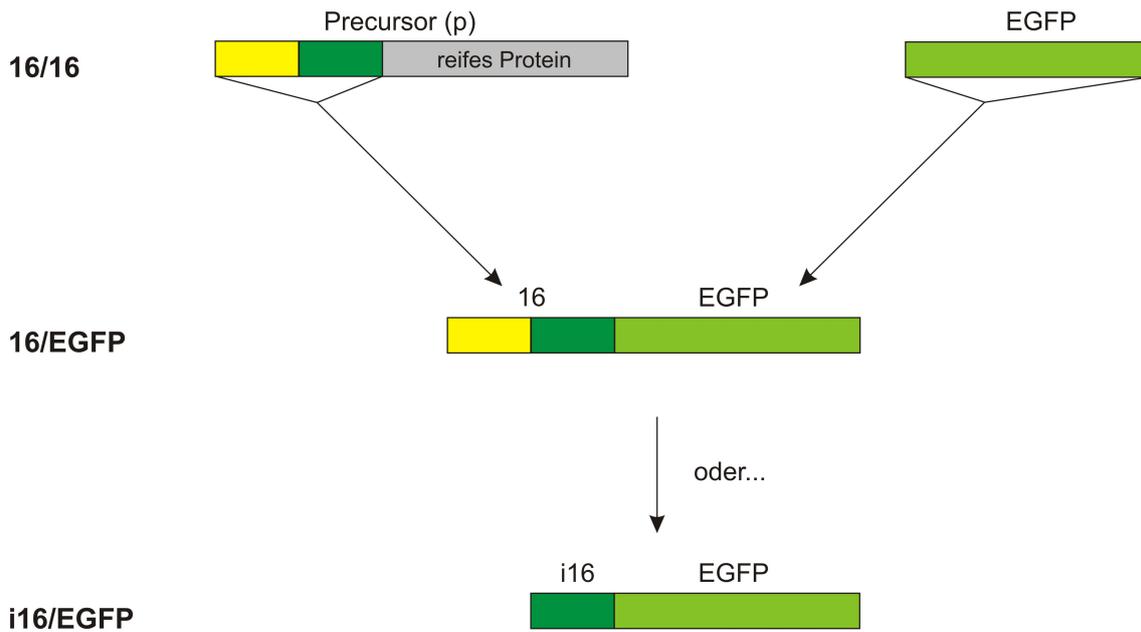


Abb. 3.4: Chimäre EGFP-Tat-Substrate. Die Abbildung zeigt die Zusammensetzung der chimären Tat-Substrate, welche als „Passagier“ das EGFP enthalten. Es wurde einerseits das vollständige Transitpeptid des 16/16 (PsbQ) und andererseits nur der thylakoiddirigierende Teil des Transitpeptids (TTD) mit dem EGFP fusioniert. Der vollständige EGFP-Vorläufer wurde als 16/EGFP und das Stromaintermediat als i16/EGFP bezeichnet.

typischerweise als Substrat beim Thylakoidtransport auftritt. Die Zusammensetzung der einzelnen EGFP-Chimären ist in Abbildung 3.4 dargestellt. Dabei wurden das Vorläuferprotein 16/EGFP und das Intermediat i16/EGFP sowohl im pBAT-Vektor (für den Einsatz in den bereits beschriebenen *in vitro* Experimenten) als auch zur Überexpression im pET-Vektorsystem kloniert.

3.1.3 Das *in vitro* Transportverhalten der chimären EGFP-Substrate

Für das 16/EGFP wurden innerhalb unserer Arbeitsgruppe bereits einige Experimente zum Transport *in vitro* und *in vivo* durchgeführt (Marques et al., 2003, 2004). Insbesondere die *in vitro* Experimente zeigten, dass das 16/EGFP über den $\Delta\text{pH}/\text{Tat}$ -Weg transportiert wird (Marques et al., 2003). Dabei wurde der Transport sowohl *in organello*, als auch *in thylakoido* nachgewiesen. Diese Versuche dienten als Ausgangspunkt für unsere Studien und sollten zunächst um das Substrat i16/EGFP erweitert werden. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Als Referenz für den $\Delta\text{pH}/\text{Tat}$ -Weg wurde erneut das 23/23 verwendet. Es ist zu erkennen, dass sich das i16/EGFP analog dem 16/EGFP verhält. Sowohl das vollständige Vorläuferprotein 16/EGFP, als auch das Stromaintermediat i16/EGFP konnten nach *in vitro* Transkription und *in vitro* Translation erfolgreich *in thylakoido* importiert werden. Neben den erwarteten Importsignalen ist so-

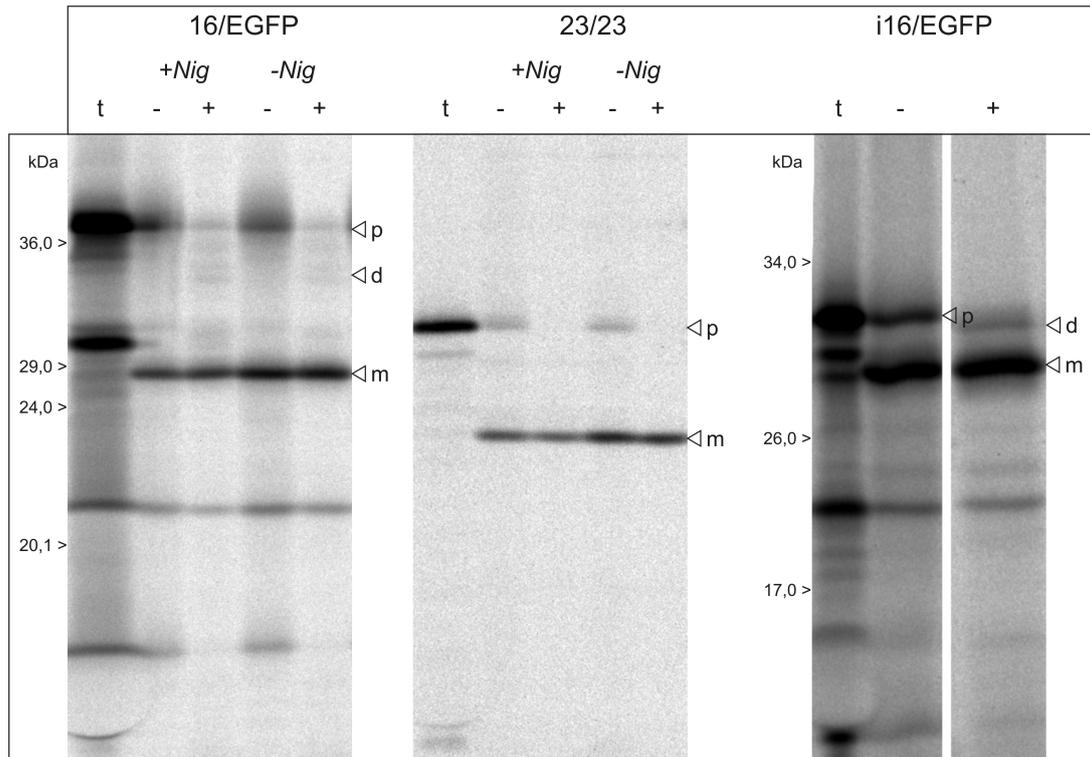


Abb. 3.5: *In vitro* Transport chimärer EGFP-Tat-Substrate. Die Abbildung zeigt den *in thylakoido* Import (vgl. Abbildung 3.1, S. 22) des 16/EGFP und i16/EGFP sowie der mitgeführten Δ pH/Tat-Referenz 23/23 nach SDS-PAGE und Autoradiographie. Jedes dieser Substrate wurde zuvor nach *in vitro* Transkription durch *in vitro* Translation mittels 35 S-Methionin radiotiv markiert. Die Translationen sind mit (t), die thermolysinbehandelten Fraktionen mit (+), die unbehandelten mit (-) bezeichnet. Für jedes Substrat sind die Vorläuferproteine mit (p), die importierten und zum reifen Protein prozessierten mit (m) markiert. Ein proteasebedingtes Abbauprodukt ist mit (d) bezeichnet (Diskussion siehe 4.1.1, S. 88). Zum Nachweis des Δ pH-abhängigen Transports wurden im Fall des 16/EGFP und 23/23 die Thylakoide zuvor 30 min mit Nigericin (2 μ M) behandelt (+Nig). **Bedingungen:** siehe Legende zu Abbildung 3.2 (S. 24).

wohl beim 16/EGFP als auch beim i16/EGFP ein Degradationsprodukt zu erkennen (d). Dieses ist im Fall des 16/EGFP zwar sehr schwach, jedoch reproduzierbar (Diskussion siehe 4.1.1, S. 88). Weiterhin zeigten das 16/EGFP und das 23/23 wie erwartet eine partielle Inhibition durch Nigericin, welches den Protonengradienten über der Thylakoidmembran abbaut und damit den Δ pH-Transport inhibiert. Damit konnte gezeigt werden, dass das 16/EGFP und das i16/EGFP über den Δ pH-Weg transportiert werden. Somit sind beide Substrate geeignet, in weiteren Studien (u.a. Kompetitionen) zum Transportverhalten gefalteter und ungefalteter Tat-Substrate eingesetzt zu werden.

3.1.4 Expression, Faltung und Reinigung des EGFP und der chimären Substrate

Um den Einfluss des Faltungszustandes des Substrates auf den Transportprozess zu überprüfen, sollten die chimären EGFP-Substrate in Konkurrenzexperimenten als nicht ra-

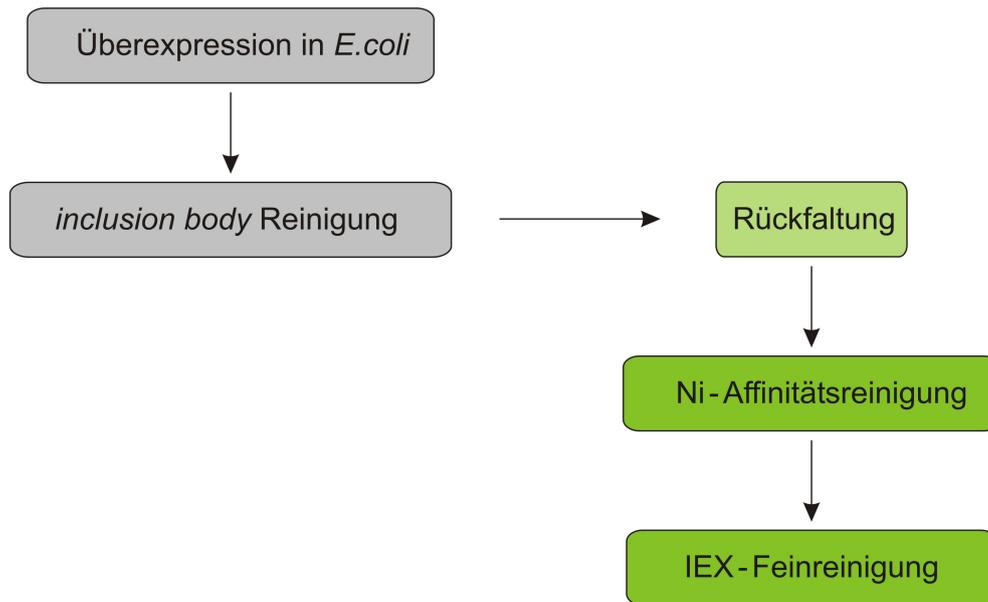


Abb. 3.6: Strategie der Expression, Rückfaltung und Reinigung des EGFP und der chimären EGFP-Substrate. Die Abbildung zeigt die einzelnen Schritte der Expression, anschließender Rückfaltung durch pH/Verdünnungssprung, Ni-Affinitätsreinigung als erster Reinigungsschritt und der finalen Reinigung durch Ionenaustauschchromatographie (IEX). Dabei sind die „denaturierten“ Stufen grau und die Abschnitte, in denen das EGFP bereits gefaltet vorliegt, grün dargestellt.

dioaktiv markierte Kompetitoren (gefaltet und ungefaltet) eingesetzt werden (vgl. Abschnitt 3.1.7, S. 46). Zu diesem Zweck müssen das 16/EGFP, das i16/EGFP sowie das EGFP (Kontrolle) überexprimiert, gereinigt und rückgefaltet bzw. entfaltet werden.

Die Strategie der Expression, Rückfaltung und Reinigung ist in Abbildung 3.6 dargestellt. Dabei wurden das reine EGFP (Kontrolle) und die chimären Substrate 16/EGFP und i16/EGFP zunächst in *E.coli* überexprimiert. Nach der Expression wurden die *inclusion bodies* gereinigt und in 6 M Guanidin/HCl bei saurem pH (20 mM Glycin pH 2,5) denaturiert. Anschließend erfolgte die Rückfaltung durch pH- und Verdünnungssprung. Das rückgefaltete Protein wurde in einem ersten Reinigungsschritt mittels Ni-Affinitätschromatographie vorgereinigt, um danach einer finalen Reinigung mittels semipräparativer Ionenaustauschchromatographie unterzogen zu werden.

3.1.4.1 Überexpression in *E.coli*

Der erste Schritt war die Expression des EGFP und der chimären Substrate in *E.coli* (methodische Details siehe 5.2.5.1, S. 124 und 5.2.5.2, S. 126). Dazu wurde in allen Fällen das pET-Vektorsystem verwendet und dabei jedes Protein um einen C-terminalen His-Tag erweitert. Bei den verwendeten Expressionsstämmen handelte es sich um BL21-Derivate (siehe 5.1.12, S. 115). Zunächst sollte die Expression des EGFP und der chimären EGFP-

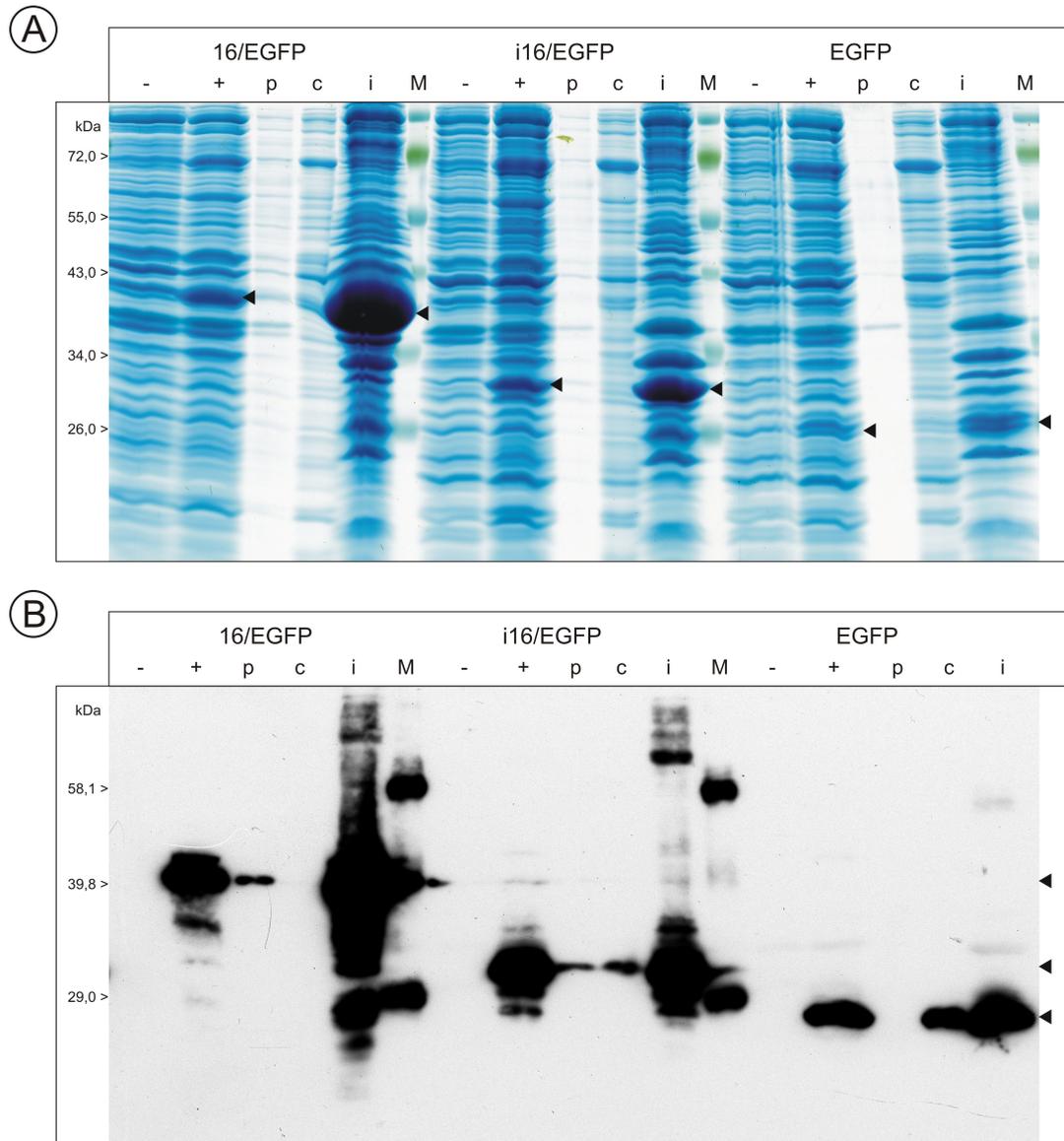


Abb. 3.7: Expressionsanalyse von 16/EGFP, i16/EGFP und EGFP. Die Abbildung zeigt das Ergebnis der Expression der chimären EGFP-Substrate und der EGFP-Kontrolle nach SDS-PAGE und Coomassie-Colloidal-Färbung **(A)** bzw. Western-Blot **(B)**. Dabei wurden stöchiometrische Mengen der Zellen (entsprechend 1 ml Kultur) vor (-) bzw. 3 h nach Induktion mit 1 mM IPTG (+) sowie die Subfraktionen Cytosol (c), *inclusion bodies* (i) und Periplasma (p) aufgetragen. Die entsprechenden Expressionssignale sind mit **schwarzen Pfeilspitzen** markiert. **Bedingungen:** Midi-SDS-PAGE (15% PAA (20 x 20 x 0,1 cm), Western-Blot (SemiDry), ECL-Entwicklung, primärer Antikörper α EGFP 1:1 000, sekundäre Antikörper α RabbitIgG-HRP (1:30 000), StreptavidinHRP (1:10 000); weitere Details siehe [5.1.14](#) (S. 115).

Substrate im kleinen Maßstab (5 ml Kulturen) getestet werden (siehe Abbildung [3.7](#)). Dabei wurden nicht induzierte Zellen und induzierte Zellen (3 h nach Induktion mit 1 mM IPTG) untereinander verglichen. Weiterhin wurden die induzierten Zellen in Periplasma, Cytosol und *inclusion bodies* fraktioniert und nach SDS-PAGE und Coomassie-Colloidal-Färbung bzw. Western-Blot auf den Gehalt der entsprechenden Substrate 16/EGFP, i16/EGFP bzw. der Kontrolle EGFP hin überprüft. Es ist zu erkennen, dass sowohl

für das 16/EGFP als auch für das i16/EGFP in den induzierten Zellen eine deutliche Expressionsbande zu erkennen ist. Die Fraktionierung zeigt, dass dabei der Hauptteil des Proteins in den *inclusion bodies* lokalisiert ist, was aufgrund der Hydrophobizität des Transitpeptids auch zu erwarten war. Im Gegensatz dazu konnte für das EGFP in den induzierten Zellen und in der Fraktion der *inclusion bodies* nur ein schwaches Signal im erwarteten Molekulargewichtsbereich detektiert werden. Die Western-Analyse bestätigt, dass es sich bei den im Coomassie-gefärbten Gel identifizierten Banden um die erwarteten Substrate handelt. Weiterhin ist zu sehen, dass sowohl bei 16/EGFP als auch bei i16/EGFP in der Periplasmafraktion Banden detektierbar sind, im Fall des EGFP jedoch nicht. Es ist bekannt, dass bakterielle Signalpeptide vom Thylakoidsystem erkannt und transportiert werden (Mori & Cline, 1998; Wexler et al., 1998; Halbig et al., 1999a). Auf Grund der hohen Ähnlichkeiten zwischen bakteriellen und plastidären Signalpeptiden wäre somit auch zu erwarten, dass die Signale der thylakoiddirigierenden Domäne des Transitpeptids vom bakteriellen Transportsystem erkannt und zumindest ein Teil des exprimierten Proteins ins Periplasma transportiert wird, auch wenn dies bisher noch nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte. Allerdings sollten diese Substrate dort dann zum reifen EGFP prozessiert werden, da auch die Schnittstelle für die Thylakoidprozessierungspeptidase mit der der Leaderpeptidase kompatibel ist (Halpin et al., 1989). Eine solche Prozessierung ist allerdings nicht zu erkennen (Diskussion siehe 4.1.2, S. 89).

Bei der Expression des EGFP fiel darüber hinaus auf, dass die Zellen nach der Induktion grünlich gefärbt waren. Analysen des Cytoplasmas ergaben eine deutliche EGFP-Fluoreszenz (Daten nicht gezeigt). In der Western-Analyse werden diese Beobachtungen bestätigt, denn in der cytosolischen Subfraktion ist auch hier ein deutliches EGFP-Signal detektierbar.

Die Expressionsdaten können wie folgt zusammengefasst werden: Sowohl die chimären Substrate als auch die EGFP-Kontrolle konnten erfolgreich in *E.coli* überexprimiert werden. Das 16/EGFP zeigt dabei die stärkste, das EGFP die geringste Expression. In allen Fällen ist der größte Teil des Proteins in *inclusion bodies* zu finden. Im Fall des EGFP ist allerdings ein größerer Anteil des Proteins auch im Cytosol detektierbar. Da in dieser Fraktion EGFP-Fluoreszenz nachgewiesen wurde, kann davon ausgegangen werden, dass es sich dabei um gefaltetes EGFP handelt. Somit konnte das EGFP in gefalteter Form direkt aus dem Cytosol (ohne zusätzliche Rückfaltung) präpariert werden.

3.1.4.2 Reinigung der *inclusion bodies*

Der Großteil der zu reinigenden Proteine (16/EGFP und i16/EGFP) befindet sich in den *inclusion bodies*. Die Ausnahme bildet das unfusionierte EGFP, welches direkt aus dem Cytosol präpariert wurde. Die *inclusion bodies* enthalten jedoch störende Verunrei-

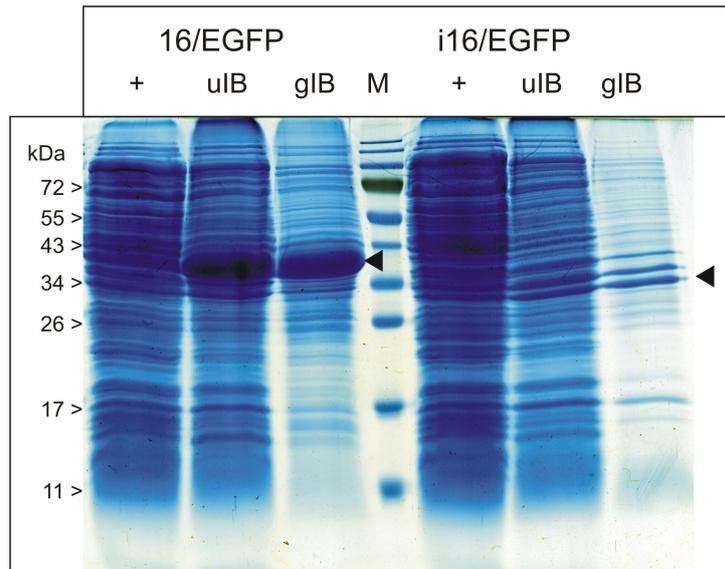


Abb. 3.8: Reinigung der *inclusion bodies*. Die Abbildung zeigt die Reinigung der *inclusion bodies* für das 16/EGFP und i16/EGFP. Aufgetragen sind induzierte, unbehandelte Zellen (+), die daraus isolierten ungereinigten *inclusion bodies* (uIB) und gereinigten *inclusion bodies* (gIB) nach SDS-PAGE (15%iges PAA-Mini-Gel) und Coomassie-Colloidal-Färbung. Die entsprechenden EGFP-Substrate sind mit **schwarzen Pfeilenspitzen** markiert. Die aufgetragenen Proteinmengen an gereinigten und ungereinigten *inclusion bodies* entsprechen dabei gleichen Ausgangsvolumina an Expressionskultur.

nigungen wie Membranen oder Nukleinsäuren. Da bei der Proteinreinigung jeder Reinigungsschritt mit Verlusten behaftet ist, sollten einerseits so wenig Reinigungsschritte wie möglich benutzt werden und andererseits schon das Ausgangsmaterial eine möglichst gute Reinheit besitzen. Aus diesem Grund wurden die *inclusion bodies* einer „Vorreinigung“ unterzogen.

Diese Vorreinigung wurde nach einem von Rudolph et al. (1997) entwickelten Protokoll durchgeführt (siehe 5.2.5.2, S. 126). Zentrale Bestandteile dieser Methode sind zum einen eine DNase-Behandlung der aufgeschlossenen Zellen und zum anderen die Reinigung der *inclusion bodies* mit einer detergenzhaltigen Hochsalzlösung (Entfernung von Membranen und membranassoziierten Proteinen). Das Ergebnis der Reinigung der *inclusion bodies* des 16/EGFP und i16/EGFP ist in Abbildung 3.8 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass durch die Reinigung ein großer Teil der Verunreinigungen (vor allem im niedermolekularen Bereich) entfernt werden konnte. Sowohl für das 16/EGFP als auch für das i16/EGFP war eine deutliche Anreicherung des Zielprodukts möglich. Ein wichtiger Vorteil dieser Reinigung liegt darin, dass störende Membranen und membranassoziierte Proteine zu einem großen Teil entfernt werden. Damit sollte eine Kontamination der Substrate mit membranassoziierten Proteasen, wie z.B. der *E.coli* Leaderpeptidase, vermieden werden. Diese könnte sonst mit den Membranen co-sedimentieren und später, nach erfolgter Rückfaltung, die Substrate proteolytisch angreifen und so im schlimmsten Fall das gesamte Transitpeptid abbauen, was die weitere Verwendung der Substrate unmöglich

machen würde. Die so gereinigten *inclusion bodies* bildeten somit eine optimale Basis für die Rückfaltung und weitere Reinigungsschritte.

3.1.4.3 Rückfaltung

Die Hauptreinigung der Substrate sollte erst mit den rückgefalteten Proteinen durchgeführt werden und dann entsprechend unter nativen Bedingungen erfolgen. Da über-exprimierte Proteine in der Regel in Form von *inclusion bodies* aggregieren, ist es eher die Ausnahme, dass sie wie das EGFP bei der heterologen Überexpression falten und im gefalteten Zustand aus dem Cytosol gereinigt werden können (Marston, 1986). Tatsächlich liegen sowohl das 16/EGFP als auch das i16/EGFP nach der Expression denaturiert als *inclusion bodies* vor und mussten daher gefaltet werden. Mittlerweile gibt es eine Reihe erfolgreicher Methoden, Proteine *in vitro* zu falten (Rudolph & Lilie, 1996).

Da das EGFP keine Disulfidbrücken enthält, konnte die einfache Rückfaltung durch Neutralisation und Verdünnungssprung aus dem sauer denaturierten Zustand angewendet werden. Dabei werden die gereinigten *inclusion bodies* zunächst bei pH 2,5 in 6 M Guanidin/HCl gelöst. Anschließend wird das so denaturierte und gelöste Protein schlagartig verdünnt. Dies geschieht idealerweise durch langsames Eintropfen (30–50 µl/min) von denaturierten, gelösten *inclusion bodies* in einen Überschuss an Pufferlösung (z.B. 30 ml in einen Liter Puffer), die zuvor auf einen pH 7,5–8,5 eingestellt wurde. Dieser Schritt dauert ca. 10–16 h. Nach dieser Zeit ist eine deutliche Eintrübung der Lösung zu erkennen, was auf das Ausfallen eines Teils des Proteins hindeutet. Eine erste EGFP-Fluoreszenz (innerhalb der 16 h) ist erst nach mehreren Stunden (3–5 h) nachweisbar. In einigen Fällen war auch nach 24 h keine Fluoreszenz messbar. Die eigentliche Rückfaltung dauert je nach Substrat zwischen 24–48 h (zum Vergleich: unmodifiziertes GFP benötigt für die Rückfaltung nur 1–2 h (Reid & Flynn, 1997)). Eine Kinetik konnte nicht bestimmt werden, da möglicherweise selbst leichte Änderungen der Bedingungen, wie die Temperatur im Kühlraum oder die Reinheit bzw. Konzentration der *inclusion bodies*, einen Einfluss auf die Faltung haben. Die Ausbeute an gefaltetem Substrat aus 500 ml Kultur lag in einem Bereich zwischen 20–25 mg.

3.1.4.4 Substratreinigung

Im Zuge der Rückfaltung wurden die Substrate stark verdünnt. Aus diesem Grund ist als erster Reinigungsschritt eine Ni-Affinitätsreinigung im „Batch“-Verfahren durchgeführt worden (direkte Zugabe der Matrix zur proteinhaltigen Lösung). Dadurch können Präzipitationseffekte durch lokal zu hohe Proteinkonzentrationen, wie sie besonders bei gepackten Säulen auftreten, vermieden werden. Das gebundene und gefaltete EGFP-Substrat ist sehr gut durch seine intensiv gelbgrüne Farbe zu erkennen, was die Elution erleichtert. Die

Tab. 3.1: Absorptionskoeffizienten des EGFP und der EGFP-Substrate. Dargestellt sind die molaren Absorptionskoeffizienten (ϵ) von 16/EGFP, i16/EGFP und EGFP bei 280 nm nach Gill & von Hippel (1989) in $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, die entsprechende Konzentration bei $\text{Abs}_{280} = 1$ sowie das Molekulargewicht in kDa.

Protein	Absorptionskoeffizient (280 nm)		Molekulargewicht in kDa
	ϵ in $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	c in mg/ml $\hat{=}$ $\text{Abs}_{280} = 1$	
16/EGFP	20 010	1,8	36,1
i16/EGFP	20 010	1,56	31,3
EGFP	20 010	1,34	26,9

Konzentration des eluierten Proteins wurde nach vorheriger Verdünnung der Probe (auf eine maximale Imidazolkonzentration von 20–30 mM) mit Hilfe des UV/VIS-Spektrums bestimmt (Gill & von Hippel, 1989). Dabei wird der molare Extinktionskoeffizient bei 280 nm, basierend auf der Anzahl der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Cystein, berechnet. Eine Übersicht der Extinktionskoeffizienten der entsprechenden Substrate ist in Tabelle 3.1 gezeigt. Für alle verwendeten Proteine (16/EGFP, i16/EGFP und EGFP) ergibt dies denselben Wert ($20\,010\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), da das gesamte Transitpeptid keine der drei Aminosäuren enthält.

In Abbildung 3.9 ist das Ergebnis des ersten Reinigungsschrittes mittels Ni-Affinitätsreinigung am Beispiel des 16/EGFP gezeigt. Dabei wurde eine Verdünnungsreihe, beginnend bei $8\ \mu\text{g}$ 16/EGFP, auf ein SDS-Gel aufgetragen und anschließend Coomassie-Colloidal gefärbt. Die Quantifizierung der Banden ergab einen Reinheitsgrad von ca. 90%. Es ist zu erkennen, dass neben der erwarteten 16/EGFP-Bande noch Verunreinigungen vorhanden sind. Diese sollten in einem weiteren Reinigungsschritt minimiert werden.

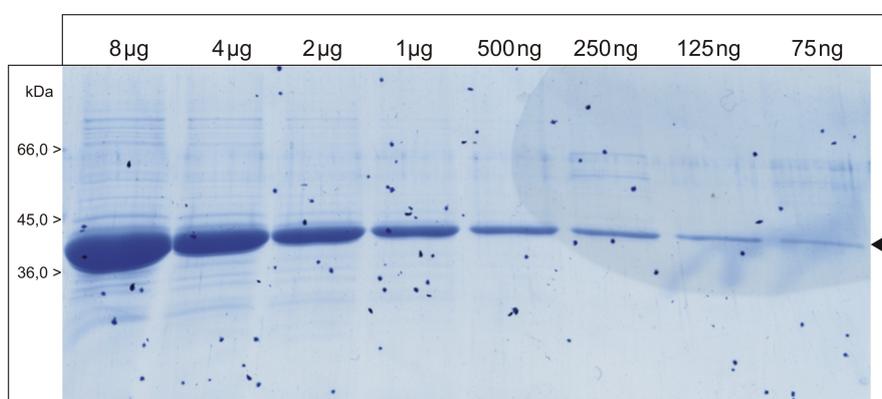


Abb. 3.9: Ergebnis der Ni-Affinitätsreinigung des 16/EGFP. Die Abbildung zeigt das über Ni-Affinitätschromatographie gereinigte 16/EGFP nach SDS-PAGE und Coomassie-Colloidal-Färbung. **Bedingungen:** Mini-SDS-Gel (15% PAA, HOEFER-Minigel).

Da aufgrund der Faltung weiter unter nativen Bedingungen gearbeitet werden muss, wurde beim zweiten Reinigungsschritt die Ionenaustauschchromatographie (IEX) verwendet. Aufgrund der Anforderungen an die Reinheit des Proteins und die Reproduzierbarkeit der Reinigungsmethode, wurde ein automatisiertes FPLC-System verwendet (Ettan-*LC* System von AMERSHAM-BIOSCIENCES (GE-HEALTHCARE)). Mit den dabei verwendeten MiniQ/MonoQ-Säulen (Anionenaustauscher, MiniQ – analytischer Maßstab, MonoQ – semipräparativer Maßstab) stand uns ein passendes System, für die zuvor genannten Anforderungen zur Verfügung.

Die IEX-Reinigung mit Hilfe des Ettan-*LC* FPLC-Systems ist am Beispiel des 16/EGFP in Abbildung 3.10 gezeigt. Im Trennprofil ist ein dominanter „Peak“ mit einem Maximum in den Fraktionen A3 und A4 zu erkennen. Dabei ist die Absorption des gefalteten

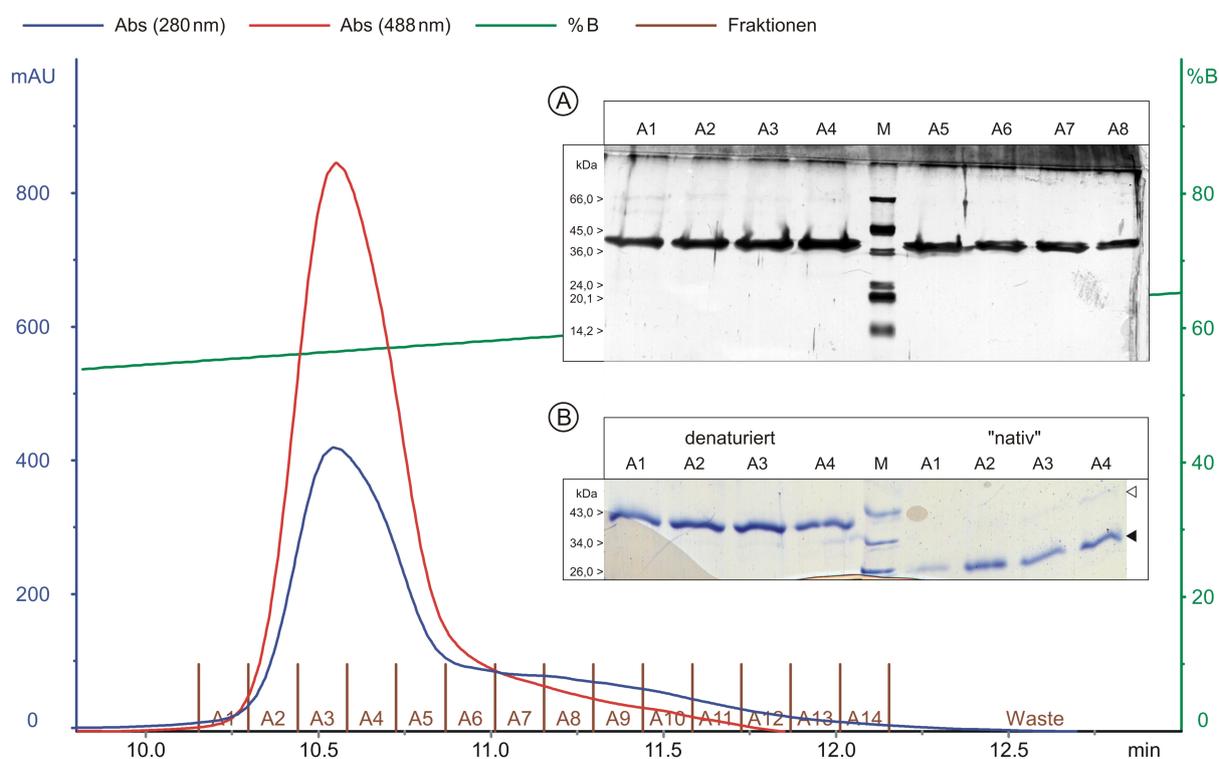


Abb. 3.10: Reinigung des 16/EGFP mittels Ionenaustauschchromatographie (IEX). Chromatogramm nach IEX-Trennung von ca. 700 µg 16/EGFP mit dem Ettan-FPLC-System (MonoQ-Säule). Insert (A) zeigt die Elutionsfraktionen (je 1 µg) nach SDS-PAGE und Silberfärbung. Insert (B) zeigt die Fraktionen A1–A4 nach denaturierender und „nativer“ SDS-PAGE sowie Coomassie-Colloidal-Färbung. 10 µl der einzelnen Fraktionen wurden unter **denaturierenden** (Laemmli-Probenpuffer, thermische Denaturierung) und **„nativen“** Bedingungen (Probenpuffer 0,1% SDS, ohne Mercaptoethanol, ohne thermische Denaturierung) der SDS-PAGE unterzogen. Die denaturierten Proteine sind mit **weißen Pfeilspitzen**, die nativen mit **schwarzen Pfeilspitzen** markiert. **Bedingungen:** Säule: MonoQ 5/50; Eluent A: 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 3 M Harnstoff; Eluent B: 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 3 M Harnstoff; 500 mM NaCl; Flussrate: 350 µl/min; 3-Stufengradient, Details siehe 5.2.8, S. 128; Mini-SDS-Gel (15% PAA, HOEFER-Minigel).

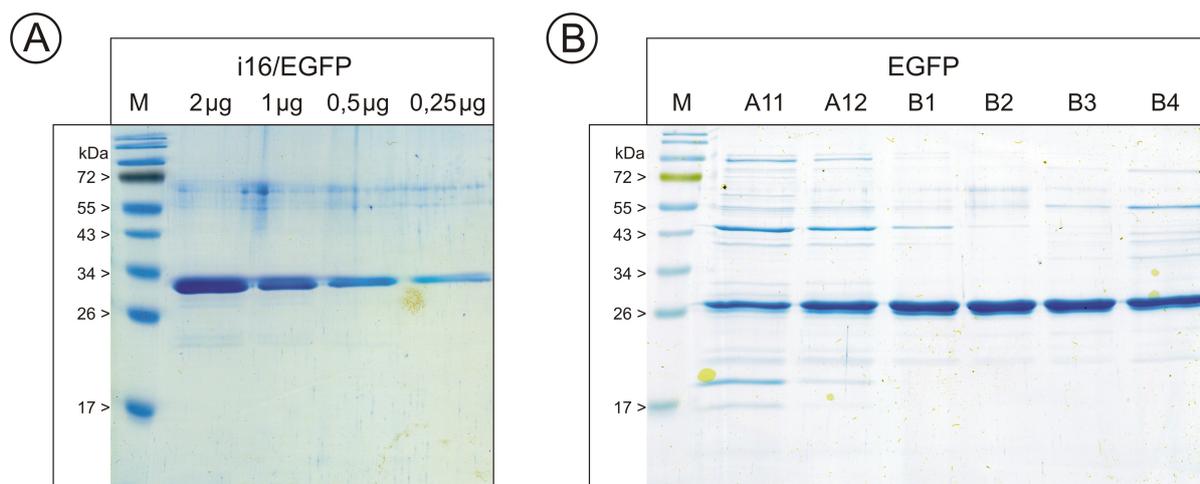


Abb. 3.11: IEX-Reinigung des i16/EGFP und EGFP. Die Abbildung zeigt die mit Ionenaustauschchromatographie gereinigten i16/EGFP (A) und EGFP (B) nach SDS-PAGE und Coomassie-Colloidal-Färbung. Im Fall des i16/EGFP wurde eine Verdünnungsreihe des gereinigten Substrats, beim EGFP je 1 µg der Elutionsfraktionen aufgetragen. **Bedingungen:** Mini-SDS-Gel (15% PAA, HOEFER-Minigel), Proteinbestimmung nach Gill & von Hippel (1989), vgl. Tabelle 3.1 (S.34).

EGFP (488 nm) rot und die Proteinabsorption (280 nm) blau dargestellt. Alle getesteten Fraktionen A1–A8 (Insert A) zeigen eine Reinheit von mindestens 98%. Anhand des Elutionsprofils (Absorptionen) ist jedoch zu erkennen, dass nur die ersten fünf Fraktionen eine EGFP-Chromophorabsorption zeigen, was ein Hinweis darauf ist, dass nur diese Fraktionen gefaltetes Substrat enthalten. Mit fortschreitender Elution nimmt das EGFP-Absorptionssignal stärker ab, als das Proteinabsorptionssignal.

Die Ergebnisse der IEX-Reinigung des i16/EGFP sowie EGFP sind in Abbildung 3.11 dargestellt. Abbildung 3.11 (A) zeigt eine Verdünnungsreihe von Fraktionen, die nach der IEX-Trennung bereits vereinigt wurden. Auch in diesem Fall kann von einer Reinheit von über 98% ausgegangen werden. Bei Betrachtung der Elutionsfraktionen des EGFP zeigt sich ein etwas anderes Bild als beim 16/EGFP. Die saubersten Fraktionen sind erst mit fortschreitender Elution zu erkennen. Dennoch besitzen diese eine Reinheit von mindestens 95% (Abbildung 3.11 B, Fraktionen B1, B2). Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass es möglich war, durch die von uns angewandten Methoden, Substrate mit einer Reinheit von 95–98% zu erhalten.

3.1.4.5 Bestimmung des Faltungsgrads

Nachdem beide Substrate (16/EGFP und i16/EGFP) sowie die Kontrolle EGFP in hoher Reinheit zur Verfügung standen, sollte nun der Faltungsgrad bestimmt werden. Dazu war es nötig sicherzustellen, dass bei späteren Konkurrenzexperimenten klar zwischen den gefalteten und ungefalteten Substraten unterschieden werden konnte. Als Ziel sollte

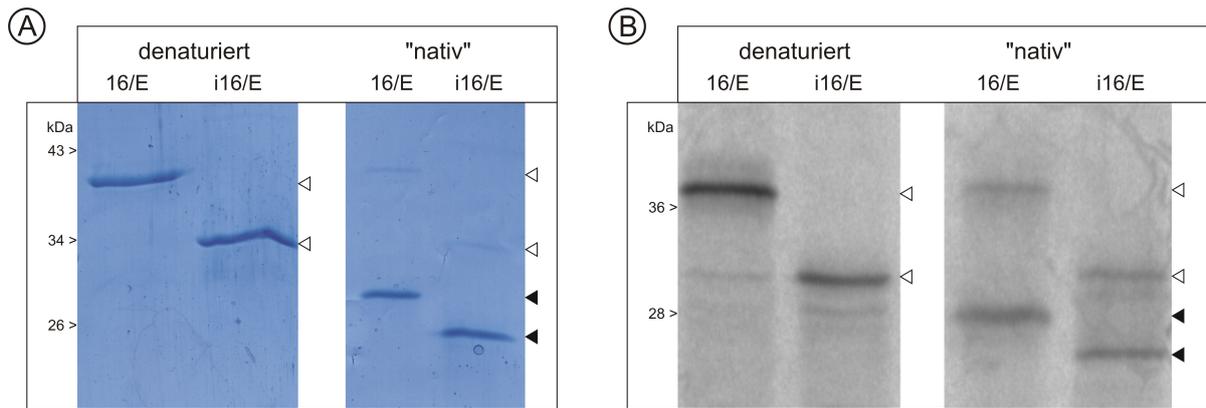


Abb. 3.12: Bestimmung des Faltungsgrades des 16/EGFP und i16/EGFP anhand des Laufverhaltens im SDS-Gel. Dazu wurden die zuvor IEX-gereinigten (A) bzw. die *in vitro* translatierten Proben (B) zum einen **denaturiert** (normaler Laemmli-Probenpuffer und thermische Denaturierung) bzw. „**nativ**“ (Laemmli Probenpuffer ohne Mercaptoethanol und nur 0,1% SDS, ohne thermische Denaturierung) einer SDS-PAGE unterzogen, anschließend Coomassie-Colloidal gefärbt bzw. getrocknet und die Radioaktivität mittels Autoradiographie detektiert. Die denaturierten Proteine sind dabei mit **weißen** Pfeilspitzen, die nativen mit **schwarzen** Pfeilspitzen markiert. Geladen wurden je 1 µg der einzelnen Substrate bzw. je 1 µl der *in vitro* Translation. **Bedingungen:** vgl. Legende zu Abbildung 3.11, Autoradiographie für 12 h, Auswertung durch Software FUJIFILM® ImageGauge V4.0.

dabei ein Faltungsgrad von mindestens 90% gelten. Die Fluoreszenz kann dabei nicht als Marker für den Faltungsgrad benutzt werden, da der ungefaltete Anteil an EGFP über die Fluoreszenz nicht bestimmbar ist.

Eine Besonderheit des EGFP ist, dass es in SDS bis zu einer Konzentration von 2% vollständig gefaltet bleibt (Alkaabi et al., 2005). Aus diesem Grund ist es möglich, die nativ gereinigten Substrate auf ein „normales“ SDS-Gel zu laden. Der Unterschied besteht jedoch darin, dass im Ladepuffer auf Mercaptoethanol und hohe SDS-Konzentrationen verzichtet wird (nur 0,1% SDS) und die Proben nicht thermisch denaturiert werden. Dabei läuft das gefaltete Substrat aufgrund seiner globulären Struktur im PAA-Gel schneller als das ungefaltete Protein. Die Abbildung 3.12 zeigt das Resultat eines solchen Experiments am Beispiel der IEX-gereinigten und durch *in vitro* Translation gewonnenen 16/EGFP und i16/EGFP. Es ist zu erkennen, dass im Fall der IEX-gereinigten Substrate unter „nativen“ Elektrophoresebedingungen in Höhe der denaturierten Proteine kaum noch Signale detektierbar sind. Die Quantifizierung ergab dabei einen Anteil an ungefalteten Substrat von weniger als 8% und damit einen Faltungsgrad von über 92%. Die *in vitro* translatierten Substrate zeigen ein ähnliches Bild. Auch hier liegt der größere Teil des Proteins auch ohne separate Rückfaltung in gefalteter Form vor. Die Quantifizierung ergab in diesen Fällen einen Faltungsgrad von mehr als 70%.

Die Analysen des Faltungsgrades haben gezeigt, dass nach der Reinigung mittels Ni-Affinitätschromatographie und anschließender Ionenaustauschchromatographie mit dem

16/EGFP und i16/EGFP sowie dem EGFP als Kontrolle insgesamt drei Proteine mit einer Reinheit von über 95% und einem Faltungsgrad von mindestens 90% für Konkurrenzexperimente zur Verfügung stehen.

3.1.4.6 Stabilität und Löslichkeit der chimären EGFP-Substrate

Die gereinigten Substrate, die in Importreaktionen als Kompetitoren zum Einsatz kommen sollten, wurden nach der Reinigung zunächst in Neutralpuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,5, 50 mM NaCl bzw. 20 mM Phosphatpuffer pH 7,5, 50 mM NaCl) aufgenommen und bei Raumtemperatur gelagert, da aufgrund der Stabilität des EGFP davon ausgegangen wurde, dass die Substrate bei Raumtemperatur stabil sind. Es fiel jedoch auf, dass nach bereits sieben Tagen ein Großteil des Substrats ausfällt (siehe Abbildung 3.13). Es ist deutlich zu erkennen, wie die Fluoreszenz aufgrund der fortschreitenden Präzipitation abnimmt. Auch der Zusatz von 0,1% SDS brachte keine Verbesserung. Nach einer Reihe von Tests mit verschiedenen Salzkonzentrationen stellte sich heraus, dass bei der Lagerung bei 4°C und der Zugabe von 500 mM NaCl die Aggregation fast vollständig unterdrückt werden konnte. Um zu überprüfen, ob das 16/EGFP unter diesen Bedingungen Oligomere bildet, wurde dieses mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation untersucht (in Kooperation mit Hauke Lilie, Arbeitsgruppe Prof. Rudolph). Diese Untersuchungen ergaben, dass unter

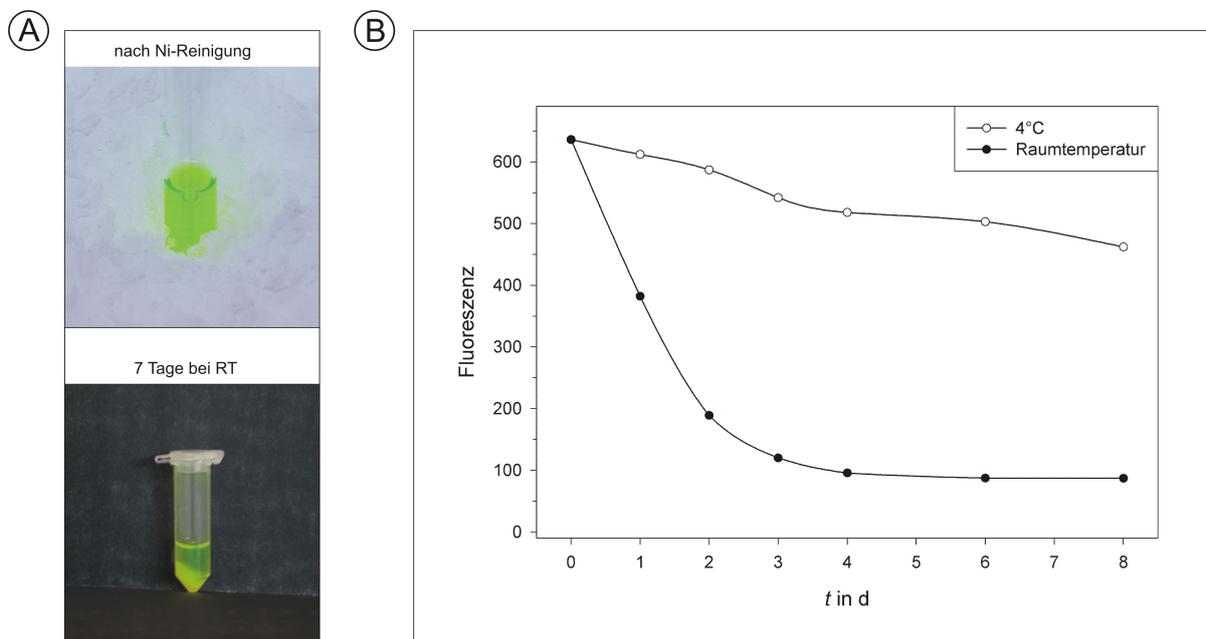


Abb. 3.13: Präzipitationsverhalten des 16/EGFP in wässriger Lösung bei Raumtemperatur. Die Abbildung zeigt am Beispiel des 16/EGFP dessen Präzipitation in wässriger Lösung. Dabei sind Bilder von frisch dialysiertem 16/EGFP und dieselben Proben nach 7-tägiger Lagerung bei Raumtemperatur (20 mM Phosphatpuffer pH 7,5, 50 mM NaCl) dargestellt (A). Die Grafik (B) zeigt die Kinetik dieses Präzipitationsverhalten. Dazu wurde jeweils die Fluoreszenz des Überstandes nach Zentrifugation (5 min, 12 000 x g) gemessen.

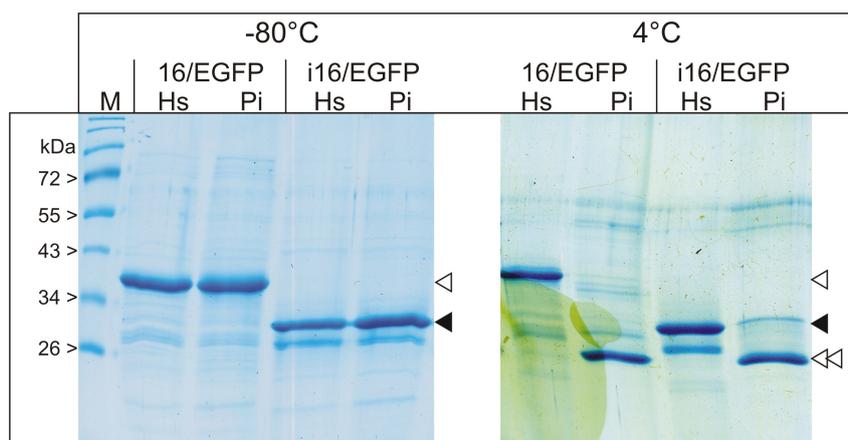


Abb. 3.14: Degradation von 16/EGFP und i16/EGFP. Die Abbildung zeigt die Analyse von 16/EGFP und i16/EGFP nach 8 Wochen Lagerung in 3M Harnstoff (**Hs**) bzw. 20 mM Phosphatpuffer/500 mM NaCl (**Pi**) bei 4°C und -80°C. Dazu wurden Proben der Substrate (nach Ni-Affinitätsreinigung und 8 Wochen Lagerung) auf ein SDS-Gel aufgetragen (denaturiert) und anschließend Coomassie-Colloidal gefärbt. Die **weiße Pfeilspitze** markiert das 16/EGFP, die **schwarzen Pfeilspitze** das i16/EGFP und der **Doppelpfeil** das Endprodukt der Degradation. **Bedingungen:** je 1 µg Probe, 15% PAA Minigel (HOEFER), Coomassie-Colloidal-Färbung.

den gewählten Bedingungen (20 mM Tris/HCl pH 7,5 und 500 mM NaCl) keine Oligomere des 16/EGFP messbar waren (Hauke Lilie, persönliche Mitteilung).

Schon während der ersten Ni-Affinitätsreinigungen zeigte sich allerdings noch ein weiteres Problem. Nach längerer Lagerung bei 4°C (4–8 Wochen) wurde festgestellt, dass das gereinigte Substrat degradiert wird. Die Peptidbindungen sind in der Regel so stabil, dass chemische Spaltungsprozesse als Erklärung für die Degradation nicht in Frage kommen. Deshalb wurde zum Vergleich frisch präpariertes 16/EGFP und i16/EGFP nach Ni-Affinitätsreinigung zum einen gegen Phosphatpuffer (20 mM Phosphat pH 7,5 und 500 mM NaCl) und zum anderen gegen einen harnstoffhaltigen Puffer (3M Harnstoff, 20 mM Tris/HCl pH 7,5) dialysiert. Nach 8 Wochen Lagerung bei 4°C wurden Aliquots mittels SDS-PAGE und Coomassie-Colloidal-Färbung analysiert (siehe Abbildung 3.14). Als Kontrolle wurden Proben für dieselbe Zeit und in den gleichen Puffern bei -80°C gelagert. Es ist zu erkennen, dass die in Phosphatpuffer gelagerten Proben des 16/EGFP und i16/EGFP innerhalb von 8 Wochen zu einem Fragment abgebaut werden, das der Größe des reifen EGFP entspricht. Die in harnstoffhaltigem Puffer gelagerten Proben (s.o.) zeigen dagegen keine Degradation. Diese Ergebnisse weisen auf eine Beteiligung proteinogener Faktoren (z.B. Proteasen) hin. Auf den Einsatz von Proteaseinhibitoren wurde jedoch verzichtet, da ein möglicher Einfluss dieser Inhibitoren auf die späteren Konkurrenzexperimente (z.B. durch Modifikation der Substrate) verhindert werden sollte. Auf Basis dieser Ergebnisse wurden die gereinigten Substrate direkt nach der Reinigung aliquotiert und bei -80°C in 20 mM Phosphat/500 mM NaCl pH 7,5 gelagert.

3.1.5 Spektrometrische Analyse der EGFP-Substrate

Nachdem Substrate mit einer Reinheit über 95% und einem Faltungsgrad von mindestens 90% zur Verfügung standen, sollten diese auf ihre spektrometrischen Eigenschaften hin untersucht werden. Dazu wurden neben den UV/VIS- auch CD-Spektren (Circulardichroismus) aufgenommen. Die UV/VIS-Spektren geben dabei Informationen über den Zustand des Chromophors. Das Absorptionsspektrum des GFP-Chromophors ist abhängig von der Tertiärstruktur, da sich bei Änderung der Tertiärstruktur die Wechselwirkungen zwischen Chromophor und den umgebenden Aminosäureresten ändern können. Dadurch verändert sich das für die Absorption verantwortliche delokalisierte π -Elektronensystem. Eine solche Veränderung äußert sich dann in einer Veränderung des Absorptionsspektrums. Die CD-Spektren liefern hingegen Informationen über die Sekundärstruktur der Substrate und lassen durch den Vergleich des 16/EGFP bzw. i16/EGFP mit dem EGFP Rückschlüsse auf die Struktur des Transit-/Signalpeptids zu.

3.1.5.1 Chromophoranalysen mittels UV/VIS-Spektroskopie

Die UV/VIS-Analyse dient zur Bestimmung des Zustandes des GFP-Chromophors. Dazu wurden die Absorptionsspektren des rückgefalteten und gereinigten 16/EGFP, i16/EGFP und EGFP aufgenommen. Ist das EGFP-Chromophor korrekt zyklisiert, oxidiert und in der 3D-Struktur des EGFP eingebunden (richtige Tertiärstruktur mit den entsprechenden H-Brücken, vgl. Abbildung 2.5, S. 17), besitzt es ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 488 nm (zusätzlich zur proteintypischen Absorption bei 280 nm, die auf die aromatischen Aminosäurereste zurückzuführen ist). Abbildung 3.15 zeigt vergleichend die

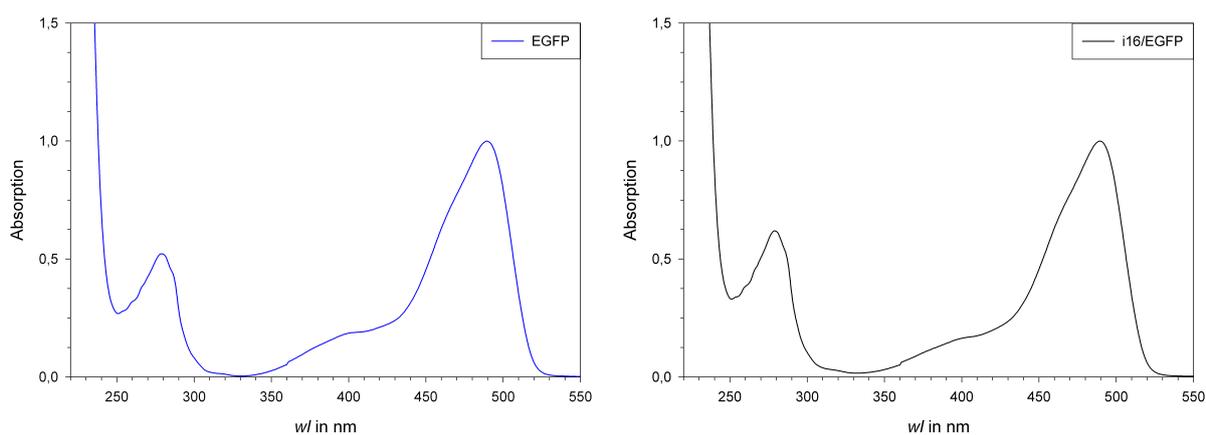


Abb. 3.15: UV/VIS-Spektren von i16/EGFP und EGFP. Die Abbildung zeigt die UV/VIS-Spektren (220–550 nm, normiert auf EGFP-Absorption bei 488 nm) des rückgefalteten und gereinigten i16/EGFP (blau) und EGFP (schwarz). Beide Proteine befinden sich dabei in 20 mM Phosphat pH 7,5 und 0,5 M NaCl. **Bedingungen:** SHIMADZU UV-1602 UV/VIS-Spektrometer, Küvette d = 10 mm, Datenauswertung über SHIMADZU UVPC-Software und SIGMAPLOT.

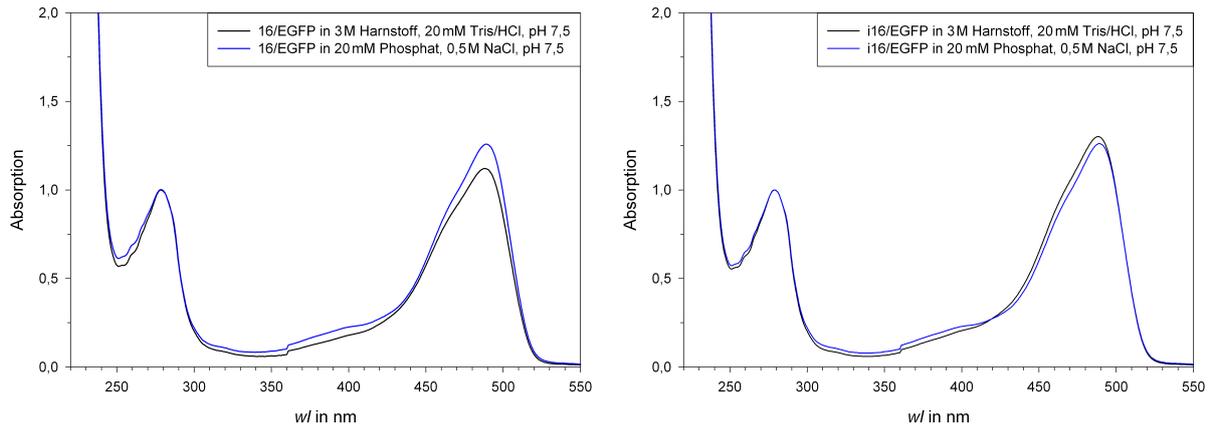


Abb. 3.16: UV/VIS-Spektren von 16/EGFP und i16/EGFP. Die Abbildung zeigt die UV/VIS-Spektren (220–550 nm, normiert auf Proteinabsorption bei 280 nm) des rückgefalteten und gereinigten 16/EGFP und i16/EGFP sowohl in Phosphat- als auch Harnstoffpuffer (Details siehe Bildlegende). **Bedingungen:** siehe Legende zu Abbildung 3.15.

Absorptionsspektren von EGFP und i16/EGFP. Beide Proteine wurden zur Messung in Phosphatpuffer aufgenommen (20 mM Phosphat pH 7,5 und 0,5 M NaCl). Im Bereich der EGFP-Chromophor-bedingten Absorption (350–550 nm) unterscheiden sich die Spektren des EGFP und i16/EGFP nicht voneinander und stimmen mit den publizierten Chromophorspektren des EGFP überein (Cormack et al., 1996; Patterson et al., 1997; Kremers et al., 2007). Dies lässt auf eine korrekte Tertiärstruktur des EGFP bzw. des EGFP-Teils im i16/EGFP und damit verbunden auf den korrekten Einbau des Chromophors schließen.

Infolge der Stabilitätsprobleme der Substrate sollte nun untersucht werden, ob die Verwendung des Harnstoffpuffers einen Einfluss auf die Struktur des EGFP und damit auf dessen Chromophor hat (siehe Abbildung 3.16). Dazu wurde in Harnstoffpuffer (3 M Harnstoff und 20 mM Tris/HCl, pH 7,5) aufgenommenes 16/EGFP und i16/EGFP mit den Spektren der gegen Phosphatpuffer (20 mM Phosphat pH 7,5 und 0,5 M NaCl) dialysierten Substrate verglichen. Dabei ist zu erkennen, dass die Verwendung von 3 M Harnstoff keinen Einfluss auf das UV/VIS-Spektrum des i16/EGFP hat. Der geringfügige Unterschied beider Spektren kann mit systembedingten Schwankungen im Messfehlerbereich erklärt werden. Das 16/EGFP zeigt in 3 M Harnstoff eine verringerte Chromophorabsorption. Dieser Unterschied ist mit ca. 10% zu groß, um allein mit Gerätefehlern begründet zu werden. Möglicherweise ist im Fall des 16/EGFP ein kleiner Teil des gemessenen Proteins ungefaltet, was zu einer verminderten Chromophorabsorption bei 488 nm führt.

In späteren Competitionsexperimenten sollte neben dem gefalteten auch das entfaltete Substrat eingesetzt werden. Dazu wurde das 16/EGFP und i16/EGFP mittels TCA-Fällung denaturiert und anschließend nach zweimaligem Waschen mit Aceton in 8 M Harn-

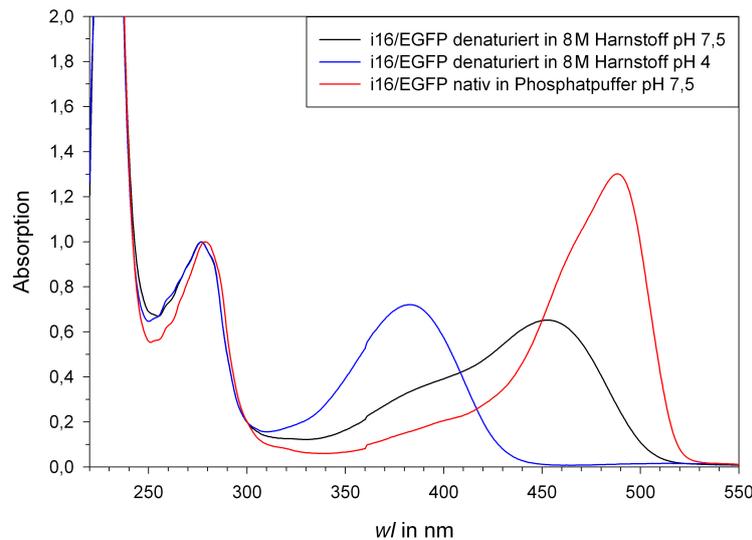


Abb. 3.17: UV/VIS-Spektren von gefaltetem und ungefaltetem i16/EGFP. Die Abbildung zeigt die UV/VIS-Spektren (220–550 nm, normiert auf Proteinabsorption bei 280 nm) von rückgefalteten und gereinigten i16/EGFP sowie, durch TCA-Fällung und Aufnahme in 8 M Harnstoff, denaturierten i16/EGFP (sowohl pH 7,5 als auch pH 4). **Bedingungen:** siehe Legende zu Abbildung 3.15 (S. 40).

stoff, 20 mM Phosphat pH 7,5) aufgenommen. Nun sollten die Unterschiede der UV/VIS-Spektren zwischen gefalteten und ungefalteten Substraten untersucht werden.

Abbildung 3.17 zeigt vergleichend die UV/VIS-Spektren am Beispiel des i16/EGFP sowohl unter nativen Bedingungen als auch nach der Denaturierung. Zusätzlich wurde denaturiertes i16/EGFP unter sauren Bedingungen (pH 4) gemessen. Nach der Aufnahme des TCA-gefällten i16/EGFP in 8 M Harnstoff (inkl. 20 mM Phosphat pH 7,5) war zwar eine deutliche Gelbfärbung der Lösung zu erkennen, aber es konnte keine Fluoreszenz (in einem Anregungswellenlängenbereich von 470–490 nm) mehr nachgewiesen werden. Dies deutet zwar auf das Vorhandensein des Chromophors hin (gelbe Färbung), jedoch war dieses in einem veränderten Zustand, in dem keine Fluoreszenz mehr möglich ist (zerstörte Sekundär- und Tertiärstruktur). Die Spektren bestätigen zwar diesen ersten Eindruck, werfen jedoch neue Fragen auf. Das Absorptionsmaximum verschiebt sich nach Denaturierung im neutralen pH von 488 nm (nativ) zu ca. 450 nm. Diese Wellenlänge entspricht einer leichten Schulter, die bereits im Spektrum des nativen i16/EGFP zu sehen war. Damit kann diese Schulter mit einem geringen Anteil an denaturiertem EGFP-Substrat erklärt werden. Allerdings ist beim denaturierten i16/EGFP eine weitere Schulter zu erkennen (370–380 nm), die ebenfalls, wenn auch in geringerer Ausprägung, im nativen i16/EGFP zu sehen ist.

Durch Änderung des pH-Wertes der denaturierten Probe auf pH 4, entfärbt sich die Lösung vollständig und das Spektrum verändert sich nochmals. Das sauer denaturierte

i16/EGFP zeigt nun ein Absorptionsmaximum bei ca. 370–380 nm, wie es bereits unter neutral-denaturierenden und nativen Bedingungen als Schulter zu sehen war. Daraus kann geschlossen werden, dass ein Teil des neutral-denaturierten i16/EGFP (pH 7,5), wie auch ein Teil des nativen i16/EGFP, in einem Zustand vorliegen, der dem denaturierten i16/EGFP bei saurem pH (pH 4) entspricht. Das Signal im Bereich von 450 nm ist bereits von [Kneen et al. \(1998\)](#) beobachtet, aber nicht diskutiert worden. Basierend auf den bisherigen Literaturdaten gilt allerdings eine Chromophorabsorption bei 375 nm als Merkmal für denaturiertes EGFP ([Reid & Flynn, 1997](#)). CD-Messungen des denaturierten i16/EGFP in 8 M Harnstoff (pH 7,5) haben gezeigt, dass dieses keine Sekundärstruktur mehr besitzt und dementsprechend vollständig entfaltet vorliegt (vgl. Abschnitt [3.1.6, S. 45](#)). Daraus kann geschlossen werden, dass die beobachtete Chromophorabsorption bei ca. 450 nm in 8 M Harnstoff (pH 7) dem Chromophor im entfalteten Zustand des EGFP unter neutralen Bedingungen entspricht.

Somit stehen für die folgenden Experimente neben dem nativen i16/EGFP, 16/EGFP und EGFP (mit hohem Reinheits- und Faltungsgrad) auch denaturiertes i16/EGFP und 16/EGFP zur Verfügung. Die Spektren der denaturierten Substrate bei pH 4 stimmen dabei mit den in der Literatur beschriebenen Spektren für denaturiertes EGFP überein. Aufgrund der CD-spektrometrischen Analysen kann aber davon ausgegangen werden, dass auch das entfaltete EGFP in 8 M Harnstoff (pH 7) bereits vollständig entfaltet vorliegt.

3.1.5.2 CD-Spektren

Eine wichtige Frage, die sich aus der Rückfaltung der chimären Substrate ergab, war, in welchem Faltungszustand sich das Transitpeptid/Signalpeptid befindet. Durch Analysen der Sekundärstruktur mittels CD-Spektroskopie sollte deshalb herausgefunden werden, ob neben dem EGFP möglicherweise auch die Transit- und Signalpeptide eine Sekundärstruktur ausbilden. Diese Rückschlüsse sind möglich, da bei Proteinen die Eliptizität (Messgröße der CD-Spektroskopie) auf die mittlere molare Masse aller enthaltenen Aminosäurereste ($MRW = \textit{mean residue weight}$) bezogen werden kann. Die resultierende mittlere molare Eliptizität wird dabei nach Gleichung [3.1](#) berechnet, wobei Θ die Eliptizität, c die Proteinkonzentration (in g/mol) und d die Schichtdicke der Küvette (in cm) ist.

$$\Theta_{MRW} = \frac{\Theta \cdot MRW}{c \cdot d} \left[\frac{\text{grad} \cdot \text{cm}^2}{\text{dmol}} \right] \quad (3.1)$$

Durch diese normierte Größe wird gewährleistet, dass CD-Spektren von verschiedenen Proteinen direkt miteinander verglichen werden können. Aus diesem Grund ist es möglich, Strukturdaten mathematisch voneinander abzuziehen und nach Messung der CD-Spektren

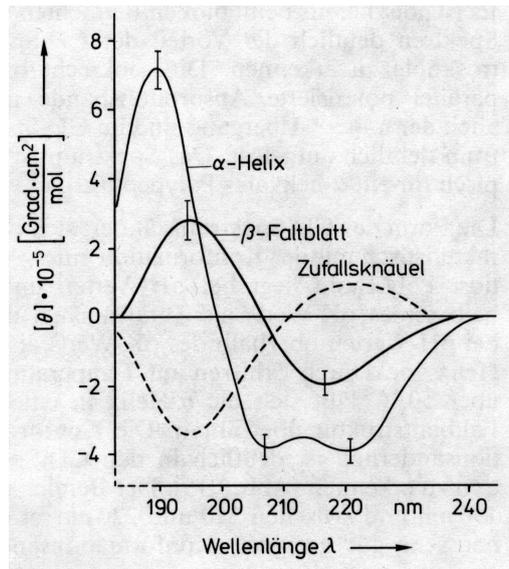


Abb. 3.18: Sekundärstrukturen im CD-Spektrum aus H.-J. Galla (1988). Die Abbildung zeigt die theoretischen Grenzstrukturen der möglichen Sekundärstrukturen im CD-Spektrum.

von EGFP, 16/EGFP und i16/EGFP das resultierende Spektrum des Transit- bzw. Signalpeptids zu berechnen. Eine Übersicht der möglichen Sekundärstrukturen von Proteinen (theoretische Idealfälle) ist in Abbildung 3.18 dargestellt. Für die Sekundärstrukturelemente α -Helix und β -Faltblatt ergeben sich charakteristische CD-Spektren. Die α -helikale Konformation zeichnet sich durch Minima bei ca. 222 und 208 nm und durch ein Maximum bei 192 nm aus. β -Faltblattstrukturen sind durch ein Minimum bei 216 nm und ein Maximum bei ca. 195 nm charakterisiert. Die ungeordnete Konformation (*random coil*) zeigt ein ausgeprägtes Minimum unterhalb von 200 nm. Der Anteil der jeweiligen Strukturelemente lässt sich anhand der bekannten Grenzstrukturen berechnen.

Im Fokus des Interesses stand allerdings zunächst die Frage, ob die Transit- bzw. Signalpeptide der Substrate Sekundärstrukturen besitzen. Dazu wurden von rückgefaltetem und gereinigtem 16/EGFP, i16/EGFP und EGFP CD-Spektren aufgenommen. Das Ergebnis der Messungen ist in Abbildung 3.19 dargestellt. Dabei wurde in den entsprechenden Grafiken neben den gemessenen Spektren auch die berechneten Spektren des Transitpeptids (16/EGFP) und des Signalpeptids (i16/EGFP) eingefügt. In allen Fällen ist wie erwartet, die β -Faltblattstruktur des EGFP deutlich an seinem Minimum bei 216 nm zu erkennen. Sowohl beim 16/EGFP als auch beim i16/EGFP weisen die berechneten Strukturen des Transit- bzw. Signalpeptids eine „*random coil*“ Struktur auf (Minimum unterhalb 220 nm). Die beschriebenen Messungen beziehen sich auf Phosphatpuffer (20 mM Phosphat pH 7,5, 0,5 M NaCl), konnten aber für den bereits verwendeten Harnstoffpuffer (3 M Harnstoff und 20 mM Tris/HCl, pH 7,5) ebenfalls reproduziert werden (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der verwendeten Puffer war es nicht möglich CD-Spektren im Bereich

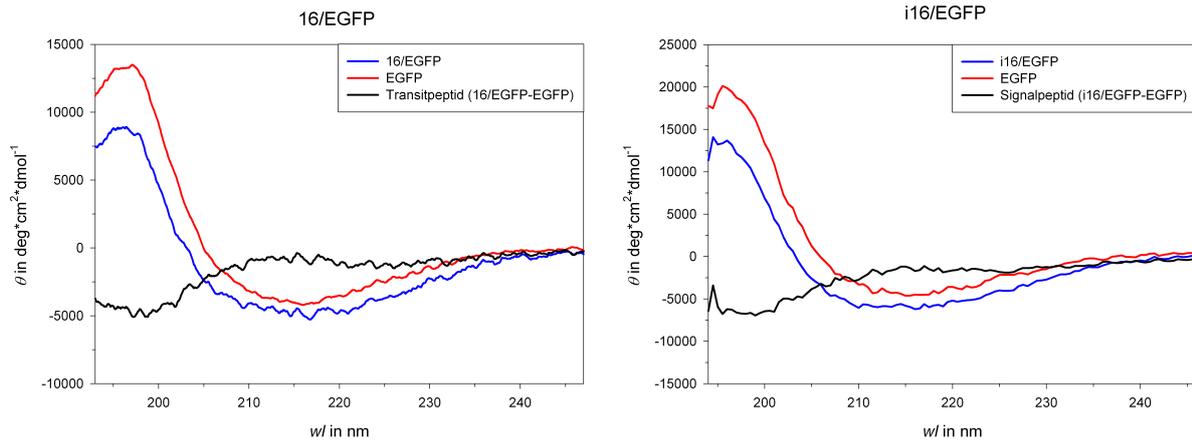


Abb. 3.19: CD-Spektren von 16/EGFP und i16/EGFP. Die Abbildung zeigt das CD-Spektrum des 16/EGFP und des i16/EGFP im Vergleich zum EGFP. Dabei sind das 16/EGFP und i16/EGFP jeweils **blau**, die EGFP-Referenz **rot** und die berechnete Struktur des Transitpeptids (16/EGFP) bzw. des Signalpeptids (i16/EGFP) **schwarz** dargestellt. **Bedingungen:** Proben in 20 mM Phosphat pH 7,5, 0,5 M NaCl; $c_{\text{EGFP}} = 0,81$ mg/ml, $c_{16/\text{EGFP}} = 0,33$ mg/ml, $c_{i16/\text{EGFP}} = 0,97$ mg/ml; Küvette $d = 0,01$ cm; JASCO J-710 Spektralphotometer; Auswertung über JASCO Spectra manager und SIGMAPLOT.

von 195 nm ausreichend genau zu messen, um Aussagen über Sekundärstrukturen anhand der Maxima (α -Helix 192 nm und β -Faltblatt 195 nm) treffen zu können.

Zusammenfassend kann aus den vorliegenden CD-Daten geschlossen werden, dass sowohl das Transitpeptid des 16/EGFP als auch das Signalpeptid des i16/EGFP, unter den gewählten Bedingungen eine ungeordnete Struktur (*random coil*) aufweisen.

3.1.6 Strukturanalysen der entfalteten EGFP-Substrate

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, zeichnet sich das Tat-System besonders durch die Fähigkeit aus, gefaltete Proteine zu transportieren. Im Fall des bakteriellen Tat-Systems wird davon ausgegangen, dass nur zuvor gefaltete Substrate transportiert werden (Lee et al., 2006). Neuere Ergebnisse im *E.coli*-System haben jedoch gezeigt, dass zumindest kleine hydrophile Proteine auch vom bakteriellen Tat-System ungefaltet transportiert werden können (Richter et al., 2007). Für das pflanzliche Tat-System ist gezeigt, dass neben gefalteten auch fehlerhaft gefaltete Substrate transportiert werden können (Hynds et al., 1998).

Aufgrund dieser Diskussion sollte der Faltungszustand der von uns verwendeten entfalteten EGFP-Substrate unter den verwendeten Importbedingungen strukturell analysiert werden. Dazu wurden CD-Spektren des mittels TCA-Fällung entfalteten und in 8 M Harnstoff gelösten i16/EGFP aufgenommen. Zusätzlich wurden Spektren von demselben Protein aufgenommen nachdem die Harnstoffkonzentration auf 200 mM verringert wurde, was den Importbedingungen der Konkurrenzexperimente entspricht. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 3.20 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sich bereits

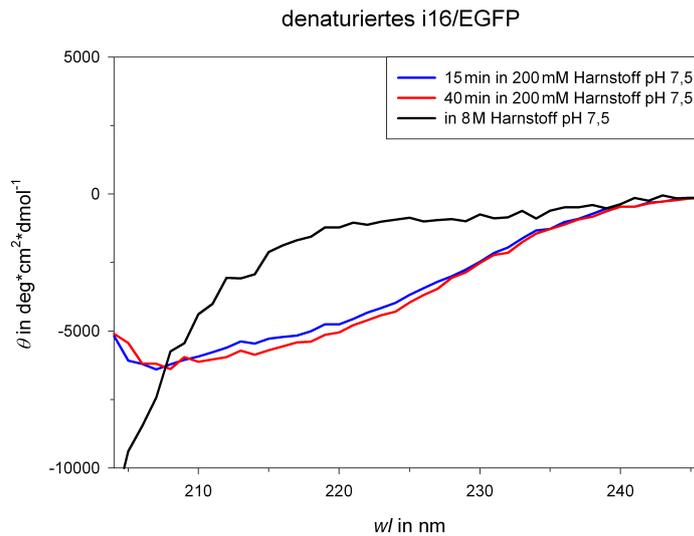


Abb. 3.20: CD-Spektren des entfalteten i16/EGFP in 8 M Harnstoff und nach Verdünnung in Importpuffer. Die Abbildung zeigt das CD-Spektrum des entfalteten i16/EGFP in 8 M Harnstoff (schwarz) und nach 15 min (blau) bzw. 40 min (rot) Inkubation in 200 mM Harnstoff. **Bedingungen:** Proben in 20 mM Phosphat pH 7,5, 0,5 M NaCl (neben den entsprechenden Harnstoffmengen); Küvette $d = 0,1$ cm; JASCO J-710 Spektralphotometer; Auswertung über JASCO Spectra manager und SIGMAPLOT.

kurz nach der Verdünnung des entfalteten i16/EGFP Sekundärstrukturen ausbilden. Um welche Sekundärstrukturen es sich handelt, ist aus den Spektren nicht eindeutig zu bestimmen. Form und Verlauf des Spektrums lassen jedoch auf β -Faltblattstrukturen schließen, die möglicherweise denen der Fassetstruktur des EGFP entsprechen. Diese Strukturbildung ändert sich in den folgenden 40 Minuten nicht mehr. Allerdings scheint sich dabei keine funktionelle Tertiärstruktur zu bilden, da selbst nach mehreren Tagen Inkubation keine Fluoreszenz nachweisbar war.

Aufgrund dieser Daten muss davon ausgegangen werden, dass es bei den entfalteten Substraten unter Importbedingungen (200 mM Harnstoff) zwar innerhalb kurzer Zeit zu Strukturbildungsprozessen kommt, diese jedoch zu keiner funktionellen Tertiärstruktur führen.

3.1.7 Vergleichende Konkurrenzexperimente gefalteter und ungefalteter Substrate

In den folgenden Experimenten sollte der Einfluss gefalteter und ungefalteter Substrate vergleichend untersucht werden. Dazu wurde zunächst der indirekte Weg über Konkurrenzversuche genutzt. Dabei wurde das radioaktiv markierte 23/23 als Referenzsubstrat *in vitro* in einem „normalen“ Import eingesetzt, allerdings in Gegenwart von nicht radioaktiv markiertem Kompetitor (16/EGFP bzw. i16/EGFP). Benutzt dieser nicht markierte Kompetitor denselben Transportweg wie das radioaktiv markierte Referenzsubstrat (z.B.

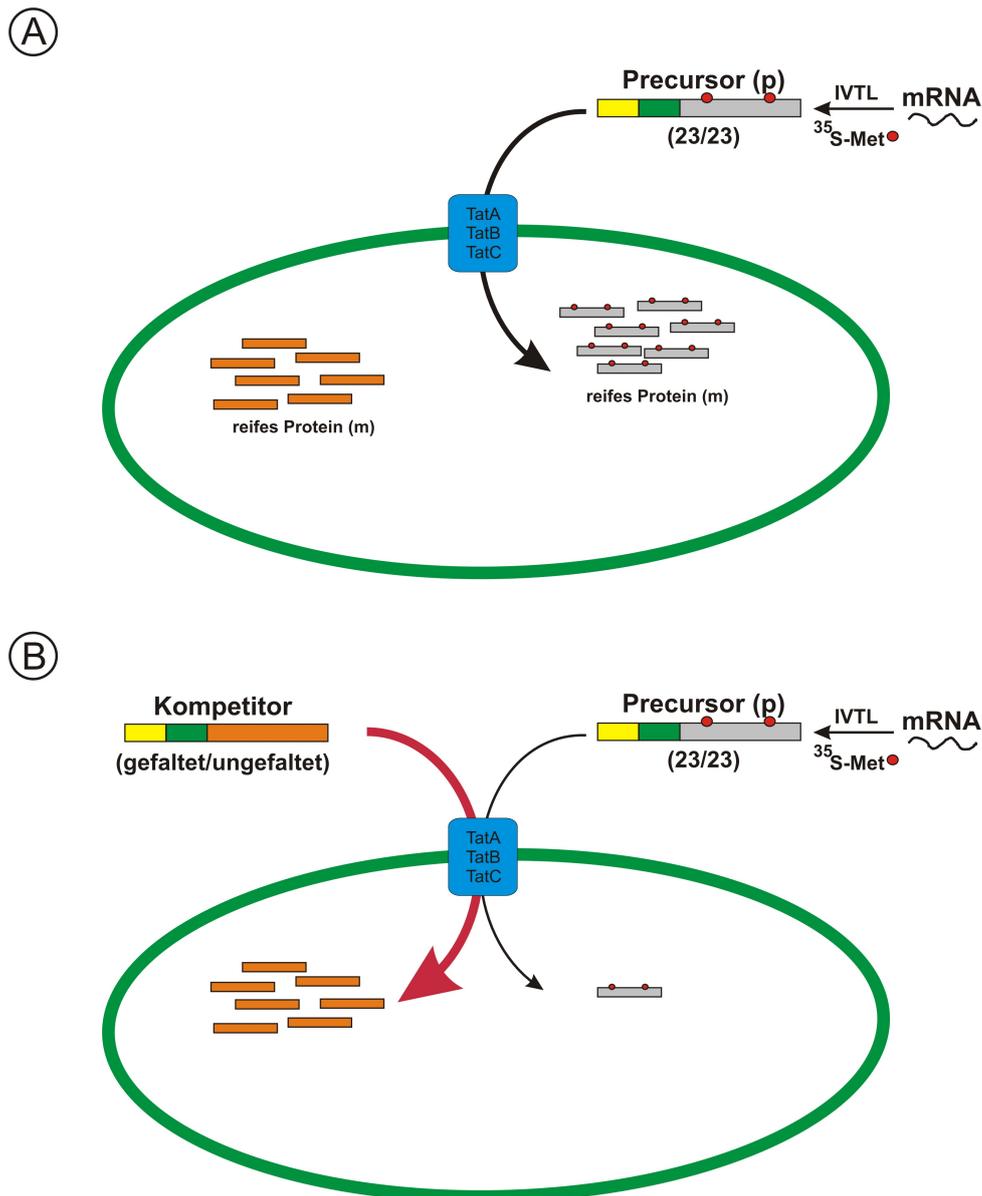


Abb. 3.21: Modell des Wettbewerbsversuchs. Die Abbildung zeigt die Wirkungsweise des Wettbewerbsversuchsansatzes. Dabei wird ein radioaktiv markiertes Referenzsubstrat (z.B. 23/23 für den Tat-Weg) in einem Importansatz eingesetzt (**A**). Zusätzlich wird ein zu testender Kompetitor verwendet, der *nicht* radioaktiv markiert ist und ebenfalls importiert wird. Sofern dieser Transport über denselben Weg erfolgt, sinkt die Menge der importierten radioaktiven Referenz mit steigender Kompetitorkonzentration (**B**).

23/23), sollte die importierte und detektierbare Menge an Referenzsubstrat mit steigender Kompetitorkonzentration abnehmen (siehe Abbildung 3.21). Diese Abnahme kann quantifiziert und die entsprechende Wettbewerbswirkung, durch Bestimmung des IC_{50} , berechnet und verglichen werden. Der IC_{50} -Wert steht dabei für die Konzentration an Kompetitor, bei der die Importeffizienz im Vergleich zum nichtkompetierten Import auf 50% gesunken ist.

3.1.7.1 16/EGFP als Kompetitor

Zunächst sollte das generelle Transportverhalten der zu untersuchenden Substrate abgeschätzt werden. Dazu wurde der Kompetitor bis zu einer Konzentration von 4 μM eingesetzt. Als *in vitro* translatierte und radioaktiv markierte Tat-Substrate wurden zum einen das 23/23 und zum anderen das 16/EGFP selbst als Kontrolle eingesetzt. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abbildung 3.22 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass das eingesetzte, gefaltete 16/EGFP bei beiden Substraten eine starke Kompetitionswirkung zeigt. Bereits bei einer Kompetitorkonzentration von 1 μM ist die Importeffizienz des 23/23 sowie die des 16/EGFP im Vergleich zum unkompetierten Import auf unter 50% gefallen. Da jedoch für eine quantitative Analyse (Bestimmung und Berechnung des IC_{50} -Wertes) möglichst viele Messpunkte in einem Bereich von 30–80% Importrate liegen sollten, mussten weitere Versuche bei deutlich geringeren Konzentrationen durchgeführt werden.

Dazu wurden Verdünnungsreihen des Kompetitors verwendet, die es ermöglichten, Kompetitionseffekte in einem Bereich von 2 μM –7,8 nM, ohne Vorverdünnen genauer zu analysieren. Zusätzlich zum gefalteten Substrat wurde nun auch das entfaltete Substrat als Kompetitor eingesetzt. Das Ergebnis eines solchen vergleichenden Experiments mit gefaltetem und entfaltetem 16/EGFP als Kompetitor ist in Abbildung 3.23 gezeigt. Dabei werden die unbehandelten und proteasebehandelten Fraktionen getrennt aufgetragen, um später eine separate Quantifizierung zu erleichtern. Bereits mit den Augen ist die Abnahme der Importrate mit steigender Kompetitorkonzentration deutlich zu erkennen. Des

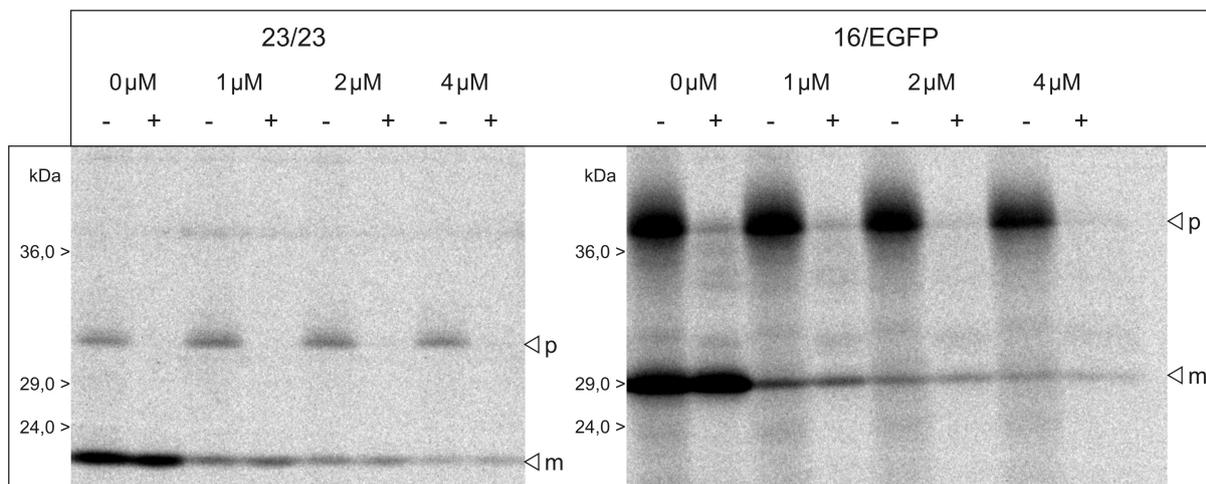
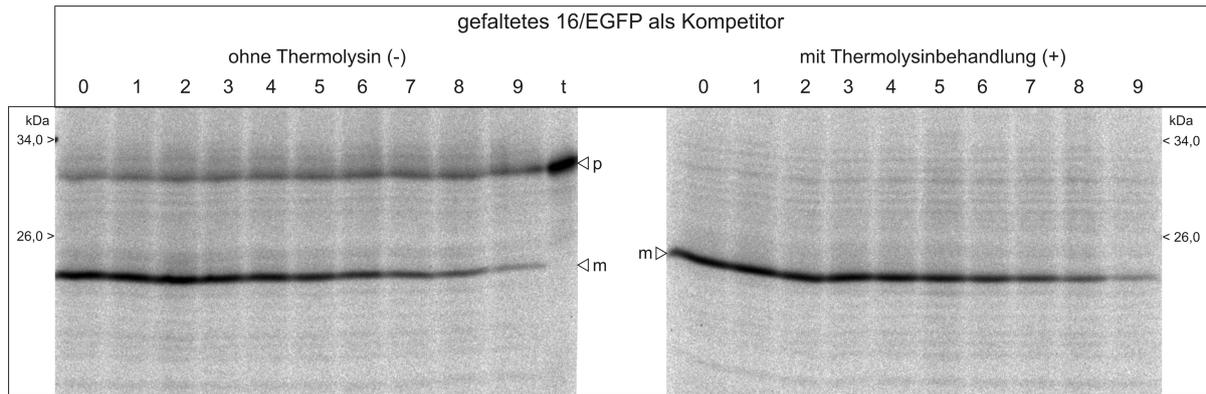


Abb. 3.22: Kompetitionen des 23/23 und 16/EGFP mit gefaltetem 16/EGFP als Kompetitor. Die Abbildung zeigt die Kompetition des Imports des *in vitro* translatierten 23/23 und 16/EGFP nach SDS-PAGE und Autoradiographie. Dabei wurde das gefaltete 16/EGFP als Kompetitor eingesetzt. Ein Teil der Thylakoide wurde nach dem Import proteasebehandelt (+) und zusammen mit den unbehandelten Fraktionen (-) separat aufgetragen. Die Vorläuferproteine sind mit (p), die importierten und prozessierten reifen Proteine mit (m) markiert. **Bedingungen:** SDS-PAGE mit 10–17,5%igem Midi-Polyacrylamidgel (20 x 20 x 0,1cm), weitere Details siehe Legende zu Abbildung 3.2 (S. 24).

3 Ergebnisse



Kompetitorkonzentrationen in μM :

1 - 0,0078	2 - 0,0156	3 - 0,03125	4 - 0,0625	
5 - 0,125	6 - 0,250	7 - 0,5	8 - 1,0	9 - 2,0

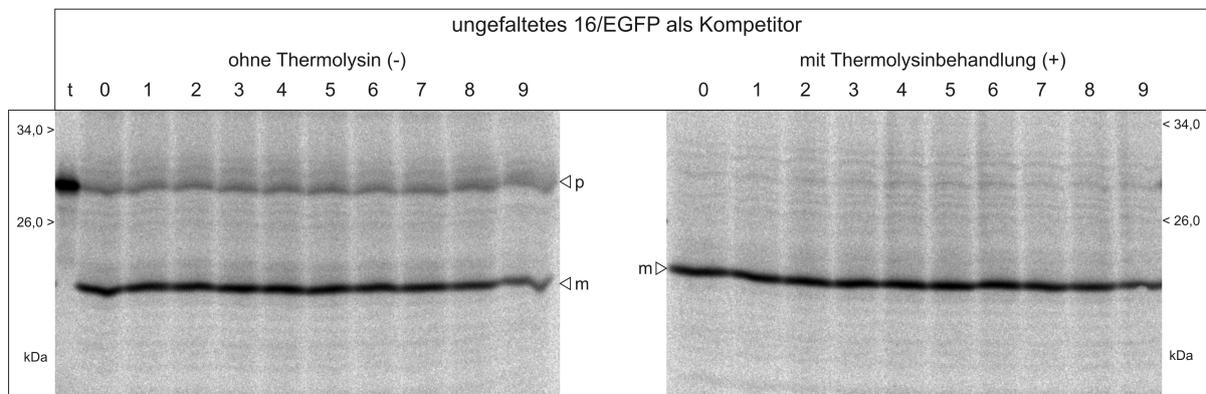


Abb. 3.23: Konkurrenz des 23/23 mit 16/EGFP. Die Abbildung zeigt die Konkurrenz des Imports des 23/23 durch das 16/EGFP, das sowohl gefaltet (**oben**) als auch ungefaltet (**unten**) als Kompetitor verwendet wurde, nach SDS-PAGE und Autoradiographie. Der Kompetitor wurde in einer Verdünnungsreihe von $2\ \mu\text{M}$ bis $7,8\ \text{nM}$ eingesetzt. Die einzelnen Fraktionen, unbehandelt (-), proteasebehandelt (+), wurden separat aufgetragen. Das Vorläuferprotein wurde mit (**p**), das importierte reife Protein mit (**m**) und die Translation mit (**t**) bezeichnet. **Bedingungen:** siehe Legende zu Abbildung 3.22; gereinigtes und gefaltetes 16/EGFP in $3\ \text{M}$ Harnstoff, $20\ \text{mM}$ Tris/HCl pH 7,5; entfaltetes Substrat in $8\ \text{M}$ Harnstoff, $20\ \text{mM}$ Tris/HCl pH 7,5; finale Harnstoffkonzentration im Importansatz $200\ \text{mM}$.

Weiteren ist zu sehen, dass das als Kompetitor eingesetzte, gefaltete 16/EGFP eine wesentlich stärkere Konkurrenzwirkung zeigt als das ungefaltete Kompetitor.

Da ein biologisches System wie der Thylakoidtransport aufgrund der komplexen Funktionsweise Schwankungen unterliegt, wurden diese Experimente sowohl für das 16/EGFP als auch für das i16/EGFP mehrfach wiederholt (mindestens $8\times$ pro Kompetitor) und jeder Import quantifiziert. Dabei wurde die nichtkompetierte Importreaktion jeweils als 100% gesetzt. Bei der Quantifizierung konnte festgestellt werden, dass die gemessenen Werte an importiertem reifen Protein in den unbehandelten Fraktionen mit denen der proteasebehandelten Fraktionen vergleichbar waren. Aus diesem Grund wurden zunächst die Daten für jede Kompetitorkonzentration aus beiden Fraktionen (- und +) gemittelt.

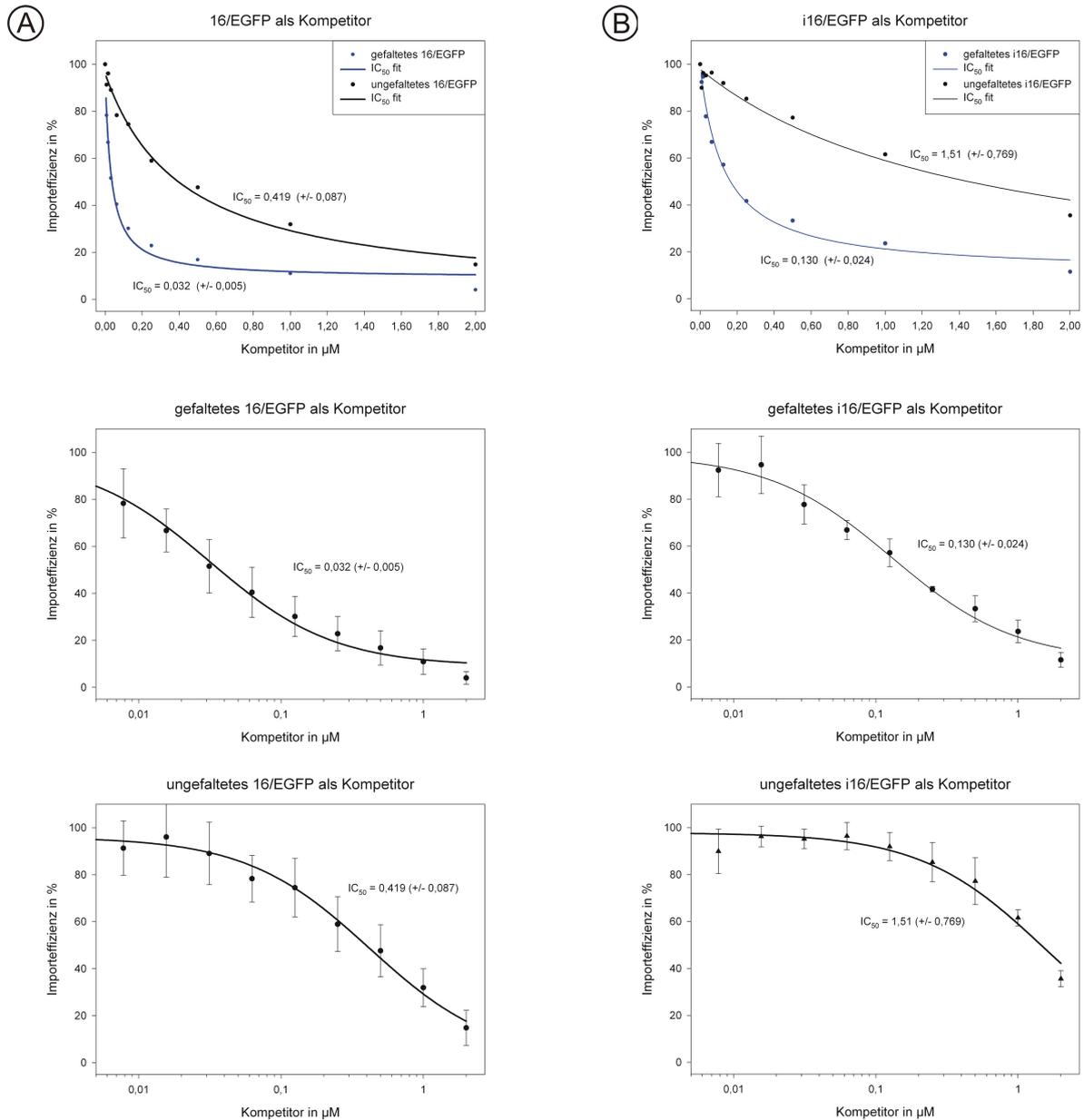


Abb. 3.24: Grafische Darstellung der Konkurrenz des 23/23 mit 16/EGFP und i16/EGFP. Gezeigt ist die grafische Auswertung der Konkurrenzexperimente nach Quantifizierung, Mittlung der Daten aller Importe und Berechnung der IC_{50} -Werte. Die Konkurrenzergebnisse sind für das 16/EGFP in (A) und für das i16/EGFP in (B) zusammengefasst. Dabei ist in den oberen Grafiken das gefaltete **blau** und ungefaltete Substrat **schwarz** dargestellt. Die darunter liegenden Grafiken zeigen die Ergebnisse getrennt nach gefaltetem und ungefaltetem Substrat, inkl. Standardabweichungen und halblogarithmischer Skalierung der x-Achse (zur besseren Darstellung der kleinen Konkretorkonzentrationen).

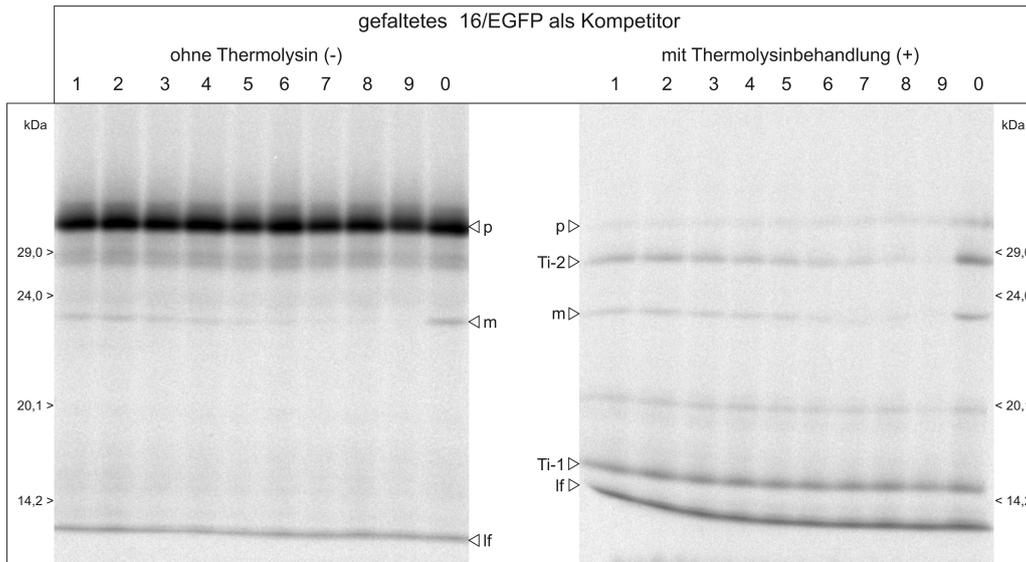
Abschließend wurden die entsprechenden Werte aller Versuche (getrennt nach Konkretorkonzentration) gemittelt und die entsprechende Standardabweichung berechnet. Die grafische Zusammenfassung der Quantifizierung und Auswertung aller Ergebnisse für das 16/EGFP ist in Abbildung 3.24 (A) dargestellt. Das gefaltete 16/EGFP kompetiert den Transport des 23/23 stärker als das ungefaltete 16/EGFP. Vergleicht man dabei den IC_{50} -Wert des gefalteten 16/EGFP (32 nM) mit dem des ungefalteten Substrats (419 nM), so

ist die Konkurrenz des gefalteten 16/EGFP ca. 13x stärker als die des ungefalteten Substrats. Betrachtet man die Transporteffizienzen bei geringen Konkurrentkonzentrationen, so ist festzustellen, dass beim ungefalteten 16/EGFP die Importrate des 23/23 zunächst ansteigt und erst mit steigender Konkurrentkonzentration abfällt. Dieser Anstieg ist statistisch zwar nicht signifikant, könnte jedoch auf eine Aktivierung der Translokase bei geringen Substratkonzentrationen hinweisen (Alder & Theg, 2003).

3.1.7.2 i16/EGFP als Konkurrent

Analog zum vollständigen Vorläuferprotein 16/EGFP wurden solche Analysen auch mit dem i16/EGFP als Konkurrent durchgeführt. Dabei wurden die gleichen Bedingungen und Konzentrationen gewählt und auch die Auswertung auf die gleiche Weise durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.23 (B) gezeigt. Das Intermediat i16/EGFP zeigt dabei ein ähnliches Verhalten wie das vollständige Vorläuferprotein 16/EGFP. Das gefaltete Intermediat kompetiert den Transport des 23/23 stärker ($IC_{50} = 0,130 \mu\text{M}$) als das ungefaltete i16/EGFP ($IC_{50} = 1,51 \mu\text{M}$). Mit einem Faktor von 12 ist der Unterschied in der Konkurrenzwirkung wiederum vergleichbar (Faktor beim 16/EGFP: 13). Auch die mögliche leichte Aktivierung bei geringen Konkurrentkonzentrationen ist erkennbar, wenn auch wiederum nicht signifikant. Vergleicht man jedoch die IC_{50} -Werte von 16/EGFP und i16/EGFP, so sind die IC_{50} -Werte des Intermediats i16/EGFP 4x höher als die des Vorläufers 16/EGFP. Dies bedeutet, dass man überraschenderweise die 4fache Konzentration an i16/EGFP benötigt, um die gleiche Konkurrenzwirkung zu erreichen wie mit dem 16/EGFP.

Die Konkurrenzergebnisse der EGFP-Chimären lassen sich wie folgt zusammenfassen. Sowohl das gefaltete 16/EGFP als auch das gefaltete Intermediat i16/EGFP kompetieren den Transport des 23/23 stärker als die ungefalteten Formen (11–13x stärker). Vergleicht man die IC_{50} -Werte des 16/EGFP ($0,032 \mu\text{M}/0,419 \mu\text{M}$) und die des i16/EGFP ($0,130 \mu\text{M}/1,51 \mu\text{M}$) direkt miteinander, so ist zu erkennen, dass das 16/EGFP, unabhängig vom Faltungszustand, eine 4x höhere Konkurrenzwirkung zeigt als das i16/EGFP. Dies deutet darauf hin, dass der stromadirektierende Teil des Transitpeptids (STD) einen Einfluss auf den Thylakoidtransport besitzt. Beide Substrate bewirken, vor allem in ihrer ungefalteten Form, bei sehr geringen Konzentrationen (10–30 nM) eine Steigerung der Importeffizienz. Diese Aktivierung ist statistisch nicht signifikant, aber reproduzierbar und bestätigt Aktivierungseffekte, wie sie in der Literatur für transportinkompatible Substrate beschrieben sind (Alder & Theg, 2003).



Kompetitorkonzentrationen in μM :

0 - ohne Kompetitor	1 - 0,0078	2 - 0,0156	3 - 0,03125	4 - 0,0625
5 - 0,125	6 - 0,250	7 - 0,5	8 - 1,0	9 - 2,0

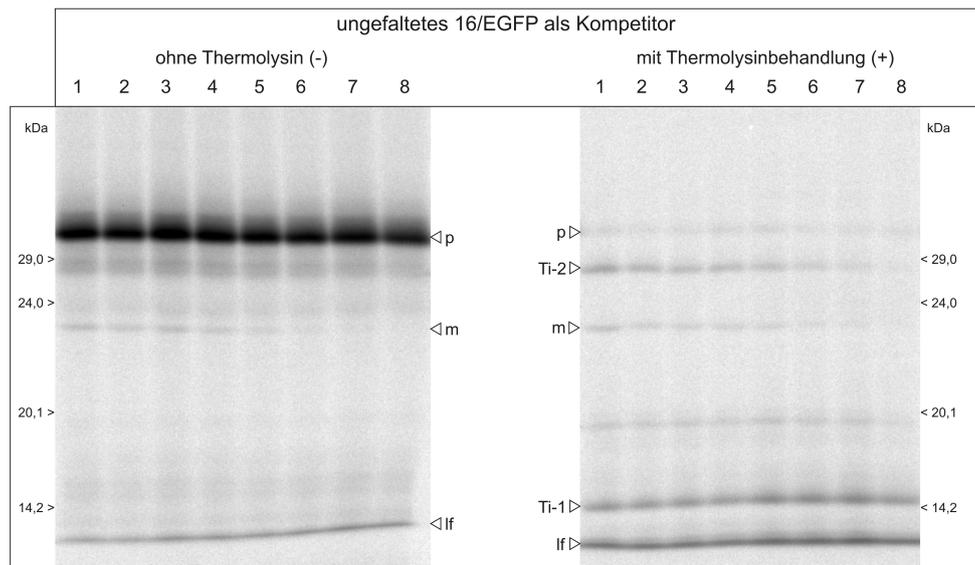


Abb. 3.26: Konkurrenz des 16/23 mit 16/EGFP (gefaltet und ungefaltet). Die Abbildung zeigt die Konkurrenz des Imports des 16/23 durch das 16/EGFP, das sowohl gefaltet (**oben**) als auch ungefaltet (**unten**) als Kompetitor verwendet wurde, nach SDS-PAGE und Autoradiographie. Das Vorläuferprotein wurde mit (**p**), das importierte reife Protein mit (**m**), das Translokationsintermediat 1 mit (**Ti-1**), das Translokationsintermediat 2 mit (**Ti-2**) und die Lauffront mit (**If**) bezeichnet. Die einzelnen Fraktionen, unbehandelt (-), proteasebehandelt (+), wurden separat aufgetragen.

In Abbildung 3.26 ist das Ergebnis der Konkurrenz des 16/23 mit dem 16/EGFP (gefaltet und ungefaltet) als Kompetitor nach SDS-PAGE und Autoradiographie dargestellt. Bei Betrachtung des Autoradiogramms fällt auf, dass das Ti-1 zwar größeren Schwankungen unterliegt, jedoch nicht von der Konkurrenz betroffen ist. Im Gegensatz dazu zeigen das Ti-2 und das reife Protein eine deutliche Abnahme in Gegenwart des Kompetitors. Die gra-

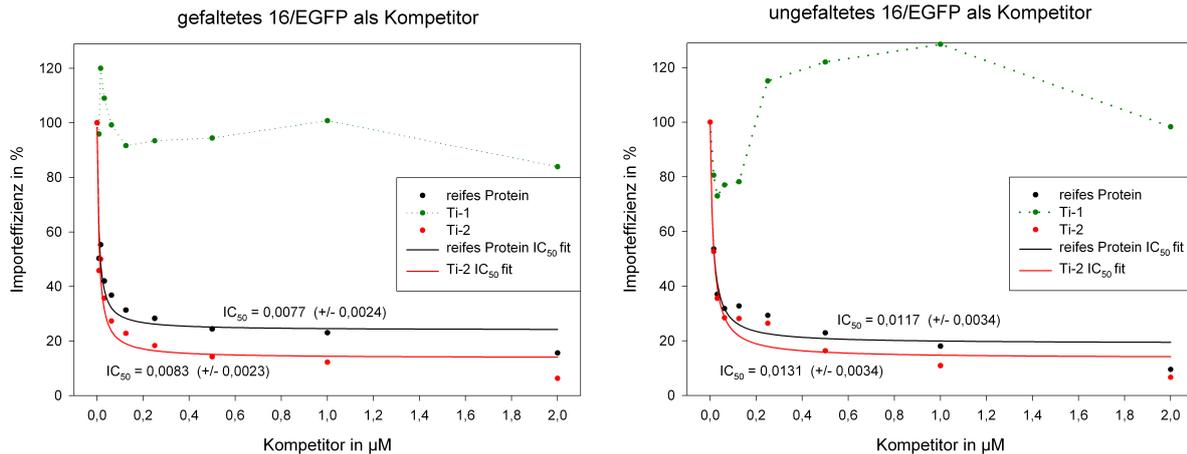


Abb. 3.27: Grafische Darstellung der Konkurrenz des 16/23 mit 16/EGFP. Gezeigt ist die grafische Darstellung der Ergebnisse aus Abbildung 3.26 nach Quantifizierung. Dabei ist die Konkurrenz des 16/23 mit dem gefalteten 16/EGFP (**links**) und mit dem ungefalteten i16/EGFP (**rechts**) dargestellt (IC_{50} -Werte in μM).

fische Darstellung nach erfolgter Quantifizierung des Autoradiogramms (siehe Abbildung 3.27) bestätigt diesen ersten Eindruck. Sowohl das Ti-2 als auch das reife 23kDa-Protein werden durch das gefaltete und das ungefaltete 16/EGFP kompetiert. Wie schon bei der Konkurrenz des 23/23 ist dabei die Wirkung des gefalteten Substrats stärker als die des ungefalteten Substrats, allerdings in einem weitaus geringerem Ausmaß (Faktor 2). Das Ti-1 ist weitestgehend unabhängig von der Konkretorkonzentration, obwohl im Fall des ungefalteten 16/EGFP bei höheren Konzentrationen stärkere Schwankungen bei der Quantifizierung auftraten.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass sowohl das gefaltete als auch das ungefaltete EGFP-Substrat nicht die initiale Insertion bzw. Interaktion mit der Membran (Ti-1), sondern den Translokationsschritt (Ti-2) beeinflussen. Ob dies allerdings die Bindung an den TatBC-Komplex, den eigentlichen Membrantransport oder das Entlassen des Substrats aus dem Komplex betrifft, ist aus diesen Daten nicht ableitbar. Es kann nur geschlussfolgert werden, dass es einen Schritt während der Translokation beeinflusst, der geschwindigkeitsbestimmend und über das Ti-2 identifizierbar ist. Betrachtet man die IC_{50} -Werte, so fällt auf, dass diese beim gefalteten 16/EGFP mit 7,7 nM (reifes Protein) und 8,3 nM (Ti-2) zwar sehr ähnlich, jedoch im Vergleich zur Konkurrenz des 23/23 sehr klein sind. Dies ist beim Einsatz des ungefalteten Substrats ähnlich, wenn auch mit etwas höheren IC_{50} -Werten (11,7 nM für das reife Protein und 13,1 nM für das Ti-2). Vergleicht man also die Konkurrenzwirkung des 16/EGFP auf das 16/23 mit der Konkurrenzwirkung auf das 23/23, so ist diese für das gefaltete Substrat 4x stärker und für das entfaltete 20x stärker. Eine mögliche Ursache für die stärkere Konkurrenzwirkung beim 16/23 könnte einerseits das identische Transitpeptid (16/EGFP) bzw. Signalpeptid (i16/EGFP)

sein. Andererseits wäre denkbar, dass das 16/23 eine verringerte Affinität zur Translokase besitzt und dementsprechend geringere Konkurrentkonzentrationen ausreichen.

3.1.8 *In vitro* Import rückgefalteter EGFP-Substrate

Aus den vorliegenden Konkurrenzsergebnissen konnte nicht abgeleitet werden, ob der eingesetzte Konkurrent tatsächlich transportiert wurde und dadurch den Konkurrenzseffekt erzeugt oder ob er die Translokation durch alleinige Bindung an den Rezeptor (denkbar bei ungefalteten bzw. falsch gefalteten Substraten) blockiert. Aus diesem Grund wurde in folgenden Experimenten versucht, die gereinigten Substrate selbst *in vitro* zu importieren.

Für diesen Versuch wurde das unmarkierte gereinigte 16/EGFP als Transportsubstrat eingesetzt und mittels Western-Analyse detektiert. Die Wahl fiel auf das 16/EGFP, da es die stärkere Konkurrenzwirkung zeigte. Aufgrund der hohen Stabilität des gefalteten EGFP gegenüber dem bisher eingesetzten Thermolysins musste als Protease, zur Degradation des nicht importierten Substrats, Pepsin bei einem pH von 4,5 verwendet werden. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 3.28 dargestellt. Die Western-Entwicklung zeigt zunächst wie resistent das gefaltete EGFP gegen den Abbau durch Thermolysin

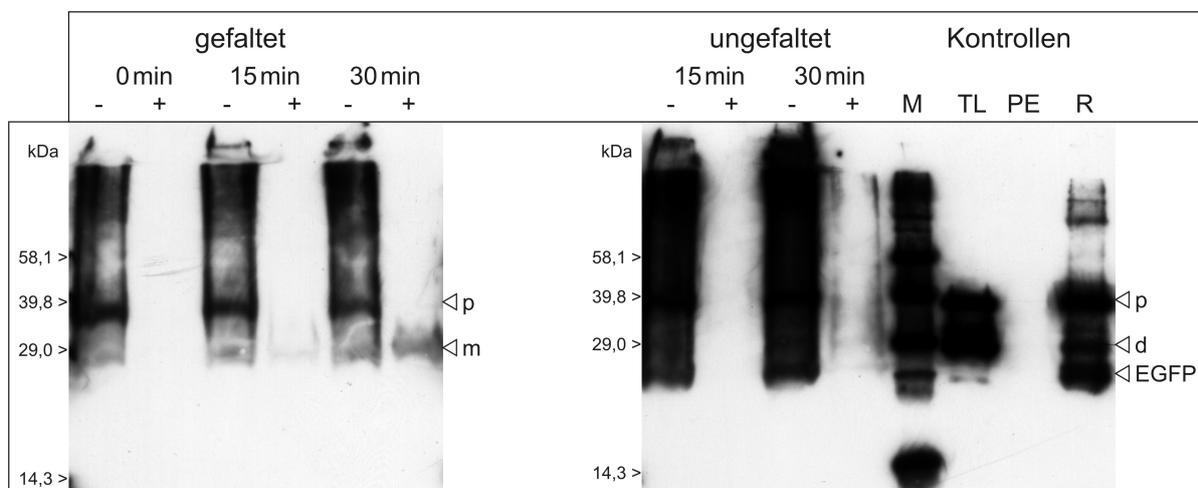


Abb. 3.28: *In vitro* Import des überexprimierten und gereinigten 16/EGFP. Gezeigt ist der Import des gereinigten 16/EGFP (gefaltet und ungefaltet) in isolierte Erbsenthylakoide. Dabei wurden 45 μ l Thylakoide (1 mg Chlorophyll/ml) mit 2 μ g 16/EGFP versetzt und jeweils 0–30 min im Licht inkubiert. Nach dem Import wurden die Ansätze mit HM-Puffer gewaschen, ein Teil der Thylakoide wurde mit Pepsin (200 ng/ μ l, in 20 mM Citrat, pH 4,5) behandelt (+) und nach erneutem Waschen zusammen mit den unbehandelten Thylakoiden (-) in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen, 5 min bei 95°C denaturiert und einer SDS-PAGE (15% PAA, HOEFER-Minigel) unterzogen. Das Gel wurde auf eine PVDF-Membran geblotet (SemiDry-Blot) und der Blot mit α EGFP-Antikörpern entwickelt (ECL-Entwicklung). Als Kontrollen wurden je 1 μ g 16/EGFP 20 min bei 0°C mit Thermolysin (TL) bzw. Pepsin (PE) verdaut und zusammen mit 1 μ g unbehandelten 16/EGFP als Referenz (R) aufgetragen. Das 16/EGFP-Vorläuferprotein ist mit (p) das importierte prozessierte Produkt mit (m) und Degradationsprodukte mit (d) markiert. **Bedingungen:** Pepsinstammlösung 2 mg/ml (in 1xPBS); Western-Blot und ECL-Entwicklung, siehe Abbildung 3.7 (S. 30).

(TL) ist, da das Vorläuferprotein bis zu einer Größe von ca. 29 kDa abgebaut wird. Im Gegensatz dazu ist nach Pepsinbehandlung (PE) derselben Menge 16/EGFP kein Signal mehr detektierbar. Aufgrund der hohen Sensitivität der ECL-Detektion sind die nach wie vor in geringen Mengen vorhandenen Verunreinigungen des 16/EGFP-Substrats durch Degradationsprodukte bis hin zum reinen EGFP deutlich zu erkennen (R). Der dadurch entstehende Eindruck, dass das eingesetzte Substrat unsauber ist, täuscht, da die aufgetragene Menge an 16/EGFP (1 µg) die Detektionsgrenze der ECL-Entwicklung um das 100–500fache übersteigt. Die Importergebnisse selbst zeigen, dass im Fall des gefalteten 16/EGFP mit steigender Importzeit, ein proteasestabiles Signal in der „+“-Fraktion bei ca. 29 kDa zu erkennen ist, bei dem es sich wahrscheinlich um prozessiertes reifes EGFP handelt. Aufgrund der hohen Konzentration an eingesetztem 16/EGFP und der damit verbundenen Überladungseffekte in der „-“-Fraktion, ist in dieser Fraktion ein entsprechendes Signal nur schwach zu erkennen. Im Fall des ungefalteten 16/EGFP ist in der „+“-Fraktion selbst nach 30 min kein Signal erkennbar. Dies deutet darauf hin, dass das gefaltete 16/EGFP tatsächlich in die Thylakoide transportiert wird, das ungefaltete unter den gewählten Bedingungen jedoch nicht oder nicht mit ausreichender Effizienz. Es kann aus diesen Experimenten allerdings keine Aussage darüber getroffen werden, ob das ungefaltete Substrat überhaupt nicht transportiert wurde oder ob aufgrund der geringeren Menge an importiertem Protein, die Detektionsgrenze der ECL-Entwicklung unterschritten wurde und aus diesem Grund kein Signal zu erkennen ist.

Die Ergebnisse geben dennoch deutliche Hinweise darauf, dass gefaltetes 16/EGFP *in vitro* in isolierte Erbsenthylakoide transportiert wird, ungefaltetes 16/EGFP unter diesen experimentellen Bedingungen entsprechend nicht bzw. in nicht detektierbaren Mengen. Daraus kann gefolgert werden, dass die beobachtete Kompetitionswirkung des gefalteten Substrats auf einen effektiven Transport des Kompetitors zurückgeht und nicht nur auf eine Bindung bzw. Blockade der Translokase.

3.1.9 Verhalten des i16/EGFP bei Interaktion mit

Lipid-Monoschichten und hydrophoben Grenzflächen

Wie in Abschnitt 3.1.5.2 (S. 43) gezeigt, besitzen sowohl das Transitpeptid (16/EGFP) als auch das Signalpeptid (i16/EGFP) in wässriger Lösung keine Sekundärstruktur. Deshalb sollte untersucht werden wie sich die EGFP-Substrate in hydrophoben Umgebungen verhalten. Dazu wurden in Kooperation mit Andreas Kerth, Annette Meister und Tina Weber (AG Alfred Blume, Physikalische Chemie, MLU Halle) Interaktionsstudien der EGFP-Substrate an Lipidmonoschichten und hydrophoben Grenzflächen (z.B. Luft/Wasser-Grenzfläche) mittels Filmwaage-Messungen und IRRAS (Externe Infrarot-

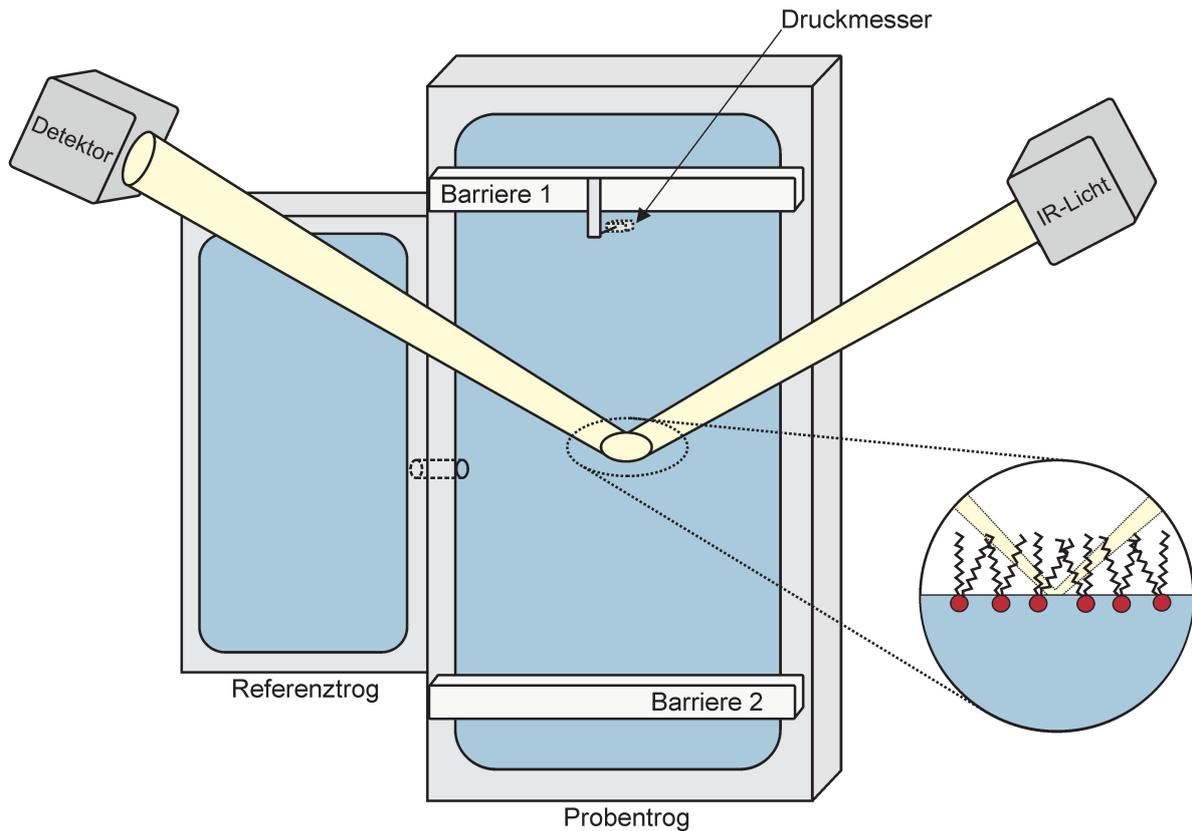


Abb. 3.29: Schematische Darstellung der IRRAS-/Filmwaageapparatur.

Reflexions-Absorptions-Spektroskopie) durchgeführt. Details dieser Experimente können in [Weber \(2007\)](#) nachgelesen werden. Abbildung 3.29 zeigt die dabei verwendete Apparatur. Dieses Gerät stellt eine Kombination aus Filmwaage und IRRAS dar. Sie besteht aus zwei Trögen, die beide aus Teflon bestehen. Jeder Trög kann mit einer wässrigen Lösung befüllt werden (hochreines Wasser oder Puffer). Eine Brücke zwischen beiden Gefäßen sorgt für einen identischen Füllstand. Nun kann die Flüssigkeit des Messtrog mit einer Monolipidschicht überschichtet werden. Der Messtrog besitzt zusätzlich verschiebbare Barrieren. In Kombination mit einer Filmwaage, die den Druck der Lipidschicht misst, können Messungen mit variabler Oberfläche bzw. variablen Oberflächendruck durchgeführt werden. Dabei kann mit Hilfe der Barrieren die Oberfläche der Lipidschicht verkleinert oder vergrößert werden, um z.B. einen angestrebten Oberflächendruck konstant zu halten. Zusätzlich zu diesen Möglichkeiten können Strukturinformationen durch Externe Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS) erhalten werden. Dazu wird Infrarotlicht in einem bestimmten Winkel auf die Grenzfläche eingestrahlt. Der zu messende Effekt basiert dabei auf der Anregung und Detektion von Molekülschwingungen. Wird eine Substanz (z.B. ein Protein) mit IR-Licht bestrahlt, absorbiert es diejenigen Wellenlängen des IR-Spektrums, die in der Lage sind, Schwingungsübergänge im Molekül anzuregen. Das resultierende, vom Detektor gemessene, Absorptionsspektrum ist für die chemische

Struktur des untersuchten Moleküls spezifisch. Selbst kleine Änderungen in den Bindungsverhältnissen oder Konformationsänderungen des Moleküls wirken sich auf die Schwingungsfrequenz aus und verändern damit die Wellenlänge des absorbierten Lichtes. Als Beispiel für proteinspezifische Signale ist neben der charakteristischen Amid-I-Bande ($1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$), deren Ursache im wesentlichen die C=O Streckschwingung ist, die Amid-II-Bande ($1550\text{--}1510\text{ cm}^{-1}$) zu nennen, die durch NH-Biege- und CN-Streckschwingungen erzeugt wird. Mit Hilfe des Amid-I- und Amid-II-Bandenmusters, lassen sich Aussagen über die Sekundärstruktur des Proteins an der Grenzfläche treffen (Kerth, 2003).

3.1.9.1 Filmwaage-Messungen von i16/EGFP und EGFP

Mit der Filmwaage kann die Insertion von Proteinen in Lipidmonoschichten gemessen werden. Insertiert ein Protein in eine Lipidmonoschicht, so erhöht sich bei konstanter Fläche der gemessene Oberflächendruck. Die Barrieren können computergesteuert verschoben werden und sind so in der Lage, den steigenden Oberflächendruck durch Vergrößerung der Oberfläche wieder zu verringern. Denn insertiert das Protein in die Membran, erhöht sich der Oberflächendruck, das System vergrößert die Fläche, indem die Barrieren auseinander gefahren werden und der Druck wird im Vergleich zum Anfangsdruck konstant gehalten. Diese Flächenänderung kann dann grafisch dargestellt werden. Abbildung 3.30 zeigt modellhaft die Funktion der Filmwaage mit ihren variablen Barrieren und den Einfluss auf die Monolipidschicht bei Änderung des Oberflächendrucks.

Im folgenden Abschnitt soll das Ergebnis der Insertionsversuche des i16/EGFP in Monolipidschichten erläutert werden. Die dabei verwendete Monolipidschicht ist in ihrer Zusammensetzung der Thylakoidmembran aus Spinat (Kates, 1990) nachempfunden. Als Substrat wurde das i16/EGFP verwendet, da es dem Stromaintermediat entspricht und damit der Form, wie sie natürlicherweise auf die Thylakoidmembran trifft. Als Kontrolle

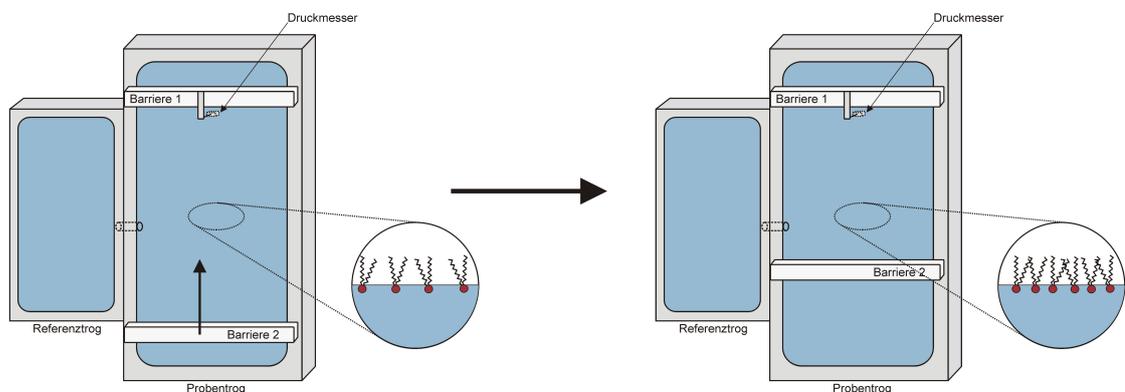


Abb. 3.30: Schematische Darstellung der Funktion der Filmwaage. Durch die Verschiebbarkeit der Barrieren kann die Monolipidschicht komprimiert oder expandiert werden, wodurch der Flächenbedarf des einzelnen Lipidmoleküls verkleinert oder vergrößert wird.

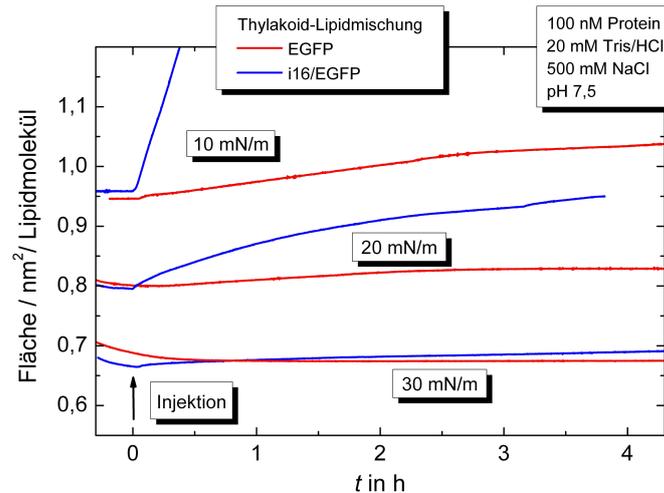


Abb. 3.31: Insertionsexperimente des i16/EGFP und EGFP in thylakoidähnliche Monolipidschichten. Die Abbildung zeigt die Flächenänderung je Lipidmolekül in Abhängigkeit von der Zeit der Adsorption des i16/EGFP und EGFP in Monolipidschichten. Die Zusammensetzung der Monolipidschicht entspricht annähernd der Thylakoidmembran aus Spinat (55% MGDG, 27% DGDG, 7% SQDG, 11% PG; nach Kates (1990)). Das i16/EGFP ist **blau**, die Kontrolle EGFP **rot** dargestellt. **Bedingungen:** Druck: 10 mN/m, 20 mN/m und 30 mN/m; Puffer: 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 500 mM NaCl; Proteinkonzentration: 100 nM.

wurde das EGFP (ohne Transit-/Signalpeptid) verwendet. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abbildung 3.31 dargestellt. Bei 30 mN/m (dies entspricht dem angenommenen Druck von Membranen) erkennt man weder für das i16/EGFP noch für das EGFP eine Insertion. Bei 20 mN/m zeigt das i16/EGFP im Gegensatz zum EGFP eine deutliche Insertion und damit verbundene Lipidflächenvergrößerung. Bei 10 mN/m steigert sich das Insertionsverhalten des i16/EGFP nochmals, wobei nun auch des EGFP eine leichte Interaktion mit der Monolipidschicht zeigt.

3.1.9.2 IRRAS Untersuchungen des i16/EGFP und EGFP

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das i16/EGFP, wie erwartet, in die Monolipidschichten insertiert, sollte nun mittels IRRAS-Messungen untersucht werden, inwiefern es bei der Interaktion des i16/EGFP mit hydrophoben Grenzflächen zu Strukturänderungen kommt. Dazu wurden IRRAS-Messungen an der Luft/Wasser-Grenzfläche sowie an thylakoidähnlichen Monolipidschichten durchgeführt. Interagiert das Protein mit der entsprechenden Grenzfläche, so ist dessen Struktur anhand der spezifischen IR-Absorption (Änderung des Amid-I- und Amid-II-Bandenmusters) messbar. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abbildung 3.32 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass das i16/EGFP bei der Interaktion mit der thylakoidähnlichen Monolipidschicht β -Faltblatt-typische Änderungen des Amidbandenmusters verursacht. Dies bedeutet, dass das i16/EGFP mit der Mono-

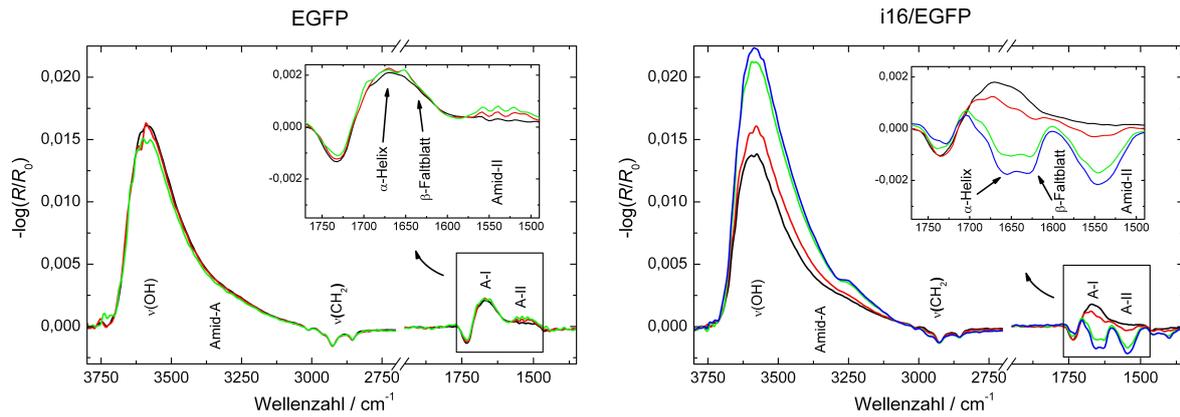


Abb. 3.32: IRRAS-Messungen des i16/EGFP nach Interaktion mit Thylakoidmonolipidschichten. Die Abbildung zeigt die IRRAS-Spektren der Adsorption des EGFP (**links**) und i16/EGFP (**rechts**) an Thylakoidmonolipidschichten. **Bedingungen:** Zeiten: 0 h (**schwarz**), 2,5 h (**rot**), 5 h (**grün**) und 7,5 h (**blau**) (nur i16/EGFP); Druck: 20 mN/m; Puffer: 20 mM Tris/HCl pH 8, 500 mM NaCl; Proteinkonzentration: 100 nM.

lipidschicht interagiert und β -Faltblatt-typische Änderungen, aufgrund des hohen Anteils an β -Faltblattstrukturen im EGFP, detektierbar sind. Neben dieser Änderung ist noch eine weitere in dem Bereich der Amid-I-Bande zu sehen, die typisch für α -helikale Strukturen ist. Anhand dieser Banden kann gefolgert werden, dass es bei der Interaktion des i16/EGFP mit thylakoidähnlichen Monolipidschichten zur Ausbildung α -helikaler Sekundärstrukturen kommt. Diese sind vermutlich auf das Signalpeptid zurückzuführen, wenn dieses auf die hydrophobe Lipidschicht trifft. Das EGFP (ohne Signalpeptid) zeigt keine Interaktion mit der Monolipidschicht und damit verbunden keine Änderung des Amidbandenmusters.

Zur Absicherung dieses Ergebnisses musste nun ausgeschlossen werden, dass die α -helikale Struktur auf den EGFP-Teil des i16/EGFP zurückgeht. Da das EGFP alleine jedoch nicht mit der Lipidschicht interagiert, musste ein Ansatz gewählt werden, in dem auch das EGFP an einer Grenzfläche mittels IRRAS gemessen werden konnte. Dazu wurden Messungen an der Luft/Wasser-Grenzfläche durchgeführt, da nahezu jedes Protein mit dieser Art der Grenzfläche interagiert. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 3.33 gezeigt. Zum Vergleich wurde die Messung des i16/EGFP an Thylakoidmonolipidschichten wiederholt. Bei der Auswertung dieses Versuchs wurden die einzelnen Amidbanden auf die β -Faltblattbande normiert. Es ist zu erkennen, dass im Fall der Luft/Wasser-Grenzfläche auch das EGFP eine deutliche Bande im Bereich der β -Faltblattbande zeigt, jedoch keine zusätzliche Bande, die auf α -helikale Strukturanteile schließen lässt. Das i16/EGFP dagegen erzeugt wieder eine zusätzliche Bande im Bereich der α -Helixbande. Der direkte Vergleich mit der thylakoidähnlichen Monolipidschicht zeigt, dass sich diese α -Helixbande verstärkt, wenn das i16/EGFP mit dieser Grenzschicht interagiert.

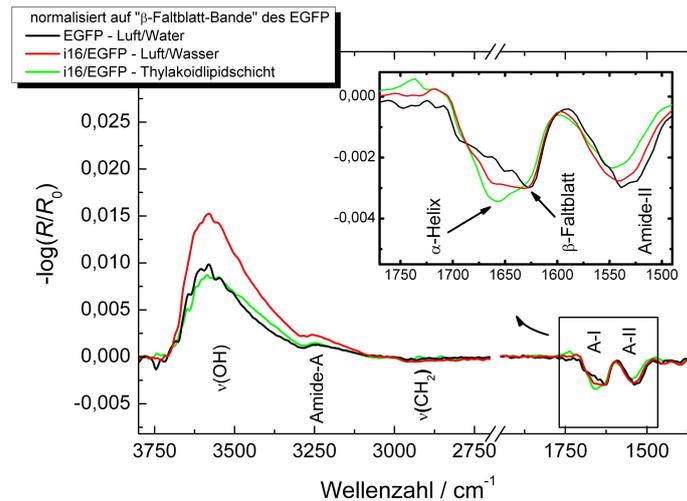


Abb. 3.33: IRRA-Spektren des i16/EGFP und EGFP nach Interaktion mit der Luft/Wasser-Grenzfläche und Thylakoidmonolipidschichten. Die Abbildung zeigt vergleichend die IRRAS-Messungen des i16/EGFP und EGFP an der Luft/Wasser-Grenzfläche und des i16/EGFP an Thylakoidmonolipidschichten. Die Amidbanden wurden auf die der β -Faltblattbande normiert. **Bedingungen:** Zeit: 5 h; Druck: 20 mN/m; Puffer: 20 mM Tris/HCl pH 8, 500 mM NaCl; Proteinkonzentration: 100 nM.

Die in diesem Abschnitt gezeigten Ergebnisse, lassen sich wie folgt zusammenfassen. An der Luft/Wasser-Grenzfläche zeigt sowohl das EGFP als auch das i16/EGFP ein für β -Faltblatt-Strukturen typisches Amid-Bandenmuster. Zusätzlich zeigt das i16/EGFP eine Änderung der Amid-I-Bande, die auf α -helikale Sekundärstrukturen schließen lässt. Mit thylakoidähnlichen Monolipidschichten interagiert, im Gegensatz dazu, nur das i16/EGFP. Das EGFP, ohne Signalpeptid, zeigt keine Interaktion mit dieser Grenzfläche. Die α -helikale Bande des i16/EGFP, die an der Luft/Wasser-Grenzfläche bereits zu messen war, verstärkt sich bei der Verwendung thylakoidähnlicher Monolipidschichten. Daraus kann geschlossen werden, dass die Ausbildung α -helikaler Sekundärstrukturen vermutlich auf das Signalpeptid zurückzuführen ist, wenn dieses mit hydrophoben Umgebungen interagiert. Dieser Effekt ist in thylakoidähnlicher Umgebung wahrscheinlich stärker als an der Luft/Wasser-Grenzfläche.

3.2 Die Thylakoidprozessierungspeptidase (TPP) und deren Homologe

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, beschäftigt sich der zweite Teil dieser Arbeit mit der Thylakoidprozessierungspeptidase (TPP). Diese Prozessierungspeptidase entfernt die thylakoiddirigierende Domäne (TTD) kerncodierter, thylakoidlokalisierter Proteine, nach deren Transport in die Thylakoide und bildet so das reife funktionelle Protein (Hageman et al., 1986). Thylakoidlumenproteine, deren Prozessierung durch die TPP gezeigt werden konnte, sind u.a. das Plastocyanin sowie die 16 kDa-, 23 kDa- und 33 kDa-Untereinheit des Wasserspaltungsapparates des Photosystems II (James et al., 1989). Die TPP gehört zur Klasse der Typ I-Signalpeptidasen (Dalbey & Heijne, 1992), ist an der lumenalen Seite der Thylakoidmembran aktiv und konnte bereits aus Erbsenthylakoiden angereichert werden (Kirwin et al., 1987, 1988). Ziel dieses Teils der Arbeit sollte sein, die einzelnen Homologen aus *Arabidopsis thaliana* bezüglich ihrer Lokalisierung und Funktion, näher zu charakterisieren.

3.2.1 *In silico* Analysen der TPP-Homologen

Für *Arabidopsis thaliana* ist bisher eine TPP in der Literatur beschrieben (Chaal et al., 1998). Erste Datenbankanalysen ergaben allerdings zwei zusätzliche TPP-Homologe in *Arabidopsis thaliana*, wovon eine (später als TPP3 bezeichnet) bei Proteomanalysen in Chloroplasten nachgewiesen wurde (Kleffmann et al., 2004). Die einzelnen Homologen, einschließlich der Leaderpeptidase aus *E.coli* sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Basis

Tab. 3.2: TPP-homologe Signalpeptidasen. Auflistung der TPP-Homologen in *Arabidopsis thaliana*, *Synechocystis sp.* und *E.coli*. Angegeben sind neben den einzelnen Namen die Anzahl der Aminosäurereste (**Länge**), die Genbezeichnungen (**Gen**), die SwissProt Zugriffsnummern (**SwissProt**) und die NCBI-GenID (**NCBI**).

	Organismus	Länge	Gen	SwissProt	NCBI
TPP1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	340	At2g30440	O04348	817595
TPP2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	367	At1g06870	Q9M9Z2	837198
TPP3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	291	At3g24590	Q8H0W1	822055
LepB1	<i>Synechocystis sp.</i> P6803	196	sll0716	P72660	953147
LepB2	<i>Synechocystis sp.</i> P6803	218	slr1377	P73157	953804
Lep	<i>Escherichia coli</i>	324	b2568	P00803	947040

TPP2	76,82%				
TPP3	56,57%	52,86%			
LepB1	39,12%	37,33%	45,77%		
LepB2	36,34%	31,67%	42,58%	61,99%	
Lep	34,12%	34,06%	36,31%	34,25%	32,75%
	TPP1	TPP2	TPP3	LepB1	LepB2

Abb. 3.36: Übersicht der Proteinsequenzvergleiche (Alignments) mittels ClustalW. Die Abbildung zeigt die unterschiedlichen Proteinalignments der einzelnen TPP-Homologen untereinander (TPP1,2 und 3 aus *Arabidopsis thaliana*, LepB1 und LepB2 aus *Synechocystis sp.* und Lep aus *E.coli*). Für die entsprechenden prozentualen Angaben wurden gleiche und stark ähnliche Aminosäuren zusammengefasst.

fällt auf, dass die TPP3 eine höhere Homologie zu diesen aufweist als TPP1 und TPP2. Dieses Ergebnis ist umso interessanter, da die TPP1 bisher in der Literatur als die entsprechende *Arabidopsis*-TPP beschrieben wurde (Chaal et al., 1998). Unabhängig davon zeigen die *Synechocystis*-Varianten, aufgrund ihrer näheren Verwandtschaft zu den pflanzlichen Homologen, eine größere Ähnlichkeit als die *E.coli*-Leaderpeptidase.

3.2.1.2 Analyse potentieller Transmembranbereiche

Für die *Synechocystis*-Leaderpeptidasen ist je eine Transmembrandomäne im Anfangsbereich der katalytischen Domäne vorhergesagt. Im Fall der *E.coli*-Leaderpeptidase liefert die Vorhersage, neben der Transmembrandomäne zu Beginn der katalytischen Domäne, eine weitere am Anfang des Signalpeptids. In den folgenden *in silico* Analysen sollten nun die *Arabidopsis*-Homologen auf das Vorhandensein potentieller Transmembrandomänen überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden zunächst TMHMM-Analysen (TMHMM 2.0, <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) für alle in Tabelle 3.2 aufgeführten Homologen durchgeführt. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 3.37 dargestellt. Sowohl für die Leaderpeptidasen von *Synechocystis sp.* (LepB1, LepB2) als auch für die aus *E.coli*, konnten die erwarteten Transmembranbereiche bestätigt werden. Betrachtet man jedoch die TPP aus *Arabidopsis thaliana*, so wurde in keinem der drei Fälle ein Transmembranbereich vorhergesagt. Allerdings muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass das TMHMM einen bestimmten Grenzwert („cut off“) für das Existieren einer Transmembranhelix annimmt. Betrachtet man die Analysen dahingehend etwas genau-

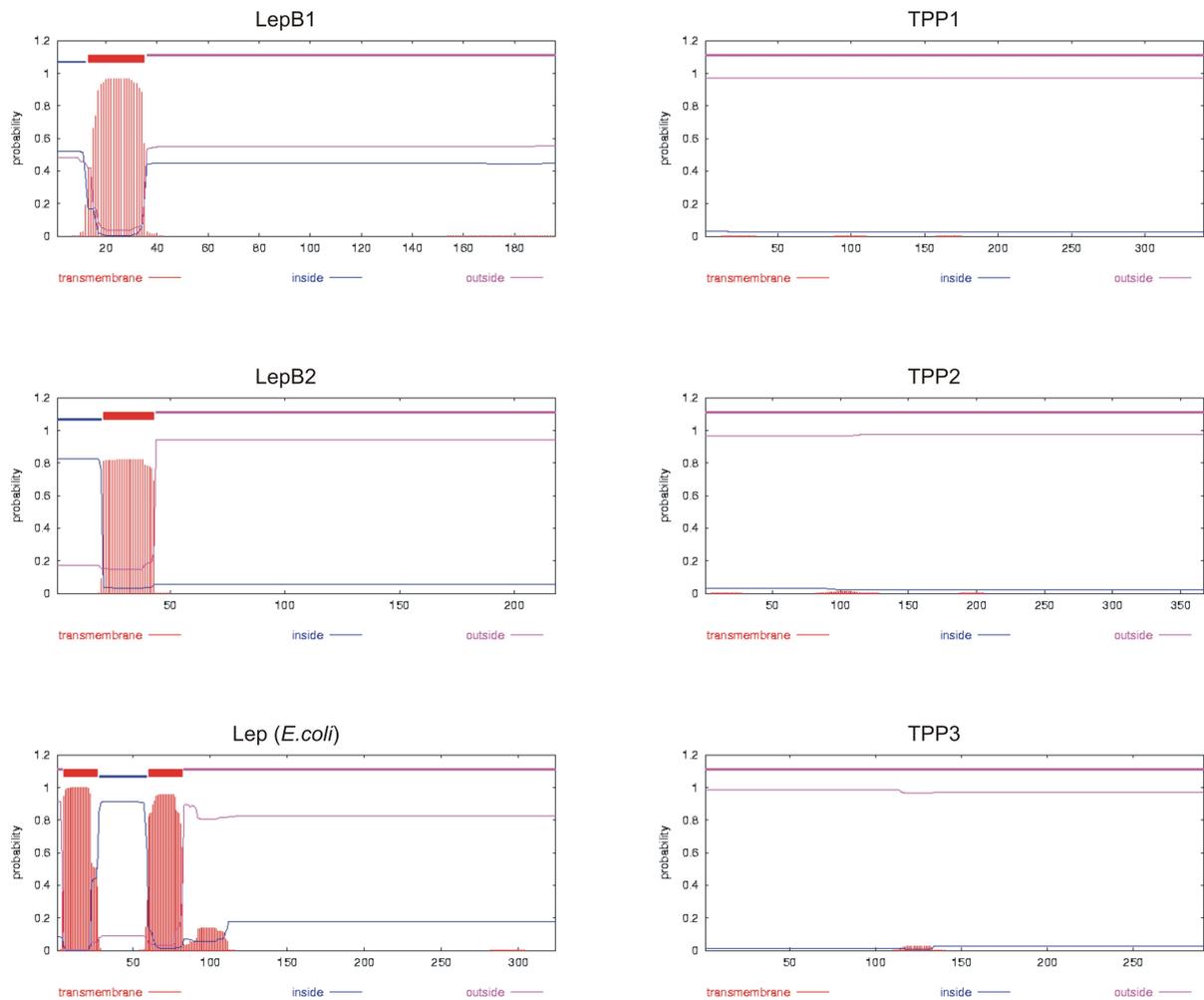


Abb. 3.37: Transmembranvorhersagen mittels TMHMM. Die Abbildung zeigt die Transmembranvorhersagen für die *Synechocystis* LepB1 und LepB2, die *E.coli*-Lep und die drei TPP aus *Arabidopsis thaliana*. Verwendet wurde das TMHMM-Vorhersagesystem (TMHMM 2.0 <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). Hydrophobe Transmembranbereiche sind rot schraffiert dargestellt.

er, so erkennt man (rot dargestellt) auch bei den TPP hydrophobe Bereiche, die auf eine mögliche Membranlokalisierung hinweisen (bei TPP1 und TPP2 je drei und bei der TPP3 einen). Um diese Ergebnisse etwas genauer zu betrachten, sollten diese Bereiche mittels Hydrophobizitätsplot genauer analysiert werden. Dieser Hydrophobizitätsplot wurde mittels TOPPRED (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html>) durchgeführt. Diese Methode zeigt im Gegensatz zu TMHMM nicht die Wahrscheinlichkeiten für einen Transmembranbereich, sondern die Hydrophobizität der einzelnen Bereiche des zu untersuchenden Proteins. Das Ergebnis dieser Analyse, ebenfalls für alle Homologen, ist in Abbildung 3.38 dargestellt. Betrachtet man zunächst die bakteriellen Leaderpeptidasen, bestätigen sich die TMHMM-Vorhersagen auch in den entsprechenden Hydrophobizitätsmaxima. Bei den TPP zeigt sich im Gegensatz zum TMHMM ein verändertes Bild. Für alle drei Homologen sind ebenfalls Hydrophobizitätsmaxima zu erkennen. Die-

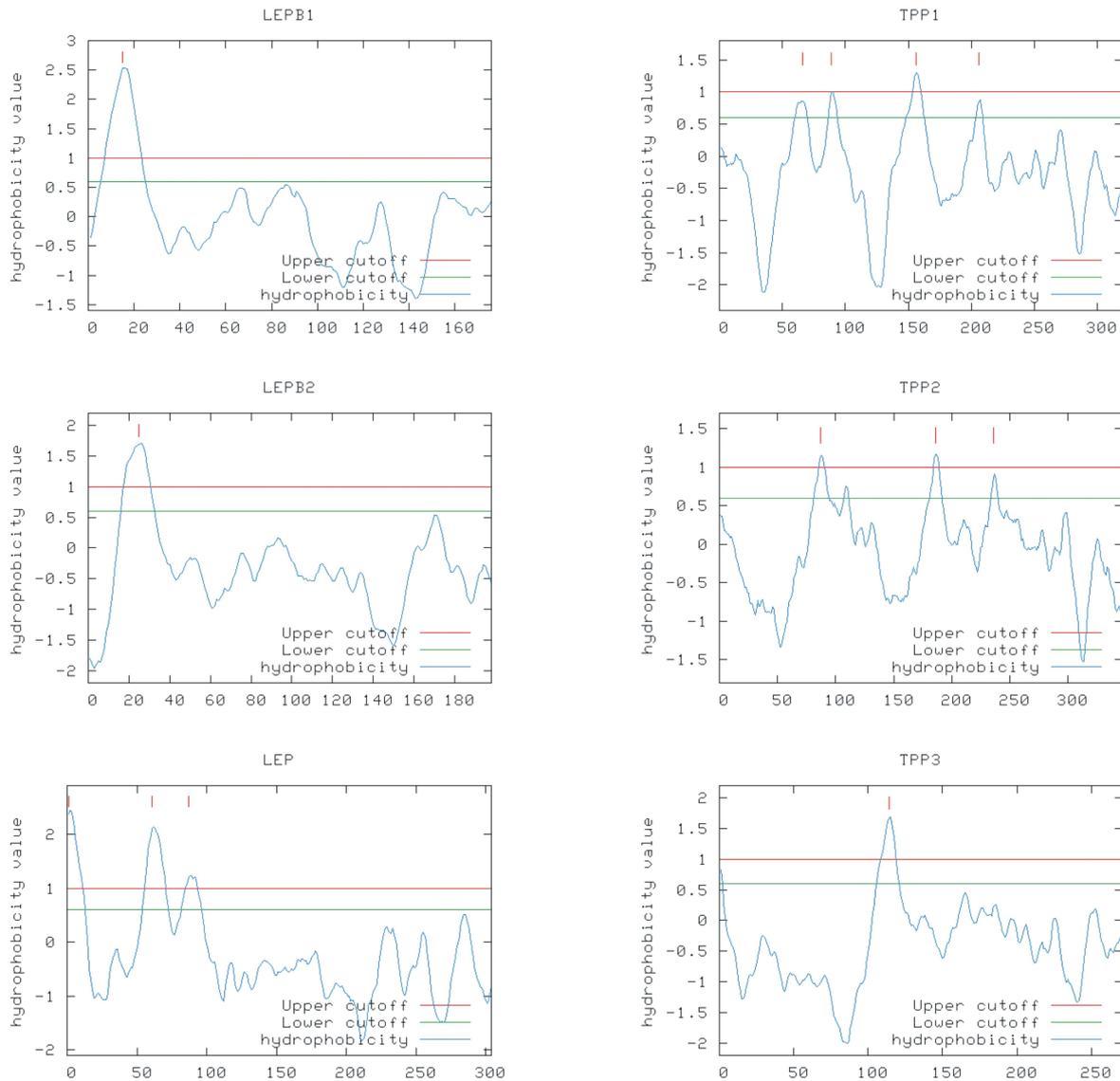


Abb. 3.38: Hydrophobizitätsplots nach Kyte und Doolittle. Die Abbildung zeigt Hydrophobizitätsanalysen der TPP-Homologen nach Kyte und Dolittle mit Hilfe des Vorhersageprogramms TOPPRED (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html>).

se erreichen zwar nicht die Werte der bakteriellen Leaderpeptidasen, lassen aber ebenfalls Rückschlüsse auf mögliche Transmembranbereiche bzw. Membranassoziationen zu. Vergleicht man nun die einzelnen TPP untereinander, so fällt auf, dass sich TPP1 und TPP2 in ihrem Hydrophobizitätsprofil sehr ähnlich sind. Sie besitzen dabei 3–4 ausgeprägte hydrophobe Bereiche. Die TPP3 unterscheidet sich jedoch deutlich von diesen beiden. Sie zeigt nur einen hydrophoben Bereich, allerdings mit einem höheren Hydrophobizitätsmaximum, das fast an die der Leaderpeptidasen heranreicht. Des Weiteren ist der Bereich vor der katalytischen Domäne (Aminosäure 1–90) durchgehend hydrophiler als der von TPP1 und TPP2. Eine weitere Auffälligkeit ist die Ähnlichkeit des

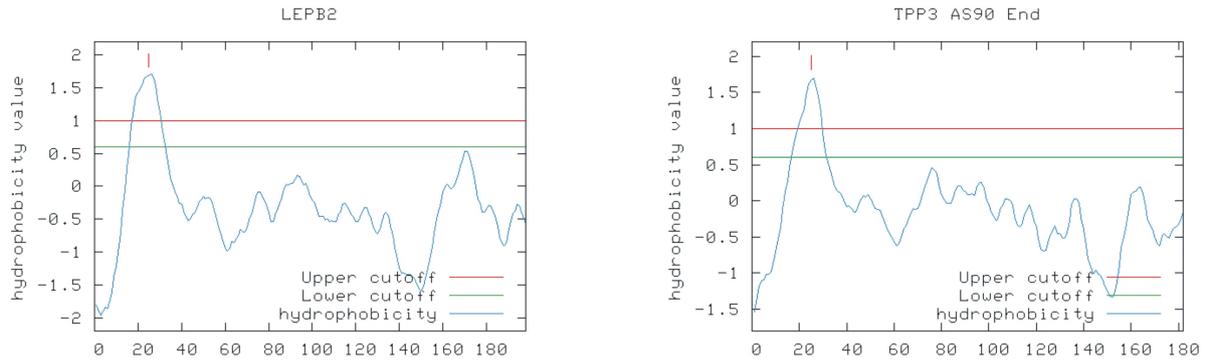


Abb. 3.39: Vergleichende Hydrophobizitätsplots der verkürzten TPP3 und LepB2. Die Abbildung zeigt Hydrophobizitätsanalysen der LepB2 aus *Synechocystis sp.* mit der N-terminal verkürzten TPP3 (AS90-Ende) nach Kyte und Dolittle mit Hilfe des Vorhersageprogramms TOPPRED (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html>).

TPP3-Profiles zur LepB2 aus *Synechocystis sp.* Die Abbildung 3.39 zeigt diese Ähnlichkeit genauer. Dabei wurde die N-terminal verkürzte TPP3 (ohne die ersten 90 Aminosäuren) mit der LepB2 verglichen. Bei der Analyse beider Hydrophobizitätsplots ist eine erhebliche Ähnlichkeit zwischen LepB2 und TPP3 zu erkennen. Dies lässt eine besonders enge Verwandtschaft zwischen beiden Proteinen im Vergleich zu TPP2 und TPP3 vermuten.

Die Daten zur Transmembranvorhersage und Hydrophobizität können damit folgendermaßen zusammengefasst werden. Die Transmembranbereiche der bakteriellen Leaderpeptidasen konnten bestätigt werden. In der TMHMM-Vorhersage ergeben die pflanzlichen TPP keine Transmembranbereiche. Betrachtet man jedoch die Hydrophobizitätsprofile, so sind auch in diesen Fällen mögliche hydrophobe Domänen erkennbar. Auffällig ist, dass sich ähnlich wie bei den Proteinsequenzvergleichen, die TPP wieder in zwei Gruppen teilen. Die eine Gruppe wird von TPP1 und TPP2 gebildet, die ein sehr ähnliches Hydrophobizitätsprofil mit 3–4 möglichen hydrophoben Domänen zeigen. Die andere Gruppe bildet die TPP3, die neben einer stärker ausgeprägten hydrophoben Domäne auch einen deutlich hydrophileren N-Terminus erkennen lässt. Beim genaueren Vergleich der LepB2 und der N-terminal verkürzten TPP3 fällt auf, dass beide Proteine eine ausgeprägtere Ähnlichkeit aufweisen, als dies für die TPP1 bzw. TPP2 der Fall ist.

3.2.1.3 Vorhersagen zur subzellulären Lokalisierung

Da es sich bei den TPP um kerncodierte Proteine handelt, die im Fall der TPP chloroplastidär lokalisiert sein sollten und somit ein entsprechendes Transportsignal in Form eines Transitpeptids tragen, sollte nun über verschiedene Vorhersageprogramme die subzelluläre Lokalisierung überprüft werden. Wie aus den vorhergehenden Abschnitten erkennbar, unterscheiden sich die TPP sowohl in ihrer Homologie als auch in ihrem Hy-

Tab. 3.3: Vorhersagen zur subzellulären Lokalisierung. Zusammenfassung der Analyse zur subzellulären Lokalisierung der einzelnen TPP mittels der Vorhersageprogramme TARGETP, PREDOTAR, MITOPROT II und CHLOROP. Die entsprechenden Vorhersagen sind (sofern verfügbar) für Chloroplasten (C) und Mitochondrien (M) angegeben. Wenn die Werte eine eindeutige Tendenz/Wahrscheinlichkeit zeigen, sind diese kursiv und mit einem * markiert.

	TARGETP	PREDOTAR	MITOPROT II	CHLOROP
TPP1	<i>M (0,393)*</i>	M (0,47)	<i>M (0,712)*</i>	–
	C (0,084)	C (0,46)	–	C (0,501)
TPP2	M (0,463)	M (0,55)	<i>M (0,846)*</i>	–
	C (0,367)	C (0,60)	–	C (0,483)
TPP3	M (0,016)	M (0,02)	M (0,330)	–
	<i>C (0,879)*</i>	<i>C (0,38)*</i>	–	C (0,483)

drophobizitätsprofil. Dabei ist eine Teilung in zwei Gruppen zu erkennen. Diese Daten lassen vermuten, dass die einzelnen Homologen möglicherweise unterschiedliche Lokalisierungen innerhalb der Zelle aufweisen könnten. Zur Vorhersage wurden die Programme TARGETP, PREDOTAR und MITOPROT II verwendet. Während TARGETP und PREDOTAR Vorhersagen über die Lokalisierung in Chloroplasten oder Mitochondrien geben, gibt MITOPROT II nur eine Aussage über eine mögliche Mitochondrienlokalisierung und CHLOROP ist entsprechend nur auf Chloroplasten beschränkt. Die Ergebnisse für diese Vorhersage in Anwendung auf die TPP aus *Arabidopsis thaliana* sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Die Ergebnisse einer solchen Analyse dürfen in den meisten Fällen nur als Indizien verstanden werden. Definitive Aussage oder gar Beweise können erfahrungsgemäß aus solchen Daten nicht abgeleitet werden. Aus diesem Grund sollen die Ergebnisse im Folgenden mit entsprechender Vorsicht interpretiert werden. Betrachtet man die TARGETP-Vorhersagen, so zeigt die TPP1 eine Tendenz zu Mitochondrien, die TPP2 eine nahezu gleichen Wert für beide Organellen und die TPP3 einen sehr deutlichen Trend zu Chloroplasten. Bei der PREDOTAR-Analyse der TPP1 und TPP2 fallen die Werte für beide Organellen gleich aus. Die TPP3 zeigt wiederum eine Tendenz in Richtung einer Chloroplastenlokalisierung. MITOPROT II gibt für TPP1 und TPP2 eine Mitochondrienlokalisierung an, während bei der TPP3 der entsprechende Wert sehr klein ist und gegen eine solche Lokalisierung spricht. Die Daten aus CHLOROP zeigen für keine der drei TPP aussagekräftige Werte.

3.2.1.4 Expressionsanalysen mittels DNA-Array-Datenbanken

Als abschließende *in silico*-Analyse sollten Informationen zu den Expressionsorten (Gewebe) der einzelnen TPP ausgewertet werden. Mit dem GENEVESTIGATOR ist es möglich, komfortabel Expressionsanalysen bestimmter Gene u.a. in *Arabidopsis thaliana* durch-

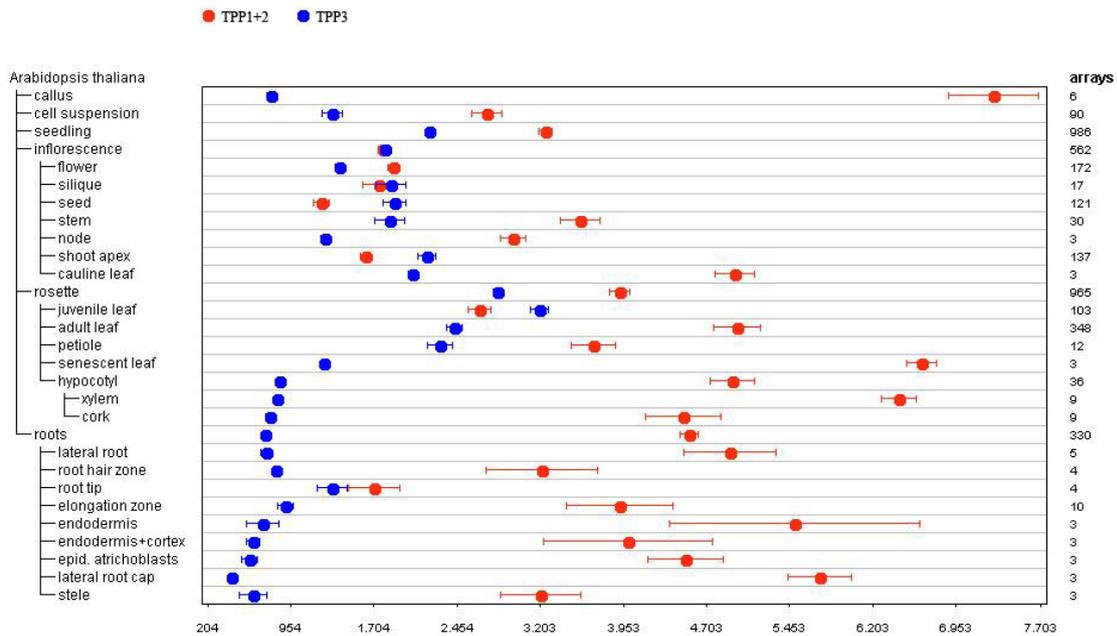


Abb. 3.40: Expressionsanalyse mittels DNA-Array. Die Abbildung zeigt die Expressionsanalyse der TPP aus *Arabidopsis thaliana* basierend auf DNA-Array-Datenbanken (GENEVESTIGATOR <https://www.genevestigator.ethz.ch/>). Dabei sind die Expressionsraten der TPP1 und TPP2 rot, die der TPP3 blau dargestellt. Eine getrennte Auswertung der TPP1 und TPP2 ist nicht möglich, da diese trotz separater Einträge in SwissProt und NCBI bei GENEVESTIGATOR als ein Gen behandelt werden.

zuführen. Dabei können die Expressionslevel bestimmter Gene basierend auf DNA-Array-Datenbanken unterteilt nach den verschiedenen Pflanzengeweben dargestellt werden. Bei der Anwendung auf die in dieser Arbeit verwendeten TPP fiel auf, dass die TPP1 und TPP2 im GENEVESTIGATOR mit einem gemeinsamen Datensatz aufgeführt sind, obwohl sie unterschiedliche SwissProt und NCBI-Einträge besitzen. Das Ergebnis der Analyse ist in Abbildung 3.40 dargestellt. Die TPP1+2 zeigen in den meisten Fällen ein höheres Expressionslevel als die TPP3. Ausnahmen bildet der Samen bei der Fruchtreifung und die jungen Blätter der Rosette. Die TPP3 besitzt dabei ihre höchsten Expressionsraten in grünem Blattgewebe, während die TPP1+2 im seneszenten Gewebe und in den Wurzeln ihre stärksten Expressionsraten zeigen. Es ist jedoch zu beachten (gerade bei Betrachtung der Expression in den Wurzeln), dass die Array-Datenmenge dort im Vergleich zu anderen Geweben (wie z.B. Rosette oder Keimlinge) um ein Vielfaches geringer ist.

3.2.1.5 Zusammenfassung der *in silico* Analysen

Die *in silico* Analysen der TPP aus *Arabidopsis thaliana* lassen sich folgendermaßen zusammenfassen. Die TPP1 und TPP2 zeigen sowohl in der Proteinsequenz als auch im Hy-

drophobizitätsprofil große Ähnlichkeiten untereinander. Die TPP3 besitzt beim Vergleich der Proteinsequenzen eine höhere Ähnlichkeit zu den Leaderpeptidasen aus *Synechocystis sp.* als die TPP1 und TPP2. Während TMHMM für keine der TPP einen Transmembranbereich vorhersagt, zeigen Hydrophobizitätsanalysen bei TPP1 und TPP2 3–4 hydrophobe und im Fall der TPP3 einen hydrophoben Bereich. Dabei ist das Hydrophobizitätslevel im Fall der TPP3 mit denen der Leaderpeptidasen vergleichbar. Lässt man bei der TPP3 einen Teil des N-Terminus bei dem Vergleich aus (mögliches Transitpeptid), so zeigt sich eine starke Ähnlichkeit im Hydrophobizitätsprofil zur LepB2. Analysen zur subzellulären Lokalisierung deuten für die TPP1 auf eine mögliche mitochondrielle, für die TPP3 auf eine chloroplastidäre Lokalisierung hin. Für die TPP2 ist keine eindeutige Vorhersage erkennbar. Expressionsanalysen zeigen für die TPP1+2 eine grundsätzlich höhere Expressionsrate als für die TPP3. Die höchsten Expressionen zeigten sich dabei für die TPP1+2 im seneszenten Gewebe und in den Wurzeln, während die TPP3 in jungen Rosettenblättern und grünem Gewebe ihre höchsten Expressionsraten zeigte. Diese Daten lassen vermuten, dass es eine Korrelation zwischen der gewebespezifischen Expression und der subzellulären Lokalisierung bzw. der Funktion geben könnte. So stimmt eine Mitochondrienlokalisierung theoretisch mit der Expression in nicht grünem Gewebe überein. Denkbar wäre dementsprechend, dass die TPP3 ihre Funktion entsprechend in grünem Gewebe, wie jungen Rosettenblättern übernimmt, während die TPP1 und TPP2 ähnliche Funktionen in nicht grünem Gewebe erfüllen. Da es sich dabei allerdings nur um Vorhersagen bzw. statistische Bewertungen experimenteller Datensätze handelt, kann dies maximal als Arbeitsmodell dienen.

3.2.2 Lokalisierungsstudien der TPP1, TPP2 und TPP3 durch *in organello* Importe

Die *in silico* Analysen ergaben eine mögliche subzelluläre Lokalisierung, die von den bisherigen Literaturangaben abweicht. Aus diesem Grund sollten diese Vorhersagen zunächst durch *in vitro* Importe überprüft werden.

3.2.2.1 Vergleichender *in organello* Import in Chloroplasten und Mitochondrien

In unserer Arbeitsgruppe sind sowohl für Chloroplasten als auch für Mitochondrien *in vitro* Importsysteme etabliert. Ähnlich dem *in thylakoido* Verfahren (vgl. Abbildung 3.1, S. 22) werden im *in organello* Ansatz zuvor *in vitro* translatierte und radioaktiv markierte Substrate mit isolierten Organellen in einem Importansatz inkubiert (Details siehe 5.2.10, S.135). Nach dem Transport wird ein Teil der Organellen mit Proteasen inkubiert, um nicht importierte Substrate abzubauen. Die Ergebnisse des *in organello* Imports der

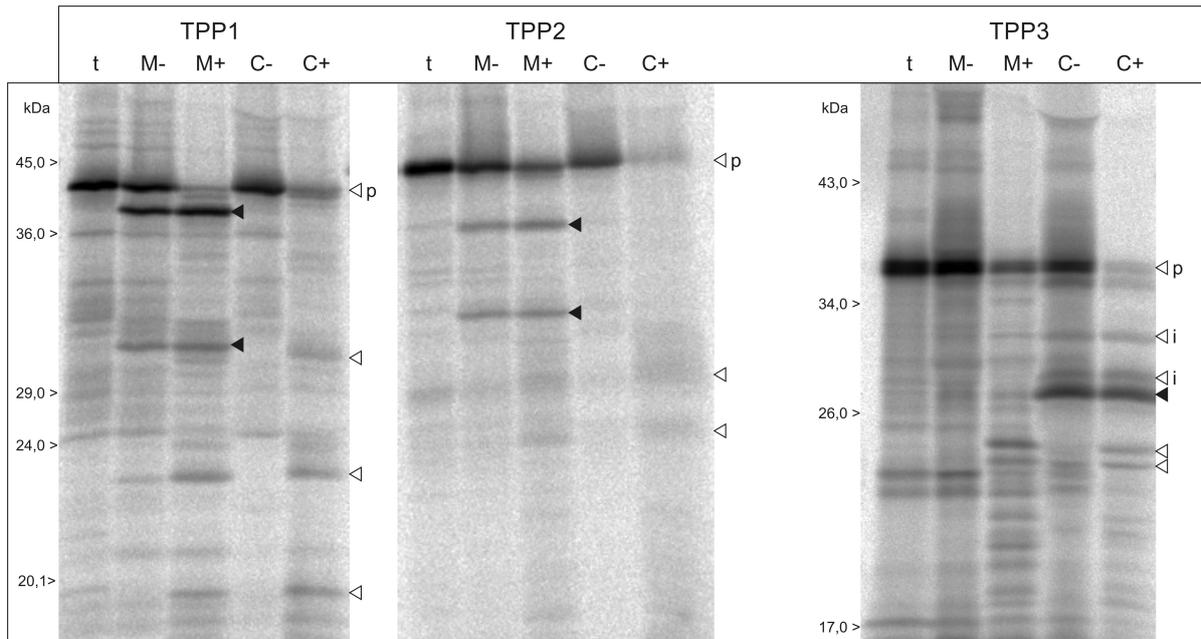


Abb. 3.41: *In organello* Import der TPP in Chloroplasten und Mitochondrien. Die Abbildung zeigt das Ergebnis des *in organello* Imports von TPP1, TPP2 und TPP3 in isolierte Erbsenchloroplasten und -mitochondrien nach SDS-PAGE und Autoradiographie. Die isolierten Organellen wurden nach dem Transport gewaschen und aufgeteilt. Ein Teil wurde unbehandelt in Probenpuffer aufgenommen, 5 min bei 95°C erhitzt und anschließend einer SDS-PAGE unterzogen (-), ein anderer Teil erst nach 20 min Proteaseverdau (+). Die Translation ist mit (t), die Mitochondrienfraktionen mit (M) und Chloroplastenfraktionen mit (C) bezeichnet. Die Vorläuferproteine sind mit (p), stromale Prozessierungsintermediate mit (i), importierte und mögliche reife Proteine mit einer **schwarzen Pfeilspitze** und proteasebedingte Abbauprodukte, die beim Translationsverdau entstehen, mit **weißen Pfeilspitzen** gekennzeichnet. **Bedingungen:** SDS-PAGE mit Midi-Polyacrylamidgel (20 x 20 x 0,1 cm, Gradient: 10–17,5% PAA), Autoradiographie für 12 h, Auswertung durch Software FUJIFILM® ImageGauge V4.0.

authentischen TPP1, TPP2 und TPP3 sind in Abbildung 3.41 gezeigt. Sowohl TPP1 als auch TPP2 zeigen einen deutlichen Import in Mitochondrien (schwarze Dreiecke). Ein vergleichbares Signal, das auf einen Chloroplastenimport schließen lassen würde, ist nicht zu erkennen. Sowohl für TPP1 als auch TPP2 sind beim Mitochondrienimport je zwei Importprodukte detektierbar. Im Fall der TPP1 bei ca. 39 und 30 kDa und im Fall der TPP2 bei 36 und 32 kDa. Da es bisher keine Informationen über mögliche TPP-Homologe in Mitochondrien gibt, kann an dieser Stelle auch keine Aussage darüber getroffen werden, bei welchem der detektierten Signale es sich um das reife prozessierte Produkt handeln könnte.

Im Gegensatz zu TPP1 und TPP2 zeigt die TPP3 einen ausschließlichen Import in Chloroplasten. Das dominante Importprodukt weist dabei eine Größe von ca. 28 kDa auf und stimmt damit mit den in der Literatur gezeigten Western-Analysen der TPP überein (Chaal et al., 1998). Neben einem Hauptimportprodukt bei ca. 28 kDa, sind noch zwei weitere Signale (i) im Bereich von 29–30 kDa und ca. 32 kDa detektierbar. Dabei handelt es sich vermutlich um Prozessierungsintermediate der TPP3 durch die stromale Prozes-

sierungspeptidase. Beim Mitochondrienimport ist im Bereich von 27–29 kDa ebenfalls ein schwaches Signal zu erkennen, was sowohl in der unbehandelten wie auch proteasebehandelten Fraktion zu sehen ist. Allerdings ist dieses Signal von seiner Intensität so schwach, das in diesem Fall nicht von einem eindeutigen Importsignal auszugehen ist. Neben den Degradationsprodukten, die aus der Thermolysinbehandlung der Translation stammen (Daten nicht gezeigt), sind in den proteasebehandelten Organellfraktionen weitere Degradationsprodukte zu erkennen. Diese gehen vermutlich auf unspezifisch an die Organellen gebundene Vorläuferproteine zurück, die dadurch nicht mehr vollständig für die Protease zugänglich sind und nur unvollständig abgebaut werden können.

Zusammengefasst kann aus den Importen der authentischen TPP geschlossen werden, dass die TPP1 und TPP2 in Mitochondrien und die TPP3 in Chloroplasten transportiert wird. Im Fall der TPP3 stimmt das detektierte Importprodukt mit seiner Größe von 28 kDa, mit der in der Literatur beschriebenen Größe der möglichen funktionellen TPP überein (Chaal et al., 1998).

3.2.2.2 Chloroplastenimport der TPP3 mit Subfraktionierung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die TPP3 in Chloroplasten transportiert wird und ein Produkt mit der erwarteten Größe der funktionellen TPP entstanden ist, war es nun das Ziel herauszufinden, ob die TPP3 innerhalb der Chloroplasten weiter in die Thylakoide transportiert wird und aus der Sublokalisierung eine Funktionalität abgeleitet werden kann. Dazu wurde der *in organello* Import wiederholt und die Chloroplasten anschließend subfraktioniert (siehe Abbildung 3.42). Dabei werden die Chloroplasten in Stroma und Thylakoide aufgetrennt. Ein Teil der Thylakoide wurde mit Thermolysin behandelt. Substrate die sich innerhalb der Thylakoidvesikel befinden, sind vor der Protease geschützt. Membranständige Proteine, die sowohl einen thylakoid- als auch stromaexponierten Teil besitzen, sind dagegen nur teilweise vor der Protease geschützt und zeigen eine Degradation zu einem verkürzten Produkt. Diese Verkürzung entsteht durch den Verdau des stromaexponierten Teils des Proteins.

Als Kontrolle für dieses Experiment wurde das Rieske-Protein aus Spinat (*Spinacia oleracea*) mitgeführt. Dieses ist Bestandteil des Cytochrom b_6/f Komplexes, wird nur durch die stromale Prozessierungspeptidase (SPP) prozessiert und im Anschluss an den Transport in die Thylakoide, ohne weitere Prozessierung, in den Komplex eingebaut. Die Translation des Rieske-Proteins zeigt, aufgrund eines alternativen Translationsstarts, eine Doppelbande im Bereich des Vorläuferproteins. Das Rieske-Protein selbst zeigt mit einem Importsignal bei ca. 20 kDa ein Importverhalten, welches dem der Literatur (Molik et al., 2001) entspricht.

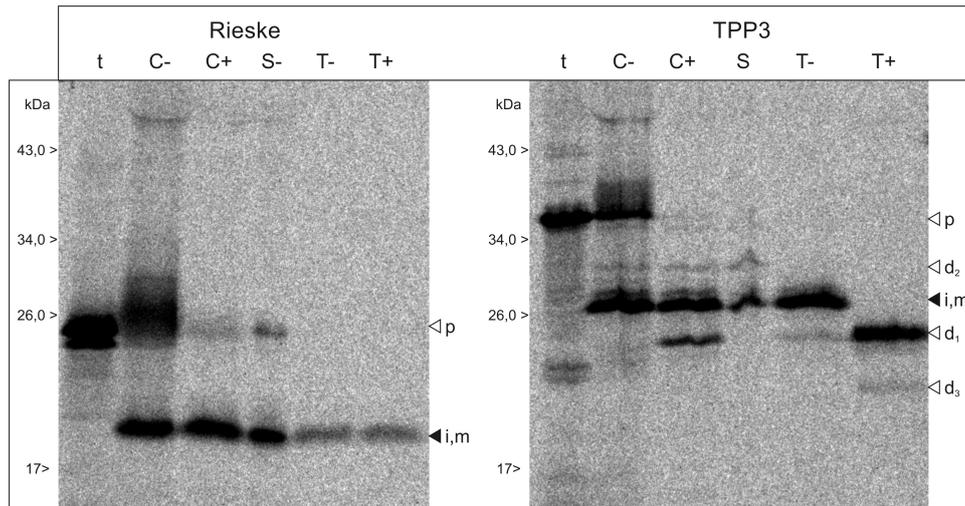


Abb. 3.42: *In organello* Import der TPP3 und des Rieske-Proteins in isolierte Erbsenchloroplasten mit Subfraktionierung. Die Abbildung zeigt den Import der TPP3 in isolierte Erbsenchloroplasten mit anschließender Subfraktionierung in Stroma und Thylakoide nach SDS-PAGE und Autoradiographie. Die Chloroplasten (C) und Thylakoide (T) wurden unbehandelt (-) und nach Thermolysinbehandlung (+) zusammen mit den Translationen (t) und dem Stroma (S) aufgetragen. Alle Proben wurden vor der SDS-PAGE in 2x Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95°C denaturiert. Die Importsignale sind mit einer **schwarzen Pfeilspitze** markiert, wobei die Intermediate mit (i) und reife Proteine mit (m) bezeichnet sind. Proteasebedingte Abbauprodukte sind mit (d₁–d₃) gekennzeichnet. **Bedingungen:** vgl. Abbildung 3.41.

Beim Betrachten der Importsignale der TPP3 fällt auf, dass diese Ähnlichkeiten zu dem Transportverhalten des Rieske-Proteins zeigt. Nachdem die TPP3 in die Chloroplasten importiert wurde, findet im Stroma eine Prozessierung zu einem „Intermediat“ von 28 kDa statt (siehe Stromafraktion). Dieses Intermediat wird nicht weiter prozessiert und ist unverändert in den unbehandelten Thylakoiden nachweisbar. Die proteasebehandelten Thylakoide zeigen ein um ca. 2–3 kDa verkürztes Produkt. Dies lässt darauf schließen, dass die TPP3 in die Thylakoidmembran inseriert, ein Teil des Proteins stromaexponiert und damit vor der Protease ungeschützt ist. Dieses Verhalten lässt auf eine transmembrane Topologie der TPP3 schließen.

Wie schon in Abbildung 3.41 (S. 72) sind oberhalb des Intermediats/reifen Proteins der TPP3 schwache Signale im Bereich von ca. 29 kDa und 32 kDa zu erkennen (d₂). Bei diesen handelt es sich offensichtlich um stromaspezifische Intermediate. Möglicherweise ist die Prozessierung im Stroma in mehrere Schritte unterteilt, deren Endprodukt die reife TPP3 ist. In der Fraktion der proteasebehandelten Chloroplasten (C+) ist ebenfalls das verkürzte Produkt (d₁) zu erkennen, welches für die proteasebehandelte Fraktion (T+) typisch ist. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei der Proteasebehandlung Teile der Chloroplasten zerstört und Thylakoide freigesetzt werden. So entsteht ein identisches Signal, entsprechend der proteasebehandelten Thylakoide (T+). Zusätzlich zu diesen Signalen ist in beiden Thylakoidfraktionen ein um ca. 2 kDa verkürztes Protein (d₃) zu

erkennen. Dessen Ursache könnte eine C-terminale Prozessierung sein, die nach der Insertion in die Thylakoidmembran stattfindet. Da eine solche Verkürzung nicht in den unbehandelten Chloroplasten (C-) auftritt, muss davon ausgegangen werden, dass dieser Prozess eine gewisse Zeit benötigt. Diese zuvor gezeigten Ergebnisse konnten ebenfalls für Spinatchloroplasten reproduziert werden (Daten nicht gezeigt).

3.2.2.3 Analyse möglicher Komplexe der TPP3 mittels Native-PAGE

In dem vorhergehenden Experiment konnte gezeigt werden, dass die TPP3 thylakoidlokalisiert und ein Teil des Proteins stromaexponiert ist. Da dies als Hinweis für die Funktionalität der TPP3 gewertet werden könnte, sollte nun überprüft werden, ob sie auch Bestandteil höhermolekularer Komplexe ist. Da auch in diesem Fall die Ergebnisse mit den Eigenschaften des Rieske-Proteins (höhermolekulare Thylakoid- und Stroma-Komplexe) verglichen werden sollten, wurden diese Importe in Spinatchloroplasten durchgeführt, wie sie auch in den als Referenz dienenden Arbeiten von [Molik et al. \(2001\)](#) und [Molik \(2005\)](#) Verwendung fanden.

Die Spinatchloroplasten wurden nach dem Import subfraktioniert, Proben des Stomas einer CN-PAGE (*Colorless-Native* PAGE) und die Thylakoide nach Solubilisierung mit Digitonin einer BN-PAGE (*Blue-Native* PAGE) unterzogen. Mit der CN-PAGE sollen die löslichen stromalen Proteinkomplexe nativ getrennt und analysiert werden. Die BN-PAGE dient zur nativen Trennung der Membrankomplexe der Thylakoidmembran, die zuvor mittels Digitonin schonend solubilisiert wurden. Bei der BN-PAGE wird dabei sowohl dem Probenpuffer als auch dem Laufpuffer Coomassie-G250 zugesetzt. Dieses bindet an die Proteinkomplexe und sorgt damit für eine entsprechende Ladung der Komplexe und damit verbundene Migration im Gel. Das Ergebnis des Experiments ist in [Abbildung 3.43](#) dargestellt. Das Rieske-Protein zeigt in der BN-PAGE das erwartete Signal im Cytochrom b_6/f -Komplex bei ca. 330 kDa ([Molik et al., 2001](#)). Des Weiteren konnte der, in der Dissertation von S. Molik ([Molik, 2005](#)) beschriebene, stromale Rieske/Cpn60-Komplex bei ca. 440 kDa in der CN-PAGE detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigt die BN-PAGE der TPP3, dass der größte Teil als Monomer vorliegt. Allerdings sind darüber hinaus Signale in Form einer diffusen Bande, im Bereich von 70–90 kDa zu erkennen. Möglicherweise stellen diese höhermolekularen Komplexe die aktiven Substrat/TPP-Komplexe während der Prozessierung dar. Interessant ist ein höhermolekulares Signal (Doppelbande) der TPP3 im Stroma, welches z.T. etwas kleiner ist als das Signal des Rieske/Cpn60-Komplexes. Dieses ist zwar sehr schwach, lässt allerdings auf eine Interaktion mit stromalen Faktoren schließen (vgl. Diskussion Abschnitt [4.2.3](#), S. [102](#)).

Da kein *in thylakoido* Import der TPP3 möglich ist, kann keine Aussage darüber getroffen werden, auf welchem der vier bisher bekannten Wege, die TPP3 in die Thylakoide

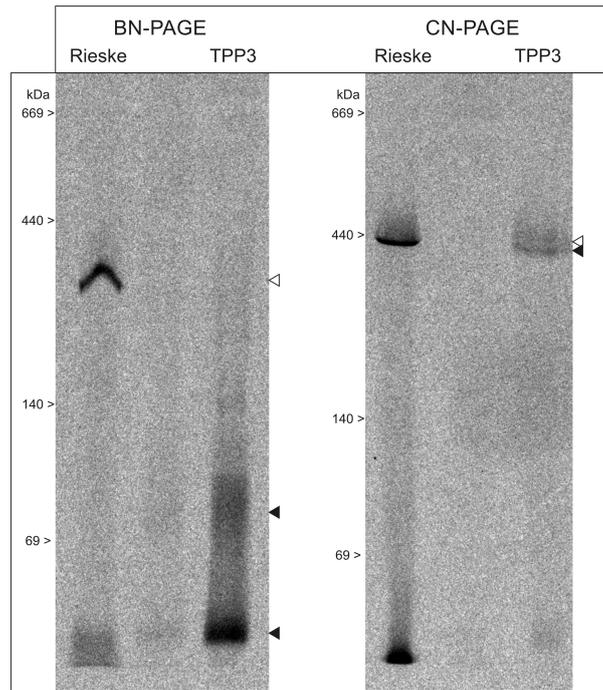


Abb. 3.43: *In organello* Import der TPP3 und des Rieske-Proteins in isolierte Spinatchloroplasten mit Subfraktionierung und anschließender CN- und BN-PAGE. Die Abbildung zeigt die Komplexanalyse der Stromafraktionen (CN-PAGE) und der Thylakoidfraktionen (BN-PAGE) nach Import der TPP3 in Erbsenchloroplasten. Die in der BN-PAGE aufgetragenen Mengen an Thylakoiden entsprechen dabei 30 µg Chlorophyll und das in der CN-PAGE aufgetragene Stroma der Menge, wie sie aus Chloroplasten entsprechend 25 µg Chlorophyll isoliert wurde. Komplexe des Rieske-Proteins sind mit einer **weißen Pfeilspitze**, die der TPP3 mit einer **schwarzen Pfeilspitze** markiert. **Bedingungen:** vgl. 5.2.4.5, S. 123.

gelangt. Möglicherweise interagiert die TPP3 vor dem Transport/Insertion mit stromalen Komponenten um anschließend seine Funktion erfüllen zu können.

3.2.3 Lokalisierungsstudien der TPP1, TPP2 und TPP3 durch *in vivo* Studien

Aufgrund der *in vitro* Importversuche, die auf eine mögliche Mitochondrienlokalisierung der TPP1 und TPP2 sowie auf eine plastidäre Lokalisierung der TPP3 hinweisen, sollten diese *in vivo* überprüft werden. Dazu wurde das C-terminale Ende der jeweiligen TPP mit dem Reporter EYFP fusioniert. Anschließend wurde Blattgewebe aus Erbse transient biolistisch transformiert und die Lokalisierung der EYFP-Fusionen mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Vorteil der biolistischen Transformation ist zum einen der geringere Zeitaufwand (man erhält schneller transformierte Zellen als durch stabile Transformation mit *Agrobacterium tumefaciens*) und zum anderen ist diese Methode unabhängig vom verwendeten Organismus, Zelltyp oder Gewebe (Klein et al., 1992). EYFP wurde als Reporter verwendet, da es gegenüber EGFP oder ECFP von langwelligerem Licht angeregt wird und dadurch photodestruktive Prozesse im Pflanzengewebe

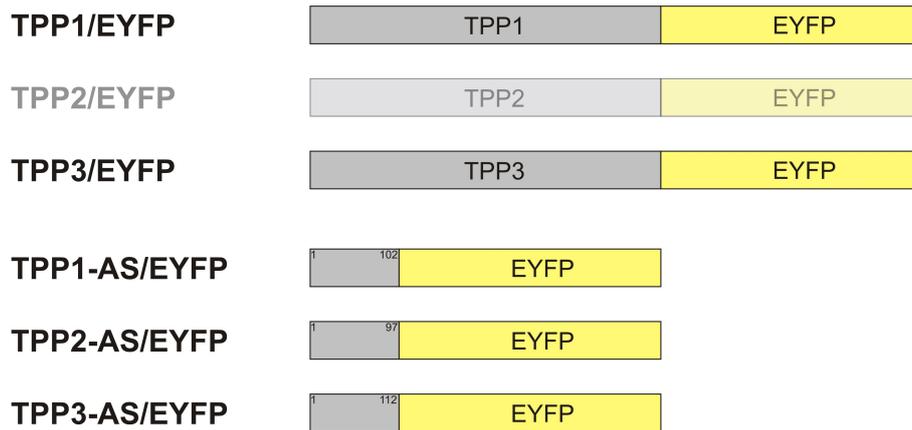


Abb. 3.44: Übersicht der TPP/EYFP-Konstrukte für die *in vivo* Untersuchungen. Die Abbildung zeigt schematisch die, für die *in vivo* Experimente konstruierten, EYFP-Fusionen. Neben den Volllänge-fusionen wurden verkürzte Fusionen erstellt, die nur 97–112 Aminosäuren des N-terminalen Teils der entsprechenden TPP enthalten. Die bisher nicht klonierte TPP2/EYFP-Fusion ist transparent dargestellt.

und im Protein selbst minimiert werden. Weiterhin lässt sich EYFP im Gegensatz zum EGFP in Co-Lokalisierungsexperimenten mit ECFP kombinieren. EGFP kann aufgrund der Lage der Absorptions- und Emissionsmaxima nur in Kombination mit DsRed oder ähnlich fluoreszierenden Markern verwendet werden. Allerdings emittieren Letztere in einem ähnlichen Wellenlängenbereich wie das Chlorophyll, was eine getrennte Detektion erheblich erschwert.

Für die *in vivo* Studien wurden zwei Arten von EYFP-Fusionsproteinen kloniert, um die Lokalisierung der TPP-Homologen durch Fluoreszenzmikroskopie nach transienter Transformation zu überprüfen. Pro TPP wurde je ein Volllänge- und ein verkürztes EYFP-Konstrukt kloniert. Bei den verkürzten Varianten wurden die ersten ca. 100 Aminosäurereste des N-Terminus der jeweiligen TPP mit dem EYFP fusioniert (siehe Abbildung 3.44). Im Folgenden soll kurz erklärt werden, weshalb verkürzte Fusionen kloniert wurden und warum dabei die Wahl auf die ersten 100 Aminosäurereste fiel. Die Sortierung der kerncodierten Proteine von Mitochondrien und Chloroplasten erfolgt über N-terminale Präsequenzen bzw. Transitpeptide (Details siehe Einleitung). Die Präsequenzen der mitochondrialen Proteine umfassen im Mittel 40 Aminosäuren, die Transitpeptide der plastidären Proteine durchschnittlich 50 Aminosäuren (Glaser et al., 1998; von Heijne et al., 1989). Aus diesem Grund kann bei den verkürzten Fusionen davon ausgegangen werden, dass sich sowohl das gesamte Transportsignal, als auch mögliche nachfolgende Schnittstellen von Prozessierungspeptidasen innerhalb der oben genannten 100 Aminosäuren befinden. Ein weiterer Vorteil dieser verkürzten Konstrukte ist, dass eine Aussage über Einflüsse des reifen Proteins auf den Transport getroffen werden kann, wenn man sie mit den Volllänge-Varianten vergleicht. Die unterschiedlichen Längen (97–112) sind darauf zurückzuführen, dass versucht wurde bei der Klonierung des „*in frame*“-Übergangs zum

EYFP möglichst keine Änderung der Aminosäuresequenz zu erzeugen. Deshalb wurde ein Serin-Codon im Bereich der 100 Aminosäurereste so verändert (*wobble*-Base), dass es zusammen mit dem Startmethionin des EYFP eine NcoI-Schnittstelle ergibt. Die entsprechenden Fusionen wurden für die *in vivo* Analysen in einen modifizierten pRT100-Vektor (pRT- Ω /Not/Asc, Überlacker & Werr (1996)) und parallel dazu für vergleichende *in vitro* Untersuchungen, in den für *in vitro* Translationen im Retikulozytenlysat optimierten pBAT-Vektor kloniert. Mit Ausnahme des TPP2/EYFP konnten alle Fusionen erfolgreich in beide Vektoren kloniert werden.

3.2.3.1 Biolistische Transformation und Fluoreszenzmikroskopie

Die verkürzten EYFP-Fusionen (TPP1-, TPP2- und TPP3-AS/EYFP) wurden nach der Klonierung in den pRT- Ω /Not/Asc-Vektor auf Goldpartikel aufgebracht und anschließend mit Hilfe der Transformationsapparatur (siehe Abbildung 3.45) auf Spinatblätter geschos-

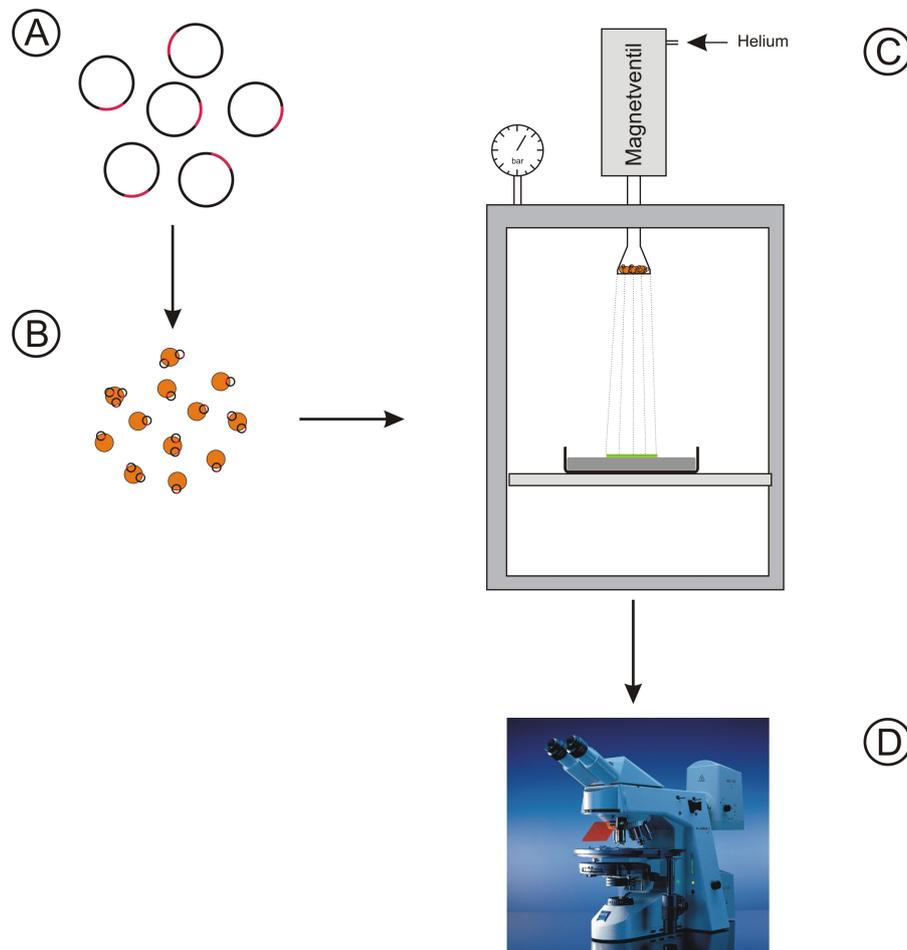


Abb. 3.45: Ablauf der biolistischen Transformation (Schema). Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs der biolistischen Transformation. Klonierung der Konstrukte in pRT- Ω /Not/Asc (A), Präzipitation an Goldpartikel (B), eigentliche Transformation durch Beschuss von Blättern mittels Schussapparatur (C) und abschließende Analyse des transformierten Blattmaterials durch Fluoreszenzmikroskopie (D).

sen. Dabei werden die auf einen Träger aufgebrachten Goldpartikel durch Heliumdruck beschleunigt und in das Zielgewebe geschossen, welches auf einer Agarplatte platziert ist. Der Beschuss erfolgt unter Vakuum, um Luftwiderstand zu minimieren. Nach der Transformation wurden die Blätter über Nacht im Dunkeln inkubiert und am nächsten Tag durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die transformierten Blätter wurden zunächst mit Hilfe eines Epifluoreszenzmikroskops einer ersten Analyse unterzogen, um den Transformationserfolg zu überprüfen (Daten nicht gezeigt). Diese ergab, dass alle Fusionen erfolgreich transferiert werden konnten. Die eigentlichen Lokalisierungsstudien wurden mit Hilfe der konfokalen Laser-scanning Mikroskopie (*Confocal Laser Scanning Microscopy*, CLSM) durchgeführt.

Die konfokale Laser-scanning Mikroskopie ist eine mikroskopische Technik, die wesentliche Vorteile gegenüber der Epifluoreszenzmikroskopie bietet. Ein Laserstrahl wird durch ein Objektiv fokussiert. Der Fokus des Lasers kann mit Hilfe beweglicher Teile der Optik zeilenweise über den untersuchten Ausschnitt des beobachteten Objektes geführt werden. Ein Photomultiplier (Verstärkerelektronik) setzt die Fluoreszenzintensität in ein elektrisches Signal um. Ein Computer kombiniert die Information über die Position des Laserfokus und die Fluoreszenzintensität zu einem Bild. Die Methode erhöht die axiale und die laterale Schärfe, indem sie Streulicht aus Objektebenen reduziert, die nicht beobachtet werden sollen. Das geschieht einerseits durch eine besser lokalisierte Anregung der Fluoreszenz mit Hilfe eines fokussierten Laserstrahls und andererseits durch das Ausblenden des Streulichts mit Hilfe einer Lochblende. Ein Nachteil dieser Methode liegt u.a. in dem relativ hohen Verlust von Fluoreszenzintensität an der Lochblende. Da die Fluoreszenzsignale des EYFP stark genug waren, konnte dieser Nachteil umgangen werden.

3.2.3.2 *In vivo* Lokalisierung der verkürzten TPP/EYFP-Fusionen

Im Folgenden sind die Transformationsergebnisse der verkürzten EYFP-Fusionen TPP1-AS/EYFP (Abbildung 3.46), TPP2-AS/EYFP (Abbildung 3.47) und TPP3-AS/EYFP (Abbildung 3.48) dargestellt. Dabei wurde das Fluoreszenzbild getrennt nach EYFP-Fluoreszenzemission (nur EYFP-Kanal) und Chlorophyllfluoreszenzemission (Chlorophyll-Kanal) sowie als Mischbild beider Kanäle gezeigt. Die entsprechenden Organellen, die aufgrund von Größe, Form bzw. Chlorophyllgehalt identifiziert wurden, sind entsprechend markiert. Mitochondrien zeichnen sich dabei durch zahlreiche kleine Punkte aus, deren Form allerdings stark variieren kann (von kleinen Punkten bis hin zu bewegungsbedingten Stäbchen, Logan (2006)). Plastiden sind im Normalfall durch ihre Chlorophyllfluoreszenz zu erkennen, können jedoch ebenfalls anhand ihrer Größe und Form identifiziert werden (Nelson et al., 2007).

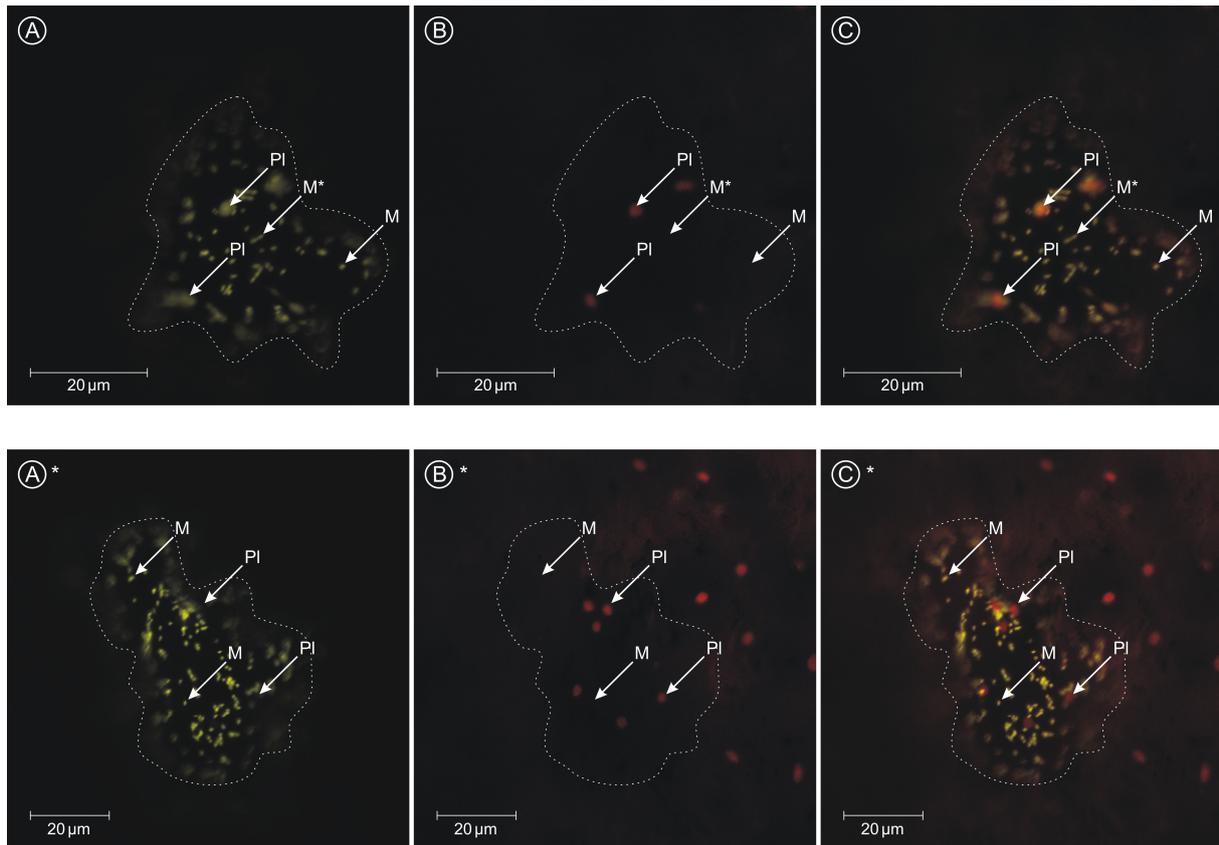


Abb. 3.46: Transiente Expression des TPP1-AS/EYFP. CLSM-Aufnahmen von Blattepidermiszellen aus Erbse nach biolistischer Transformation mit TPP1-AS/EYFP. Separate Darstellung des EYFP-Kanals (**A**), des Chlorophyll-Kanals (**B**) und des Gesamtbilds (Überlagerung beider Kanäle) (**C**). Die mit einem zusätzlichen (*) markierten Bilder (**A***, **B***, **C***) stellen eine zweite Zelle dar, die im Gegensatz zur darüber gezeigten Zelle, keine EYFP-Signale in den Plastiden zeigt. Die transformierte Zelle ist mit einer gepunkteten Linie umrandet. Durch Form und Größe identifizierte Mitochondrien sind mit (**Mt**), stäbchenförmige Mitochondriensignale (aufgrund der z.T. schnellen Bewegung der Mitochondrien) mit (**Mt***) und Plastiden mit (**PI**) bezeichnet. **Bedingungen:** Mikroskop/-software – ZEISS LSM 510, Bildbearbeitung – ZEISS LSM Image Browser.

Die Transformation des TPP1-AS/EYFP (siehe Abbildung 3.46) zeigt eine deutliche Mitochondrienlokalisierung. Betrachtet man die Plastidensignale, zeigt sich ein zweigeteiltes Bild. Es gibt einerseits Zellen (obere Bilder), bei denen am Ort der Chlorophyllfluoreszenz der Plastiden auch ein EYFP Signal detektierbar ist. Andererseits gibt es Zellen bei denen in den Plastiden kein EYFP-Signal auszumachen ist. Die Anzahl der beiden Zellphänotypen, ausgehend von den betrachteten Zellen, ist ähnlich. Daraus kann geschlossen werden, dass die TPP1-AS/EYFP hauptsächlich mitochondrienlokalisiert ist, eine Plastidenlokalisierung jedoch nicht ausgeschlossen werden kann. Warum sich die Zellen bezüglich der Plastidenlokalisierung der TPP1-AS/EYFP so unterscheiden, ist unklar.

Im Fall der TPP2-AS/EYFP (Abbildung 3.47) sind sowohl in den Mitochondrien, als auch in den Plastiden EYFP-Signale erkennbar. Dabei sind im Gegensatz zu TPP1-AS/EYFP die Signale in den Mitochondrien etwas schwächer, die in den Plastiden jedoch intensiver.

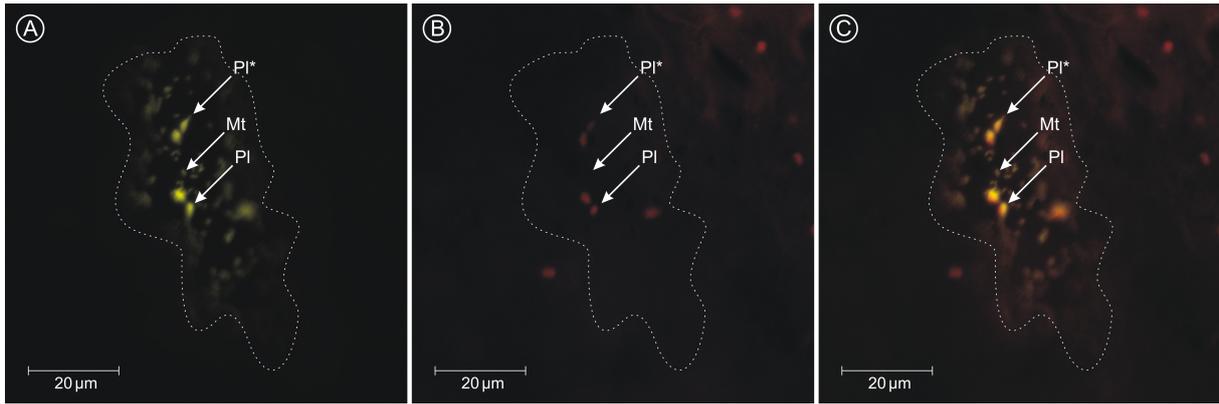


Abb. 3.47: Transiente Expression des TPP2-AS/EYFP. CLSM-Aufnahmen von Blattepidermiszellen aus Erbse nach biolistischer Transformation mit TPP2-AS/EYFP. Separate Darstellung des EYFP-Kanals (A), des Chlorophyll-Kanals (B) und des Gesamtbilds (Überlagerung beider Kanäle) (C). Die transformierte Zelle ist mit einer gepunkteten Linie umrandet. Durch Form und Größe identifizierte Mitochondrien sind mit (Mt), Plastiden mit (PI) und Plastiden mit Stromulus mit (PI*) bezeichnet. **Bedingungen:** Mikroskop/-software – ZEISS LSM 510, Bildbearbeitung – ZEISS LSM Image Browser.

Bei einem der Plastiden (PI*) ist im EYFP-Fluoreszenzbild ein Stromulus (stromagefüllte Ausstülpung des Plastiden) zu erkennen, was auf eine stromale Lokalisierung der EYFP-Fusion innerhalb der Plastiden hinweist. Die Gesamtheit der Daten lässt sich als duale Lokalisierung der TPP2-AS/EYFP interpretieren.

Die TPP3-AS/EYFP (Abbildung 3.48) zeigt, im Gegensatz zu den anderen beiden EYFP-Fusionen, ein eindeutigeres Bild. Die EYFP-Fluoreszenz des Konstrukts ist nur im Stroma der Plastiden erkennbar. EYFP-Fluoreszenz, die auf Mitochondrien oder andere Lokalisierungen hinweisen würde, ist nicht auszumachen.

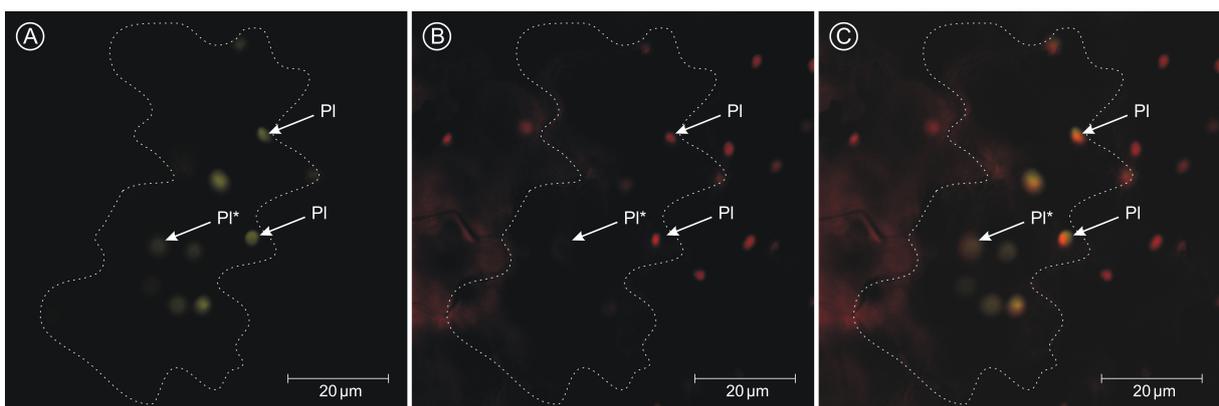


Abb. 3.48: Transiente Expression des TPP3-AS/EYFP. CLSM-Aufnahmen von Blattepidermiszellen aus Erbse nach biolistischer Transformation mit TPP3-AS/EYFP. Separate Darstellung des EYFP-Kanals (A), des Chlorophyll-Kanals (B) und des Gesamtbilds (Überlagerung beider Kanäle) (C). Die transformierte Zelle ist mit einer gepunkteten Linie umrandet. Durch Form und Größe identifizierte Plastiden in der Fokusebene sind mit (PI) und außerhalb der Fokusebene mit (PI*) bezeichnet. **Bedingungen:** Mikroskop/-software – ZEISS LSM 510, Bildbearbeitung – ZEISS LSM Image Browser.

Aus den CLSM-Daten kann gefolgert werden, dass die TPP1-AS/EYFP weitestgehend mitochondrienlokalisiert ist, wenn auch in einem Teil der Zellen, eine plastidäre Lokalisierung des TPP1-AS/EYFP zu sehen war. Die TPP2-AS/EYFP zeigt eine Lokalisierung in Mitochondrien und Plastiden, während die TPP3-AS/EYFP im Gegensatz zu den anderen Konstrukten nur im Stroma der Plastiden zu finden ist. Die Lokalisierung der verkürzten TPP3-Fusion im Stroma ist im Vergleich zur Lokalisierung des authentischen Proteins (vgl. Abbildung 3.42, S. 74) in der Thylakoidmembran damit zu begründen, dass der vollständige reife Teil des Proteins (inkl. potentiellen Membranankers) nicht Bestandteil der ersten 100 Aminosäurereste ist.

3.2.3.3 *In organello* Analysen der verkürzten TPP/EYFP-Fusionen

Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen der *in vitro* Importe der authentischen TPP (vgl. Abbildung 3.41, S. 72), so weichen die gezeigten *in vivo* Ergebnisse im Fall der TPP1 und TPP2 von diesen ab (die authentischen TPP1 und TPP2 zeigten dort eine ausschließliche Mitochondrienlokalisierung). Aus diesem Grund wurden die verkürzten TPP/EYFP-Fusionen ebenfalls *in vitro* getestet. Dazu wurden sie, wie die authentischen TPP, *in organello* in isolierte Erbsenmitochondrien und -chloroplasten importiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.49 dargestellt.

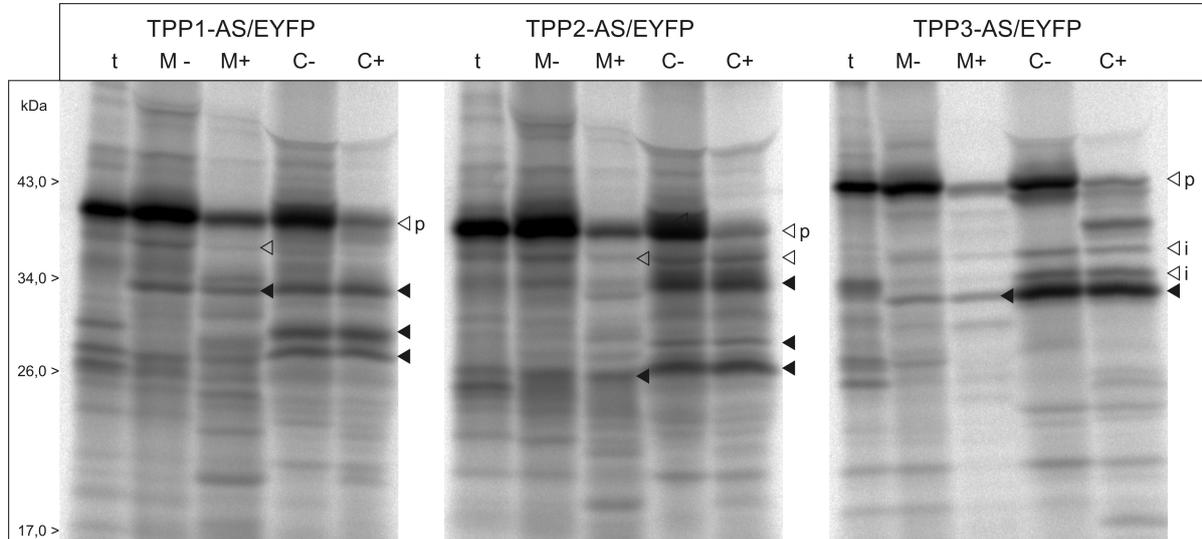


Abb. 3.49: *In organello* Import der TPP-AS/EYFP-Fusionen in Chloroplasten und Mitochondrien. Die Abbildung zeigt das Ergebnis des *in organello* Imports von TPP1-, TPP2- und TPP3-AS/EYFP in isolierte Erbsenchloroplasten und -mitochondrien nach SDS-PAGE und Autoradiographie. Die Translation ist mit (t), die Mitochondrienfraktionen mit (M) und Chloroplastenfraktionen mit (C) bezeichnet, wobei die unbehandelten Organellen mit (-) und die proteasebehandelten mit (+) gekennzeichnet sind. Die Vorläuferproteine sind mit (p), stromale Prozessierungsintermediate mit (i), importierte und mögliche reife Proteine mit einer schwarzen Pfeilspitze und Signale, die auf die Translation zurückgehen, mit einer weißen Pfeilspitze markiert. **Bedingungen:** siehe Legende zu Abbildung 3.41 (S. 72).

Die TPP1-AS/EYFP zeigt ein Importsignal in den Mitochondrien bei ca. 34 kDa. Ein weiteres Signal im Bereich von 36–38 kDa geht auf ein Signal zurück, welches in der Translation zu sehen ist. Dieses Signal ist in den Organellfraktionen stärker, da im Vergleich zur aufgetragenen Translation, in den Importansätzen mehr Translation verwendet wurde (siehe Signalstärke des Vorläuferproteins). In den Chloroplasten sind drei Importsignale bei ca. 27, 28 und 34 kDa detektierbar. Vergleicht man die Intensitäten der Importsignale miteinander, so ist zu erkennen, dass die Signale in den Chloroplasten stärker sind als in den Mitochondrien.

Die TPP2-AS/EYFP zeigt ein schwaches Importsignal in den Mitochondrien bei ca. 26–27 kDa. In den Chloroplasten sind Importsignale bei ca. 28, 29 und 34 kDa zu sehen und entsprechen damit den Signalen, wie sie im Fall der TPP1-AS/EYFP bereits zu erkennen waren. Die Größe des untersten Signals bei ca. 26–27 kDa entspricht dabei dem des reifen EYFP. Vergleicht man wiederum die Intensitäten, so ist auch hier das Chloroplastensignal deutlich intensiver als das Mitochondriensignal. Im Vergleich zur TPP1-AS/EYFP ist das Mitochondriensignal bei der TPP2-Variante schwächer und das Chloroplastensignal stärker.

Die TPP3-AS/EYFP zeigt in den Mitochondrien ein sehr schwaches Signal im Bereich von 32 kDa. In den Chloroplasten dagegen ein dominantes Importsignal bei 32 kDa und zwei schwache Signale bei 33 und 35 kDa. Diese Signale entsprechen den Prozessierungsintermediaten, wie sie schon bei der authentischen TPP3 zu sehen waren.

Fasst man diese Ergebnisse zusammen, so wird die TPP1-AS/EYFP und TPP2-AS/EYFP sowohl in Mitochondrien und Chloroplasten importiert, wobei in beiden Fällen das Mitochondriensignal schwächer ist als das Chloroplastenimportsignal. Der Unterschied ist bei der TPP1-Variante kleiner als bei TPP2-Fusion. Die TPP3-AS/EYFP wird fast ausschließlich in die Chloroplasten importiert und zeigt Prozessierungsintermediate, wie sie bereits bei der authentischen TPP3 zu sehen waren. Vergleicht man diese Ergebnisse zunächst mit den *in vivo* Ergebnissen (vgl. vorherigen Abschnitt), so stimmen die Ergebnisse qualitativ überein. TPP1- und TPP2-AS/EYFP zeigen sowohl eine mitochondrielle als auch plastidäre Lokalisierung, während die TPP3-AS/EYFP ausschließlich plastidenlokalisiert ist. Allerdings widersprechen diese Daten, im Fall der TPP1 und TPP2 den Importdaten der authentischen Substrate (vgl. Abbildung 3.41, S. 72). Sowohl die authentische TPP1 als auch die TPP2, wurden in diesen Fällen ausschließlich in Mitochondrien importiert. Nur die TPP3-Daten stimmen in beiden Experimenten weitestgehend überein. Demnach hat im Fall der TPP1 und TPP2 möglicherweise der reife bzw. C-terminale Teil (Aminosäurerest 100+) des Proteins einen Einfluss auf die Sortierung.

3.2.3.4 *In vivo* Lokalisierung der Volllängen-TPP/EYFP-Fusionen

Aufgrund des Vergleichs der Ergebnisse der authentischen Substrate mit denen der verkürzten EYFP-Fusionen und dem möglichen Einfluss des reifen/C-terminalen Teils der TPP sollten nun die Volllängen-Konstrukte in diesen Vergleich einbezogen werden. Da sich diese allerdings *in vitro* nicht reproduzierbar importieren ließen, sollen nur die *in vivo* Daten in den Vergleich einbezogen werden.

Analog zu den TPP-AS/EYFP-Fusionen wurden ebenfalls Erbsenblätter mit den Volllängen-Konstrukten transient transformiert. Aufgrund des Fehlens der TPP2/EYFP-Fusion, sind die Ergebnisse dieses Experiments nur für TPP1/EYFP (Abbildung 3.50) und für TPP3/EYFP (Abbildung 3.51) gezeigt. Beim Betrachten der Bilder der TPP1/EYFP fällt zunächst auf, dass das EYFP-Signal deutlich schwächer ist, als bei den verkürzten EYFP-Fusionen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Expressionsrate dieser Volllängenkonstrukte in der Zelle geringer ist. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass der Import in geringerem Umfang erfolgt, allerdings müssten dann im Cytosol verstärkt Signale zu sehen sein, was nicht der Fall ist. Die Signale selbst zeigen allerdings, dass das TPP1/EYFP wie schon das verkürzte TPP1-AS/EYFP-Konstrukt eine Lokalisierung sowohl in Mitochondrien als auch in Plastiden zeigt. Die Signale im Bereich der Plastiden im EYFP- und Chlorophyllfluoreszenzbild sind nicht immer identisch. Dies ist damit zu begründen, dass zwischen den einzelnen Scanvorgängen (jedes Kanals) eine Zeitspanne von ca. 30 Sekunden liegt. In diesem Zeitraum können sich die Plastiden bewegen.

Die TPP3/EYFP zeigt wieder ein eindeutiges Bild. Es sind nur Signale im Bereich der Plastiden detektierbar. EYFP-Fluoreszenz, die auf eine davon abweichende Lokalisierung

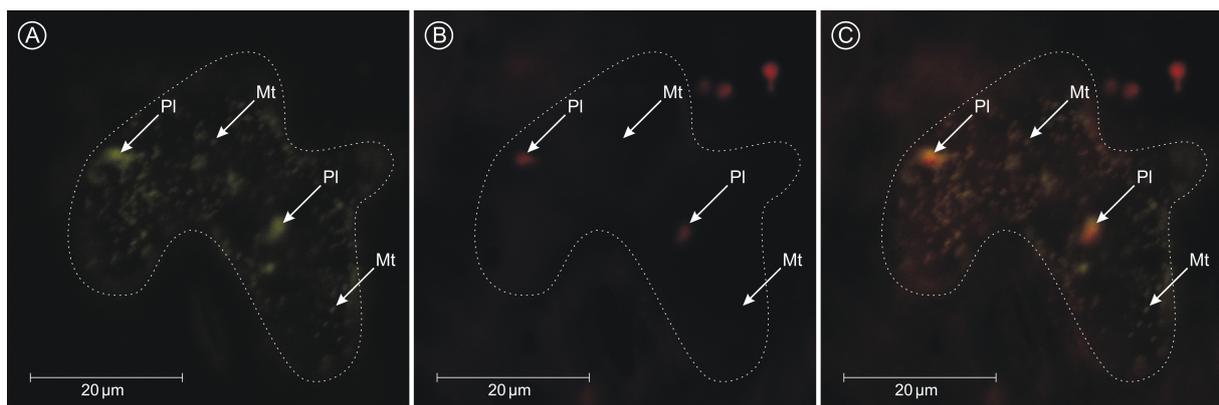


Abb. 3.50: Transiente Expression der TPP1/EYFP. CLSM-Aufnahmen von Blattepidermiszellen aus Erbse nach biolistischer Transformation mit TPP1/EYFP. Separate Darstellung des EYFP-Kanals (A), des Chlorophyll-Kanals (B) und des Gesamtbilds (Überlagerung beider Kanäle) (C). Die transformierte Zelle ist mit einer gepunkteten Linie umrandet. Durch Form und Größe identifizierte Mitochondrien sind mit (Mt) und Plastiden mit (PI) bezeichnet. **Bedingungen:** Mikroskop/-software – ZEISS LSM 510, Bildbearbeitung – ZEISS LSM Image Browser.

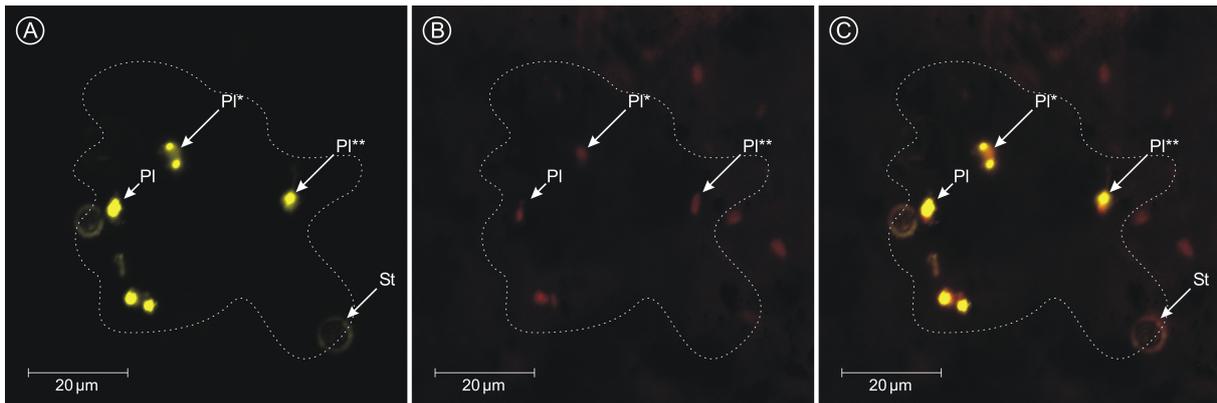


Abb. 3.51: Transiente Expression des TPP3/EYFP. CLSM-Aufnahmen von Blattepidermiszellen aus Erbse nach biolistischer Transformation mit TPP3/EYFP. Separate Darstellung des EYFP-Kanals (A), des Chlorophyll-Kanals (B) und des Gesamtbilds (Überlagerung beider Kanäle) (C). Die transformierte Zelle ist mit einer gepunkteten Linie umrandet. Durch Form und Größe identifizierte Plastiden sind mit (PI) bezeichnet. (St) sind Signalartefakte, die durch starke EYFP Signale von Plastiden erzeugt werden, die sich außerhalb der Fokusebene befinden. Plastiden mit einer inhomogenen Verteilung des EYFP-Signals sind mit P* und sich bewegende Plastiden (abweichendes Chlorophyll- und EYFP-Signal) mit P** gekennzeichnet. **Bedingungen:** Mikroskop/-software – ZEISS LSM 510, Bildbearbeitung – ZEISS LSM Image Browser.

hinweisen könnte ist nicht messbar. Im Vergleich zur TPP1/EYFP sind die detektierbaren EYFP-Signale des TPP3/EYFP-Konstrukts deutlich stärker. Bei der Betrachtung der EYFP-Signale im Bereich der Plastiden fällt auf, dass sich das EYFP-Signal nicht immer gleichmäßig über den gesamten Bereich der Plastide verteilt wie bei der verkürzten EYFP-Fusion, sondern sich teilweise punktuell aufkonzentriert. Dies könnte zum einen für eine Sublokalisierung innerhalb der Plastiden sprechen, andererseits kann diese lokale Aufkonzentrierung auch als Präzipitationseffekt interpretiert werden.

Fasst man die Daten der *in vivo* Versuche zu TPP1/EYFP und TPP3/EYFP zusammen, zeigt die TPP1/EYFP eine duale Lokalisierung, auch wenn die EYFP-Signalstärke dabei sehr schwach ist. Die TPP3/EYFP zeigt eine eindeutige Plastidenlokalisierung, wobei das EYFP-Signal teilweise eine inhomogene Verteilung innerhalb der Plastiden zeigt.

3.2.4 Zusammenfassung der *in vitro* und *in vivo* Experimente der TPP-Varianten und deren EYFP-Fusionen

Aufgrund der Vielzahl an unterschiedlichen Ergebnissen, sollen diese abschließend zusammengefasst werden. Dazu wurden alle *in vitro* und *in vivo* Versuche, sowohl für die authentischen TPP als auch für die verkürzten und Vollängen-EYFP-Fusionen in der folgenden Tabelle 3.4 dargestellt. Lokalisierungen, die sehr schwach bzw. nicht eindeutig festzustellen waren, sind in Klammern gesetzt. Die TPP1 und TPP2 werden als authentische Proteine *in vitro* in Mitochondrien transportiert. Die verkürzten EYFP-Fusionen zeigen im Gegensatz dazu sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ein eher duales Verhalten (im

Tab. 3.4: Zusammenfassung zur subzellulären Lokalisierung der TPP. Die Tabelle zeigt die Zusammenfassung der Lokalisierungsvorhersagen und -experimente von TPP1, TPP2 und TPP3. Die entsprechenden Lokalisierungen sind mit **(M)** für Mitochondrien, **(P)** für Chloroplasten/Plastiden und **(T)** für Thylakoide angegeben. Nicht auszuschließende Lokalisierungen sind durch **Klammern** gekennzeichnet.

	<i>in silico</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
TPP1	M, (P)	M	–
TPP2	M, P	M	–
TPP3	P	T	–
TPP1-AS/EYFP	–	M, P	M, P
TPP2-AS/EYFP	–	M, P	M, P
TPP3-AS/EYFP	–	P, (M)	P
TPP1/EYFP	–	–	M, P
TPP3/EYFP	–	–	P

Fall der TPP1 auch das Volllängen-EYFP-Konstrukt). Die TPP3 dagegen zeigt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ein konstantes Bild. Die authentische TPP3 wird in Chloroplasten importiert und kann dabei in den Thylakoiden nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 3.42, S. 74). Die verkürzten Fusionen werden *in vitro* und *in vivo* in die Plastiden importiert. Aufgrund des Fehlens des reifen Teils (katalytische Domäne) findet keine weitere Sublokalisierung statt. Die Volllängen-Variante TPP3/EYFP wird ebenfalls *in vivo* in die Plastiden transportiert und zeigt dort in manchen Fällen eine inhomogene Verteilung des EYFP-Signals.

4 Diskussion

4.1 Verhalten gefalteter und ungefalteter Tat-Substrate beim Thylakoidtransport

Das Ziel des ersten Teils der Arbeit war die Charakterisierung des Einflusses des Faltungszustands der Substrate auf den $\Delta\text{pH}/\text{Tat}$ -abhängigen Transport durch Verwendung chimärer EGFP-Substrate im gefalteten und ungefalteten Zustand. Der Schwerpunkt sollte dabei auf dem Vergleich des Transport-/Bindungsverhaltens der gefalteten und ungefalteten Substrate liegen.

Bisherige Untersuchungen überprüften den Transport gefalteter Substrate über verschiedene experimentelle Ansätze. So konnten [Clark & Theg \(1997\)](#) zeigen, dass ein durch Crosslinking erzeugter Komplex aus dem 16 kDa-Protein des Wasserspaltungsapparates und dem gefalteten Rinderpankreasinhibitor über den Tat-Weg transportiert wird. Ein anderer Ansatz wurde von [Hynds et al. \(1998\)](#) gewählt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Dihydrofolatreduktase (DHFR) sowohl gefaltet als auch ungefaltet über die Thylakoidmembran transportiert wird, wenn das DHFR mit dem Transitpeptid des 23 kDa-Proteins fusioniert wurde. Andere experimentelle Ansätze unter Verwendung von Cofaktor-haltigen Substraten, bei denen der Einbau des Cofaktors und die damit verbundene Faltung Voraussetzung für den Transport ist, sind von [Santini et al. \(1998\)](#) und [Halbig et al. \(1999b\)](#) gezeigt. Eine weitere Variante ist der Transport von GFP-Fusionen *in vivo* ([Thomas et al., 2001](#); [Santini et al., 2001](#); [Barrett et al., 2003](#); [Marques et al., 2004](#)). In Bakterien wird davon ausgegangen, dass die Oxidation, die nach der Zyklisierung des GFP-Chromophors zur Fluoreszenz führt, nur im Cytosol stattfinden kann ([Heim et al., 1994](#); [Santini et al., 2001](#)). In Pflanzen konnte [Marques et al. \(2003\)](#) zunächst *in vitro* zeigen, dass Fusionsproteine aus den Signalpeptiden des 16 kDa- und 23 kDa-Proteins und dem EGFP über den $\Delta\text{pH}/\text{Tat}$ -abhängigen Weg transportiert werden. Diese Beobachtungen konnten anschließend *in vivo* mit Hilfe stabiler transgener *Arabidopsis thaliana*-Linien bestätigt werden ([Marques et al., 2004](#)). Allerdings wäre durchaus denkbar, dass das EGFP ungefaltet transportiert wird und erst im Anschluss an den Transport faltet und die EGFP-typische Fluoreszenz zeigt. Gegen diesen Fall sprechen Ergebnisse von [Feilmeier et al. \(2000\)](#), die zeigen, dass GFP-Fusionen, wenn sie über den Sec-abhängigen Weg transportiert werden,

keine Fluoreszenz zeigen und die Substrate nach dem Transport proteolytisch abbaubar sind.

Die zuvor beschriebenen Methoden schließen indirekt auf den Faltungszustand des Substrats. Der direkte Einfluss von gefalteten und ungefalteten Substraten auf den Transport wurde bisher nicht untersucht. Aufgrund der *in vivo* Untersuchungen von Marques et al. (2004) zum Transport des gefalteten 16/EGFP über den $\Delta\text{pH}/\text{Tat}$ -abhängigen Weg, sollten neben dem 16/EGFP ein weiteres chimäres EGFP-Substrat konstruiert werden (das Stromaintermediat i16/EGFP), um den Einfluss gefalteter und ungefalteter Substrate auf den $\Delta\text{pH}/\text{Tat}$ -abhängigen Transport genauer zu analysieren. Beide Substrate sollten heterolog überexprimiert und gereinigt werden. Es musste ein Protokoll entwickelt werden, das es ermöglicht, sowohl die Reinheit als auch den Faltungsgrad der Substrate eindeutig kontrollieren zu können. Damit kann eine klare Unterscheidung zwischen dem gefalteten und ungefalteten Zustand getroffen und deren Einfluss durch Konkurrenzexperimente analysiert werden. Weiterhin wurden Untersuchungen zur Struktur des Transitpeptids/Signalpeptids durchgeführt. Dazu wurde die Interaktion der Substrate mit hydrophoben Grenzschichten wie z.B. thylakoidähnlichen Monolipidschichten untersucht.

4.1.1 Die chimären EGFP-Substrate 16/EGFP und i16/EGFP werden *in vitro* über den $\Delta\text{pH}/\text{Tat}$ -Weg transportiert und zeigen ein Translokationsintermediat

Als chimäre Substrate wurden das 16/EGFP und das i16/EGFP verwendet (vgl. Abbildung 3.4, S.27). Dabei entspricht das 16/EGFP dem vollständigen Vorläuferprotein, wie es *in vivo* im Cytosol translatiert werden würde. Das i16/EGFP entspricht dem Stromaintermediat, welches entsteht, wenn das 16/EGFP nach dem Transport ins Stroma von der stromalen Prozessierungspeptidase (SPP) prozessiert wird. Der $\Delta\text{pH}/\text{Tat}$ -abhängige Transport des Vorläuferproteins 16/EGFP wurde bereits *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen (Marques et al., 2003, 2004).

Wie in Abbildung 3.5, S. 28 gezeigt, wird auch das i16/EGFP, ebenso wie das 16/EGFP und das 23/23 *in thylakoido* über den $\Delta\text{pH}/\text{Tat}$ -abhängigen Weg transportiert. Dabei ist sowohl beim 16/EGFP als auch beim i16/EGFP in den thermolysinbehandelten Thylakoiden ein Degradationsprodukt zu erkennen. Im Fall des 16/EGFP handelt es sich um eine Doppelbande, bei der das kleinere Fragment etwas intensiver erscheint als das darüber liegende Signal. Dieses Signal war zwar sehr schwach, aber reproduzierbar. Bei diesen Degradationsprodukten könnte es sich jeweils um ein Translokationsintermediat handeln, wie es als Ti-2 für das 16/23 gezeigt werden konnte (Berghöfer & Klösgen, 1999; Hou et al., 2006; Frielingsdorf & Klösgen, 2007). Dieses Intermediat entsteht, wenn das Substrat be-

reits transportiert wurde, jedoch noch unprozessiert mit der Translokase verbunden ist oder ebenfalls unprozessiert in der Membran verankert vorliegt. In beiden Fällen ist in diesem Zustand noch ein Teil des N-Terminus des Substrats stromaexponiert (vgl. Abbildung 3.25, S. 52). Werden die Thylakoide nun mit Thermolysin behandelt, wird dieser stromaexponierte Teil abgebaut und es entsteht ein verkürztes Produkt, welches kleiner ist als der Vorläufer, aber größer als das reife TPP-prozessierte Protein. Dieses Intermediat ist beim 16/EGFP schwächer ausgeprägt als beim i16/EGFP, was auf die geringere Signalstärke des Translationsprodukts zurückzuführen ist. Für das 16/23 wurde von Hou et al. (2006) bereits eine Thermolysinschnittstelle postuliert, die das Ti-2 verursacht. Die daraus resultierenden Größen dieser theoretischen Ti-2 Intermediate stimmen mit der Größendifferenz zwischen den Banden der Abbildung 3.5, S. 28 überein. Daraus lässt sich schließen, dass beim *in thylakoido* Import sowohl das 16/EGFP als auch das i16/EGFP ein ähnliches Transportverhalten zeigen wie das 16/23.

Das Auftreten des Ti-2 lässt sich möglicherweise damit begründen, dass die Struktur der EGFP-Substrate sterisch die Bindung der TPP behindert, die Substrate dadurch ineffizienter prozessiert werden und so länger in der Translokase bzw. in der Membran verweilen. Viel wahrscheinlicher ist eine andere Ursache. Legt man die Ergebnisse von Frielingsdorf & Klösgen (2007) zugrunde, ist davon auszugehen, dass die Hydrophobizität in der direkten Umgebung der Schnittstelle der TPP die Ursache für die Bildung des Ti-2 ist. Hydrophobizitätsvergleiche der Schnittstellenumgebung des 16/EGFP bzw. i16/EGFP (ersten zehn Aminosäuren, C- und N-terminal, relativ zur TPP-Schnittstelle; Daten nicht gezeigt) zeigen im Vergleich zum 16/23, trotz des Linkers, für das 16/EGFP bzw. i16/EGFP einen nahezu identischen Verlauf, was das Auftreten des Ti-2 Zustandes erklärt.

Ein vergleichbares Intermediat, was dem Ti-1 beim 16/23 entsprechen würde, konnte jedoch bei keinem der beiden Substrate detektiert werden. Dies liegt vermutlich an der Dauer des Imports, da nach 20 min Import auch beim 16/23 kaum noch ein Ti-1 detektierbar ist.

4.1.2 Expressionsverhalten der EGFP-Chimäre

Wie in Abbildung 3.7, S. 30 zu sehen, wurden das 16/EGFP, i16/EGFP sowie das EGFP erfolgreich exprimiert. Allerdings gab es einige Unterschiede, die an dieser Stelle diskutiert werden sollen. Vergleicht man die Expressionsraten miteinander, so besitzt das 16/EGFP die höchste Expressionsrate. Dies könnte zum einen auf die verwendeten Expressionsstämme zurückzuführen sein, da beim 16/EGFP ein normaler BL21(DE3)-Stamm verwendet wurde und beim i16/EGFP und EGFP ein Rosetta(DE3)pLysS-Stamm (vgl. 5.1.12, S. 115). Zum anderen könnte auch das exprimierte Protein selbst das unterschiedliche Expressionsverhalten verursachen.

Betrachtet man, unabhängig davon, die Subfraktionen bezüglich des Gehalts an exprimiertem Protein, so ist zu erkennen, dass sich bei allen Varianten der größere Teil des exprimierten Proteins in den *inclusion bodies* befindet. Beim 16/EGFP und i16/EGFP befindet sich ein geringerer Teil der Substrate in der Periplasmafraktion, beim EGFP jedoch nicht. Daraus könnte gefolgert werden, dass die 16/EGFP- und i16/EGFP-Proteinbanden im Periplasma die Folge des Transports der exprimierten Substrate über das *E. coli*-Tat-System sind. Für einen solchen Transport spricht, dass das pflanzliche Tat-System in der Lage ist, auch bakterielle Signalpeptide zu erkennen (Mori & Cline, 1998; Wexler et al., 1998; Halbig et al., 1999a) und demzufolge davon ausgegangen werden kann, dass auch im umgekehrten Fall das bakterielle Tat-System die pflanzlichen Transportsignale erkennt. Gegen einen Transport spricht allerdings die Beobachtung, dass die periplasmatisch lokalisierten Substrate nicht von der Leaderpeptidase prozessiert werden. Dieses Ergebnis könnte einerseits damit erklärt werden, dass im Fall des 16/EGFP und i16/EGFP, die bakterielle Leaderpeptidase das pflanzliche Prozessierungssignal nicht erkennt. Allerdings konnten Halpin et al. (1989) zeigen, dass die Thylakoidprozessierungspeptidase und die Leaderpeptidase identische Substratspezifitäten besitzen. Andererseits könnte es sich bei den Proteinbanden des 16/EGFP und i16/EGFP im Periplasma auch um präparationsbedingte Artefakte handeln. Wenn allerdings ein solches Artefakt als Ursache angenommen wird, müsste ein vergleichbares Signal auch im Fall des EGFP in einer solchen Fraktion zu sehen sein, was jedoch nicht der Fall ist. Dementsprechend kann aus den vorliegenden Ergebnissen keine eindeutige Aussage über die periplasmatischen Expressionssignale getroffen werden.

Da weder beim 16/EGFP noch beim i16/EGFP in der Periplasmafraktion eine EGFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden konnte und dementsprechend kein gefaltetes Substrat in diesen Fraktionen vorkommt, wurden diese Fraktionen nicht zur Substratgewinnung verwendet. Außerdem sind die Mengen im Vergleich zu den *inclusion bodies* nahezu vernachlässigbar.

Ein ganz anderes Bild zeigt sich dagegen beim EGFP. Hier war eine deutliche EGFP-Fluoreszenz in der cytosolischen Fraktion messbar. Auch die Menge an Substrat in dieser Fraktion war deutlich höher. Dies ermöglichte eine effiziente Reinigung des bereits gefalteten EGFP aus dem Cytosol. Auf eine Rückfaltung, wie sie später für das 16/EGFP und i16/EGFP durchgeführt wurde, konnte verzichtet werden.

4.1.3 Reinigung der *inclusion bodies* – ein wichtiger Schritt bei der denaturierenden Präparation von Proteinen

Reinigt man Proteine aus *inclusion bodies*, ist die in dieser Arbeit verwendete Reinigungsmethode der *inclusion bodies* zu empfehlen. Abbildung 3.8, S. 32 zeigt den Vergleich induzierter Zellen, ungereinigter und gereinigter *inclusion bodies*. Man erkennt deutlich

wie die Verunreinigungen verringert und das Produkt angereichert werden konnte. Außerdem wird bei der Reinigung DNA abgebaut und Membranen sowie membranassoziierte Proteine werden durch das verwendete Triton X-100 entfernt. Gerade der zuletzt genannte Effekt ist von besonderer Bedeutung, da es bei der Expression von Tat-Substraten in *E.coli* wichtig ist, die in den „Roh“-*inclusion bodies* enthaltenen Membranen zu entfernen, da diese membranständige Proteasen enthalten, die später zu einer unerwünschten Degradation der Substrate führen könnten.

4.1.4 Faltung und Faltungsgrad der exprimierten und *in vitro* translatierten EGFP-Substrate

Bei der Rückfaltung der aus den *inclusion bodies* gereinigten Substrate fiel auf, dass diese eine lange Zeit zum Falten benötigen. Die normale GFP-Faltung dauert ca. 1–2 h, die Faltung der EGFP-Substrate hingegen zwischen 12–24 h. Dies lässt auf einen erheblichen Einfluss des Transit-/Signalpeptids auf die Faltung schließen. Einerseits könnten die Transportsignale die Faltung sterisch behindern, andererseits ist ein Einfluss der Hydrophobizität der Transit-/Signalpeptide als mögliche Ursache in Betracht zu ziehen. Ein Hinweis für den Einfluss der Hydrophobizität ist der Umstand, dass ein großer Teil des Proteins bei der Rückfaltung bereits ungefalted ausfällt.

Nachdem die Substrate erfolgreich gefaltet und bis zu einem Reinheitsgrad von über 98% gereinigt werden konnten (siehe Abbildung 3.10, S. 35; 3.11, S. 36), wurde der Faltungsgrad anhand des Laufverhaltens im Polyacrylamidgel (PAA-Gel) bestimmt. Eine direkte Bestimmung des Faltungsgrads über die Fluoreszenz des EGFP allein ist nicht möglich, da der Anteil an ungefaltedem EGFP durch die Fluoreszenz nicht erfasst wird. Theoretisch wäre ein Vergleich der Chromophorabsorption bei 488 nm (entspricht dem Zustand des Chromophors im vollständig gefalteten EGFP) relativ zur Proteinabsorption bei 280 nm möglich, was für ein vollständig gefaltetes EGFP ein definiertes Verhältnis ergeben würde. Dieses Verhältnis müsste mindestens einmal bestimmt werden und das setzt das Vorhandensein von vollständig gefaltedem Protein voraus. Damit bleibt nur noch die Bestimmung des Faltungsgrads über das Laufverhalten im PAA-Gel (vgl. Abbildung 3.12, S. 37).

Die gereinigten und gefalteten EGFP-Substrate wiesen einen Reinheitsgrad von über 98% auf. Bemerkenswert ist, dass die *in vitro* translatierten Substrate ebenfalls zu ca. 70% gefaltet vorliegen. Ursache dafür sind vermutlich im Retikulocytenlysat (Retic) vorhandene Chaperone, die eine Faltung unterstützen. An dieser Stelle sei erwähnt, dass die Translation 90 min dauert und nach dieser Zeit bereits 70% Faltung erreicht wurde (im Vergleich zu mehr als 12 h bei der Rückfaltung der exprimierten Substrate). Dass die Retic-translatierten Proteine gefaltet vorliegen war zu erwarten, da bereits von Della-Cioppa

et al. (1986) gezeigt werden konnte, dass Retic-translatierte Proteine nicht nur gefaltet vorliegen, sondern auch Aktivität zeigen.

Beim Vergleich der Fraktionen der Ionenaustauschchromatographie (IEX, siehe Abbildung 3.10, S. 35) fiel auf, dass mit fortschreitender Elution der Anteil an ungefaltetem Substrat steigt. Betrachtet man dabei das Elutionsprofil genauer, erkennt man, dass das EGFP-Absorptionssignal (488 nm) stärker abfällt als das Proteinabsorptionssignal (280 nm) und später sogar unterschreitet. Dies korreliert mit der Beobachtung des zunehmenden Anteils an ungefaltetem Substrat. Vergleiche mit andern IEX-Matrizes zeigten, dass dieser Effekt nur bei den verwendeten MonoQ[®] /MiniQ[®]-Säulen auftrat. Bei HiTrap[®]-Säulen bzw. vergleichbaren Säulenmaterialien konnte dieser Trenneffekt zwischen gefaltetem und ungefaltetem Substrat nicht beobachtet werden. Da bei beiden Säulenarten vergleichbare funktionelle Seitenketten den Ionenaustauscheffekt erzeugen, muss gefolgert werden, dass die Trennung von gefalteten und ungefalteten Substrat von einem Grundmatrixbedingten Effekt verursacht wird. HiTrap[®]-Säulen besitzen Sepharose als Grundmatrix, die MonoQ[®]- und MiniQ[®]-Säulen dagegen Polystyrene/divinyl-benzen-Partikel. Vermutlich besitzen diese beiden Matrixsubstanzen unterschiedliche Eigenschaften, wie z.B. Porengröße und Packungsdichte, die einen unterschiedlichen Effekt bezüglich der Interaktion mit gefalteten/ungefalteten Proteinen auslösen.

4.1.5 Stabilitätsprobleme der EGFP-Substrate

Im Laufe der Präparation und Reinigung mussten zwei erhebliche Probleme bezüglich der Stabilität der Substrate gelöst werden. Sowohl das 16/EGFP als auch das i16/EGFP zeigten eine starke Tendenz in wässrigen Puffern auszufallen (vgl. Abbildung 3.13, S. 38). Dabei fallen die Substrate mit vollständig gefaltetem EGFP-Teil aus (grüne Färbung). Dieser Effekt ist bei Raumtemperatur stärker als bei niedrigen Temperaturen (4°C). Die EGFP-Referenz (Daten nicht gezeigt) zeigte selbst nach mehrmonatiger Lagerung keine Präzipitation. Dieser Unterschied ist bei hydrophoben Wechselwirkungen der Transit-/Signalpeptide untereinander zu erwarten, da sich diese Wechselwirkungen mit steigender Temperatur und Konzentration verstärken, womit die Hydrophobizität des Transit-/Signalpeptids als Ursache für die Präzipitation anzunehmen ist. Tests mit verschiedenen Salzkonzentrationen zeigten jedoch, dass beide EGFP-Substrate in Anwesenheit von 500 mM NaCl nicht mehr ausfallen. Aus diesem Grund wurden die Substrate zunächst bei 4°C und unter genannter Salzkonzentration gelagert.

Nachdem die Lösung dieses ersten Problems gefunden wurde, zeigte sich ein weiteres Problem. Die zuvor gereinigten Produkte degradierten über die Zeit stufenweise bis hin zum reifen EGFP. Besonders deutlich wurde dies bei einem Langzeitvergleich (siehe Abbildung 3.14, S. 39). Ein chemischer Abbau kann weitestgehend ausgeschlossen werden, da eine

nicht-enzymatische Hydrolyse von Peptidbindungen in 8 M HCl und 100°C durchgeführt wird. Das Ausbleiben einer Degradation bei einer Lagerung unter 3 M Harnstoff ist ein Indiz für einen proteolytischen Abbau. Ein solcher proteasebedingter Einfluss ist nicht auszuschließen, da bei der Reinigung nur EDTA als Proteaseinhibitor zugegeben und auf andere Inhibitoren verzichtet wurde, um einen Einfluss bei den späteren Importreaktionen auszuschließen. Da dieser proteolytische Abbau erst nach einem längeren Zeitraum (ca. 4 Wochen) zu erkennen ist, wurden die Proben entweder frisch gereinigt oder in Teilen bei -80°C gelagert und bei Bedarf aufgetaut. Die aufgetauten Proben unterschieden sich dabei im Faltungsgrad nicht von den frisch präparierten Substraten (Daten nicht gezeigt).

Da bekannt ist, dass GFP in hohen Konzentrationen Dimere ausbildet (Phillips, 1997), wurden die EGFP-Substrate zusätzlich mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation untersucht. Diese ergab, dass die EGFP-Substrate sowohl in Harnstoffpuffer, als auch in Phosphatpuffer (20 mM Phosphat, 50 mM NaCl) nur in monomerer Form vorliegen.

4.1.6 Zustandsänderungen des EGFP-Chromophors bei der Entfaltung

UV/VIS-Analysen (vgl. Abbildung 3.15, S. 40) haben gezeigt, dass das Chromophor im 16/EGFP und i16/EGFP dem der EGFP-Referenz entspricht. Auch die Verwendung von einem harnstoffhaltigen Puffer (3 M Harnstoff, 20 mM Tris/HCl, pH 7,5) änderte den Zustand nicht bzw. minimal (vgl. Abbildung 3.16, S. 41). Die Verringerung der EGFP-Absorption beim 16/EGFP in harnstoffhaltigen Puffer kann mit einem geringen Anteil an entfalteten 16/EGFP begründet werden.

Ein abweichendes Ergebnis, bezüglich der Literaturangaben, zeigen dagegen die UV/VIS-Spektren des denaturierten i16/EGFP (siehe Abbildung 3.17, S. 42). Das gefaltete i16/EGFP zeigt das normale Spektrum, wie es in der Literatur für das EGFP beschrieben ist (Cormack et al., 1996; Patterson et al., 1997; Kremers et al., 2007). Das mittels TCA-Fällung denaturierte und anschließend in neutral gepufferten 8 M Harnstoff aufgenommene i16/EGFP zeigte dagegen ein Absorptionsmaximum bei ca. 450 nm. Dieses Absorptionsverhalten des EGFP wurde bereits von Kneen et al. (1998) beschrieben, jedoch nicht diskutiert. Erst nach Änderung der Lösung auf pH 4 zeigt das i16/EGFP, dass aus der Literatur bekannte Spektrum des entfalteten GFP mit einem Absorptionsmaximum bei 375 nm (Reid & Flynn, 1997). Bei genauer Analyse der Spektren fällt auf, dass selbst das gefaltete i16/EGFP bereits eine Schulter bei etwa 450 nm und 370–380 nm aufweist. Ebenso zeigt das denaturierte i16/EGFP (pH 7) eine Schulter bei 370–380 nm. Dies lässt darauf schließen, dass bereits ein geringer Teil des gefalteten i16/EGFP in einem Zustand

vorliegt, in dem das Chromophor typische Absorptionen der neutral und sauer denaturierten Variante aufweist. Ebenso ist ein Teil des neutral ungefalteten i16/EGFP schon in dem Zustand, wie er unter sauer denaturierten Bedingungen zu erkennen ist.

Vergleicht man die Chromophorzustände, welche im GFP und EGFP die charakteristischen Absorptionsmaxima hervorrufen (siehe Abbildung 2.6, S. 19), so ist eine Gemeinsamkeit zu den beobachteten Spektren zu erkennen. Das Chromophor des GFP steht, aufgrund der räumlichen Anordnung und Wechselwirkung der Aminosäuren, im Gleichgewicht zwischen der phenolischen Form und dem Phenolatzustand. Daraus resultieren die Absorptionsmaxima bei 398 nm und 475 nm. Aufgrund der Mutation des Serin65 zu Threonin ändert sich die Position des Chromophors relativ zu den Aminosäureresten, die mit dem Chromophor wechselwirken. Dadurch entsteht eine stärkere Wechselwirkung mit dem Phenolrest des Chromophors (Entzug des H-Protons durch H-Brücken), wodurch das Gleichgewicht auf die Seite des Phenolatzustandes verschoben wird. Daraus resultiert nur noch ein einziges Absorptionsmaximum bei 488 nm (Heim et al., 1995). Nun lässt sich postulieren, dass nach der TCA-Denaturierung und der nachfolgenden Aufnahme in neutral gepufferten 8 M Harnstoff, das Chromophor zunächst seine Wechselwirkungen der 3D-Struktur (H-Brücken) verliert, wodurch die Fluoreszenz vom Lösungsmittel gequenchet wird (Verschwinden der Fluoreszenz und Farbänderung aufgrund des noch vorhandenen Chromophors) (Reid & Flynn, 1997). Unter diesen Bedingungen verbleibt jedoch das Chromophor zunächst im Phenolatzustand (Absorption bei 450 nm). Allerdings ist dieser Zustand nicht mehr so stark stabilisiert, wie in der intakten Tertiärstruktur und das Phenolat-Rest interagiert jetzt ausschließlich mit dem Lösungsmittel, wodurch ein Gleichgewicht zwischen Phenolatzustand und phenolischer Form (ähnlich dem wtGFP) entsteht. Das Umpuffern auf pH 4 verlagert dieses Gleichgewicht vollständig auf die Seite der phenolischen Form (Absorption bei 375 nm), da unter diesen Bedingungen keine Wasserstoffbrücken mehr ausgebildet werden können, die zur Bildung des Phenolat-Zustands nötig sind. Sofern die 3D-Struktur des GFP nicht zerstört ist, ist eine solche „reversible“ Protonierung für das GFP bekannt (Ward & Bokman, 1982). Damit lassen sich die drei Zustände modellhaft folgendermaßen zuordnen. Das Absorptionsmaximum bei 488 nm entspricht dem Chromophor im Phenolatzustand inkl. der erweiterten Delokalisierung des π -Elektronensystems durch die intakte Tertiärstruktur und dem Schutz vor lösungsmittelbedingten Quencheffekten. Das Absorptionsmaximum bei 450 nm entspricht dem Phenolatzustand des Chromophors ohne 3D-Struktur und das Absorptionsmaximum bei 375 nm entspricht der phenolischen Form, wiederum im denaturierten Zustand.

4.1.7 Das Signalpeptid des i16/EGFP bildet bei der Interaktion mit membranähnlichen Grenzschichten α -helikale Strukturen aus

Über die Struktur der Transitpeptide ist verhältnismäßig wenig bekannt. Für die stroma-dirigierenden Domänen (STD) konnten bisher keine Strukturen in wässriger Umgebung gezeigt werden. Allerdings entwickelt die STD in Anwesenheit organischer Lösungsmittel α -helikale Sekundärstrukturen (Wienk et al., 1999, 2000; Bruce, 2001). Ähnliche Beobachtungen konnten für die Signalpeptide von Tat-Substraten in Bakterien gezeigt werden (Kipping et al., 2003; Miguel et al., 2003). Dabei konnten Miguel et al. (2003) ebenfalls zeigen, dass durch Änderung des Lösungsmittels α -helikale Sekundärstrukturen induzierbar sind. Diese Strukturbildung ist dabei vom Zwillingsarginin unabhängig, woraus gefolgert wurde, dass für die Strukturbildung die Argininreste selbst nicht verantwortlich sind, sehr wohl aber für die Interaktion mit der Translokase. Kipping et al. (2003) konnten zeigen, dass trotz vollständiger Faltung des reifen Teils des Substrats keine Sekundärstruktur des Signalpeptids erkennbar ist. Daraus wurde gefolgert, dass die Strukturbildung entweder an der Translokase stattfindet oder bei Interaktion mit der Membran, in Vorbereitung der Interaktion mit der Translokase. Auch die Kristallstruktur des GFOR-Vorläuferproteins (Glukose-Fruktose Oxidoreduktase) zeigte keine Struktur des Signalpeptids (Nurizzo et al., 2001). Über Strukturen von plastidären Signalpeptiden (thylakoiddirigierende Domäne, TTD) sind bisher keine Strukturinformationen bekannt. Allerdings kann aufgrund des Verhaltens der STD und der Signalpeptide in Bakterien davon ausgegangen werden, dass auch diese in wässriger Lösung unstrukturiert vorliegen.

Wie im Abschnitt 3.1.5.2 (S. 43) beschrieben, eignen sich das 16/EGFP und i16/EGFP sehr gut für Strukturuntersuchungen an den Transit-/Signalpeptiden, da die Struktur des EGFP bekannt ist und aus vergleichenden CD-Spektren die Strukturen des Transit- bzw. Signalpeptids berechnet werden können. Dieser experimentelle Ansatz begründet die hohen Anforderungen an Reinheits- und Faltungsgrad der Substrate sowie der Kontrolle, da andernfalls eine solche Strukturberechnung nicht möglich wäre. Die Untersuchungen (vgl. Abbildung 3.19, S. 45) zeigen, wie bereits vermutet, dass sowohl das Transitpeptid des 16/EGFP als auch die thylakoiddirigierende Domäne in wässriger Lösung ungefaltet vorliegen.

Die bisher beschriebenen α -helikalen Sekundärstrukturen wurden durch strukturinduzierende Reagenzien wie Detergenzien (z.B. SDS) oder organische Lösungsmittel (u.a. Methanol, Trifluorethanol) erzeugt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich in hydrophober Umgebung (z.B. mit Membranen) Strukturen ausbilden. Einen direkten Nachweis dazu gibt es jedoch nicht. Die im Abschnitt 3.1.9, S. 56 gezeigten Untersuchungen zeigen erst-

mals die Ausbildung α -helikaler Sekundärstrukturen bei der Interaktion des i16/EGFP mit Lipidmonoschichten. Dabei konnte zunächst bestätigt werden, dass das i16/EGFP in thylakoidähnliche Monolipidschichten inseriert (vgl. Abbildung 3.31, S. 59). Die Zusammensetzung der Monolipidschicht entsprach dabei der Zusammensetzung in Thylakoidmembranen aus Spinat (Kates, 1990). Der angelegte Druck in der Monolipidschicht, bei dem eine deutliche Insertion gemessen wurde, lag mit 20 mN/m unterhalb des Druckes von 30 mN/m. Dieser Druck (30 mN/m) in Monolipidschichten entspricht dabei dem Druck, wie er für entsprechende physiologische Bilschichten angenommen wird (Blume, 1979). Diese Abweichung könnte damit begründet werden, dass pflanzliche Membranen bei deutlich geringeren Temperaturen noch beweglich sein müssen als z.B. tierische Membranen. Diese erhöhte Beweglichkeit bedingt einen geringeren Druck in der Lipidschicht. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Kontrolle EGFP (ohne Signalpeptid) erst bei einem Druck von 10 mN/m eine leichte Interaktion zeigt. Allerdings ist dieser Druck so gering, dass dabei von einer zunehmend unspezifischen Interaktion ausgegangen werden kann. Ergänzt man diese Insertionsexperimente zusätzlich mit der IRRAS-Analyse (vgl. Abbildung 3.32, S. 60) erkennt man, dass bei der Insertion des i16/EGFP neben dem für das EGFP erwartete β -Faltblatt Signal innerhalb der Amid-I-Bande ein zusätzliches α -helikales Signal erkennbar ist. Da, wie selbige Abbildung zeigt, das EGFP selbst nicht mit der Monolipidschicht interagiert und demzufolge auch nicht im IRRAS messbar war, musste geklärt werden, ob das gemessene α -helikale Signal vom EGFP-Teil ausgeht, der aufgrund der Interaktion des i16/EGFP mit der Monolipidschicht durch das IRRAS erfasst wird. Dazu wurden die gleichen Untersuchungen an der Luft/Wasser-Grenzfläche durchgeführt (vgl. Abbildung 3.33, S. 61). Mit dieser Grenzfläche interagiert auch das EGFP (ohne Signalpeptid) und zeigt dabei nur die erwartete Änderung der Amid-I-Bande, die für β -Faltblattstrukturen typisch ist. Das i16/EGFP zeigt im Gegensatz dazu wieder α -helikale Struktursignale. Dabei ist zu erkennen, dass die Stärke des α -helikalen Signals, bei der Verwendung der thylakoidähnlichen Monolipidschicht, stärker ist als bei der Interaktion mit der Luft/Wasser-Grenzfläche.

Die Ausbildung von α -helikalen Strukturen bei der Interaktion von Proteinen mit Membranen und das Ausbleiben einer solchen Struktur in wässriger Lösung ist nicht überraschend, da die intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen in Konkurrenz mit den Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Protein und Lösungsmittel stehen (Altmann et al., 1990). In hydrophoben Umgebungen, wie organischen Lösungsmitteln, ist das Potential zur Ausbildung einer α -Helix deutlich erhöht (Blaber et al., 1993; Deber & Li, 1995). Die Bildung der α -Helix liefert 50% der gesamten Energie, die für die Insertion von Peptiden in die Membran nötig ist und gilt damit als treibende Kraft für die Insertion von Proteinen in die Membran (Wieprecht et al., 1999).

Aus den Experimenten zur Interaktion des i16/EGFP mit thylakoidähnlichen Monolipidschichten und den IRRAS-Analysen kann gefolgert werden, dass sowohl die Interaktion des i16/EGFP mit der Monolipidschicht, als auch die Ausbildung einer α -helikalen Struktur, durch die thylakoiddirigierende Domäne (Signalpeptid) verursacht wird. Allerdings zeigt der Vergleich mit der Strukturbildung an der Luft/Wasser-Grenzfläche, dass die α -helikale Struktur auf die hydrophobe Grenzfläche zurückgeht und nicht zwangsweise an eine Lipidschicht gekoppelt ist. Aus den eben genannten Ergebnissen und den Literaturdaten zur Δ pH-unabhängigen Insertion von Tat-Substraten als initialen Schritt des Transports (Berghöfer & Klösgen, 1999; Cola et al., 2005; Hou et al., 2006) kann folgendes Modell postuliert werden. Die Signalpeptide der Tat-Substrate liegen nach der Prozessierung im Stroma zunächst ungefaltet vor und bilden erst während der Interaktion mit der Membran eine α -Helix aus. Dies ist einerseits die Voraussetzung für die initiale Insertion in die Membran und andererseits ist es dem Signalpeptid erst durch Ausbildung dieser Struktur möglich mit dem Tat-Komplex zu interagieren. Diese Strukturbildung ist grundsätzlich von Proteinfaktoren unabhängig, was jedoch eine Beteiligung von Proteinen bei der Insertion nicht ausschließt. Diese könnten einerseits die Geschwindigkeit der Insertion beeinflussen und andererseits bei der Erkennung an Rezeptorstrukturen mitwirken.

4.1.8 Sowohl 16/EGFP als auch i16/EGFP kompetieren die Translokation

Wie bereits beschrieben, sollte mit den EGFP-Substraten der Einfluss des Faltungszustandes auf den Transport untersucht werden. Dazu wurden das 16/EGFP und das i16/EGFP als Konkurrenten in Konkurrenzexperimenten eingesetzt. Dabei konnte zunächst gezeigt werden (vgl. Abbildung 3.22, S. 48), dass das exprimierte und gereinigte 16/EGFP sowohl den Transport von *in vitro* translatierten 16/EGFP kompetiert als auch den Transport des authentischen Tat-Substrats 23/23. Bei diesem Vorversuch zeigte sich bereits eine starke Konkurrenzwirkung, da bei 4 μ M sowohl der Import des radioaktiv markierten 23/23 als auch des 16/EGFP nahezu vollständig unterdrückt wird. Daraufhin wurden Konkurrenzen unter Verwendung von Verdünnungsreihen in einem Konzentrationsbereich von 7,8 nM–2 μ M mit gefalteten und ungefalteten Substraten (16/EGFP und i16/EGFP) wiederholt. Die Ergebnisse dieser Versuche (vgl. Abbildung 3.24, S. 50) zeigten zunächst für beide Substrate eine Konkurrenz des Transports des authentischen 23/23. Die berechneten IC_{50} -Werte ergaben dabei für das gefaltete 16/EGFP einen Wert von 32 nM und für das gefaltete i16/EGFP einen Wert von 130 nM. Die IC_{50} -Werte der ungefalteten Varianten zeigen für das mit 419 nM (16/EGFP) und mit 1,51 μ M (i16/EGFP) weniger als 10% der Konkurrenzwirkung der gefalteten Substrate. Allerdings kann man trotz des Unterschieds davon ausgehen, dass sowohl die gefalteten als auch die ungefalteten Sub-

strate den Transport beeinflussen. Die Kompetitionswirkung ungefalteter Substrate ist zwar kein direkter Beweis für einen Transport, kann jedoch als Indiz gewertet werden und stützen die Aussagen zur Fähigkeit des pflanzlichen Tat-Systems falsch bzw. unvollständig gefaltete Substrate zu transportieren (Hynds et al., 1998).

Vergleicht man jedoch die Kompetitionswirkung des 16/EGFP mit dem i16/EGFP so ist die des 16/EGFP unabhängig vom Faltungszustand ca. 4x stärker als die des i16/EGFP. Bei dieser Diskussion muss berücksichtigt werden, dass *in vivo* ein Substrat in Form des 16/EGFP nicht auf die Thylakoidmembran trifft, da der stromadirigierende Teil bereits von der SPP abgespalten wurde und das resultierende Intermediat (i16/EGFP) entsteht. Trotzdem zeigen die *in vitro* Experimente (vgl. Abbildung 3.5, S. 28), dass auch das 16/EGFP transportiert wird. Marques et al. (2003) konnten zeigen, dass neben dem 16/EGFP auch andere EGFP-Chimäre, wie z.B. das 23/EGFP, als vollständige Vorläuferproteine transportiert werden können. Eine mögliche Ursache für die stärkere Kompetitionswirkung könnte auf die stromadirigierende Domäne zurückgehen, die einen Transport behindert und so eine stärkere Kompetitionswirkung hervorruft. Da auch für die stromadirigierende Domäne (STD) durch hydrophobe Lösungsmittel eine α -Helix induzierbar ist (Wienk et al., 1999, 2000; Bruce, 2001), könnte vermutet werden, dass die STD an der Thylakoidmembran eine Helix ausbildet und so zusätzlich mit der Membran interagiert. Damit würden beide Domänen (STD und TTD) mit der Membran wechselwirken. Diese verstärkte Wechselwirkung mit der Membran könnte sich möglicherweise auch auf die Wechselwirkung mit der Translokase auswirken und so den Transport beeinflussen. Um diesen Effekt näher zu charakterisieren, müssten *in vitro* mit radioaktiv markierten Substraten vergleichend Kinetiken aufgenommen und die dabei zu bestimmenden K_M -Werte mit den IC_{50} -Werten verglichen werden. Aus diesen Ergebnissen könnte abgeleitet werden, ob die Kompetitionswirkung in direktem Zusammenhang mit der Transporteffizienz steht, d.h. ob die höhere Kompetitionswirkung auf einen effizienteren Transport zurückgeht (das 16/EGFP wird effizienter transportiert und erzeugt dadurch die Competition) oder auf eine Behinderung des Transports zurückzuführen ist (das 16/EGFP bindet fester an die Membran bzw. an die Translokase und behindert den Transport anderer Substrate und erzeugt so die Kompetitionswirkung).

Die Competitionsexperimente besitzen den Nachteil, dass keine Aussage darüber getroffen werden kann, wo die Competition stattfindet (welcher Translokationsschritt). Dies bedeutet, dass die Competition nur zeigt, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Transports beeinflusst wird. Ob dieser die initiale Insertion des Substrats in die Membran betrifft oder den eigentlichen Translokationsschritt, ist aus den vorherigen Ergebnissen nicht abzuleiten. Aus diesem Grund wurde die Competition mit dem 16/23 als radioaktiv markiertes Referenzsubstrat und dem 16/EGFP als Kompetitor wiederholt (vgl.

Abbildung 3.27, S. 54). Dabei konnte gezeigt werden, dass wiederum sowohl das gefaltete als auch das ungefaltete Substrat den Transport des 16/23 kompetieren. Wieder ist die Kompetitionswirkung der gefalteten Substrate stärker als die der ungefalteten Substrate. Allerdings sind die Unterschiede zwischen den Varianten weniger deutlich. Vergleicht man jedoch die IC_{50} -Werte mit denen des 23/23 so sind diese im Fall des 16/23 mit maximal 8 nM deutlich kleiner. Dies bedeutet, dass der Transport des 16/23 wesentlich empfindlicher von Kompetitoren beeinflusst wird. Das könnte damit zusammenhängen, dass der Transport des 16/23 deutlich ineffizienter erfolgt als der des 23/23, ein Vorteil, der es erst ermöglichte die Translokationsintermediate zu identifizieren (Berghöfer & Klösgen, 1999; Hou et al., 2006). Möglicherweise macht dieser ineffiziente Transport das 16/23 besonders empfindlich gegenüber Kompetitionen. Allerdings ist wahrscheinlicher, dass das 16/23 eine geringere Affinität zur Translokase besitzt und der Transport des 16/23 durch geringere Konkurrentkonzentrationen gehemmt werden kann. Was aus diesem Experiment jedoch hervorgeht ist, dass das Ti-1 nicht kompetiert wird, im Gegensatz zum Ti-2 und dem reifen Protein welche eine Konkurrenz durch das 16/EGFP zeigen. In dem Experiment unterliegt das Ti-1 zwar Schwankungen, diese sind jedoch experimentell bedingt, da das Ti-1 im SDS-Gel aufgrund seiner Größe nahe der Lauffront migriert und die z.T. diffuse Form der Banden für Fehler bei der Quantifizierung anfällig ist.

Aus den Konkurrenzexperimenten kann geschlossen werden, dass sowohl gefaltete als auch ungefaltete Substrate mit der Translokase interagieren. Über den Ort der Konkurrenz kann nur spekuliert werden. Es kann jedoch ausgeschlossen werden, dass die initiale Interaktion mit der Membran (Ti-1) zur Konkurrenz führt. Auch der Schritt zwischen Ti-2 und reifen Protein (Prozessierung durch die TPP) ist nicht kompetitionsbestimmend und wird damit in gleicher Weise durch den Konkurrent beeinflusst. Ob jedoch eine unterschiedliche Affinität zum Rezeptor die Konkurrenz hervorruft oder eine Behinderung des eigentlichen Translokationsprozesses stattfindet, bleibt unklar.

4.1.9 Aktivierungseffekte der Tat-Translokase bei geringen Konkurrentkonzentrationen

Während der Konkurrenzversuche konnte ein Effekt beobachtet werden, wie er bereits für transportinkompatible Substrate bekannt ist (Alder & Theg, 2003). Es ist zu erkennen, dass bei geringen Konkurrentkonzentrationen der ungefalteten Substrate, eine Erhöhung der Transporteffizienz des 23/23 zu erkennen ist (vgl. Abbildung 3.24, S. 50). Diese Aktivierung ist zwar statistisch nicht signifikant, konnte jedoch bei jeder Konkurrenz in unterschiedlicher Ausprägung beobachtet werden. Betrachtet man die Konkurrenz des gefalteten i16/EGFP genauer, so ist auch hier eine schwache Aktivierung zu erkennen. Dies lässt vermuten, dass derartige Aktivierungseffekte nicht auf ungefaltete, schlecht

transportierbare oder transportinkompatible Substrate beschränkt sind, sondern es sich dabei um einen allgemeinen Effekt handelt. Die Tat-Komponenten bilden erst bei Bindung des Substrats an den Tat-BC Komplex höhermolekulare Komplexe aus (Cline & Mori, 2001; Mori & Cline, 2002). Inkubiert man nun Thylakoide mit Substraten in geringen Konzentrationen, so ist denkbar, dass dies zu einer verstärkten Assemblierung funktioneller Tat-Translokasen führt und diese dann, wie in den Konkurrenzexperimenten, für das authentische 23/23 vorassembliert zu Verfügung stehen und so eine Erhöhung der Transporteffizienz erzeugen, bis bei höheren Konkurrentorkonzentrationen die Konkurrenz zum Konkurrentor die Effizienz wieder absinken lässt.

4.1.10 Das exprimierte gefaltete 16/EGFP wird *in vitro* transportiert

Die im vorherigen Abschnitt diskutierten Ergebnisse weisen auf eine Konkurrenz eines Translokationsschrittes hin, der nach der Insertion/Interaktion des Substrats mit der Membran und vor der vollständigen Prozessierung zum reifen Protein liegt. Ob das gefaltete Substrat jedoch effektiv transportiert wurde, ist nicht abzuleiten. Der Umstand, dass *in vitro* translatierte Substrate bereits zu ca. 70% gefaltet vorliegen (vgl. Abbildung 3.12, S. 37) lässt bereits vermuten, dass auch die gefalteten EGFP-Chimäre transportiert werden. Um diese Vermutung abzusichern wurde das 16/EGFP *in vitro* in isolierte Erbsenthylakoide importiert (vgl. Abbildung 3.28, S. 55). Dabei konnte gezeigt werden, dass das gefaltete 16/EGFP transportiert wird. Für das ungefaltete Substrat konnte kein Transport nachgewiesen werden. Allerdings lagen bereits für das gefaltete Substrat die Importsignale nur geringfügig über der ECL-Nachweisbarkeit, wodurch ein Transport des ungefalteten Substrats nicht ausgeschlossen werden kann. Damit können die Konkurrenzdaten dahingehend bestätigt werden, dass das gefaltete Substrat nicht nur mit der Translokase wechselwirkt, sondern auch effektiv transportiert wird. Für das ungefaltete Substrat kann eine vergleichbare Aussage nicht getroffen werden.

4.2 Die Thylakoidprozessierungspeptidase

4.2.1 Gibt es in Plastiden nur eine TPP?

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, gehört auch die pflanzliche Thylakoidprozessierungspeptidase (TPP) zur Gruppe der Typ I-Signalpeptidasen, die u.a. im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und Mitochondrien sowie Bakterien N-terminale Transportsignale abspalten. In Pflanzen war bisher sehr wenig über die TPP bekannt. Erste Analysen wurden von Kirwin et al. (1987, 1988) an Erbsenthylakoiden durchgeführt. Dabei wurde die TPP unter Verfolgung ihrer Aktivität durch Triton-Solubilisierung und Hydroxyapatit-Chromatographie angereichert und ersten Untersuchungen unterzogen. Dieses angereicherte Protein zeigte ein pH-Optimum von 6,5–7. Dies ist ungewöhnlich, da bei der TPP die Lokalisierung der Aktivität für die lumenale Seite nachgewiesen wurde (Kirwin et al., 1988) und im Lumen temporär von einem pH unter 5 ausgegangen wird. Ein entsprechendes Gen in Erbse ist bis heute jedoch nicht identifiziert worden. In *Synechocystis* sp. existieren zwei mögliche Prozessierungspeptidasen (LepB1 und LepB2), wobei nur die LepB2 essentiell ist (Zhbanks et al., 2005). Dies weist darauf hin, dass es in Pflanzen möglicherweise auch nur eine essentielle TPP gibt. Für *Arabidopsis thaliana* konnten insgesamt drei mögliche TPP identifiziert werden, die zu den *Synechocystis*-TPP und der Leaderpeptidase aus *E.coli* homolog sind (vgl. Tabelle 3.2, S. 62). Eine dieser Homologen (TPP1) wurde von Chaal et al. (1998) als plastidäre *Arabidopsis*-TPP postuliert. Inoue et al. (2005) analysierten eine andere Homologe (TPP3) genauer und setzten diese in Zusammenhang mit der Prozessierung des Toc75. Dasselbe Protein wurde in plastidären Proteomanalysen von Kleffmann et al. (2004) erwähnt.

Innerhalb dieser Arbeit wurden alle drei Homologen zunächst *in silico*, anschließend *in vitro* und zuletzt *in vivo* auf ihre Lokalisierung hin untersucht. Aus den dabei erhaltenen Daten und unter Einbeziehung der publizierten Daten von Inoue et al. (2005), ist zu folgern, dass es sich bei der TPP3 (At3g24590) höchstwahrscheinlich um die eigentliche plastidäre TPP handelt. Die Ergebnisse die zu dieser Behauptung führen, sollen in den folgenden Abschnitten diskutiert werden. Dabei wird der Fokus auf der TPP3 liegen. Mögliche Funktionen der anderen TPP-Homologen werden am Ende dieses Kapitels diskutiert.

4.2.2 Die TPP3 zeigt die höchste Homologie zu den bakteriellen Leaderpeptidasen

Ein erster Hinweis auf die TPP3 als mögliche pflanzliche Thylakoidprozessierungspeptidase, wurde bereits bei den Homologievergleichen deutlich (vgl. Abbildung 3.36, S. 65). Die drei TPP-Homologen zeigten zwar untereinander eine erstaunlich hohe Ähnlichkeit

(56–67%), doch es fiel auf, dass sich die TPP1 und TPP2 untereinander stärker ähneln (76%) als die TPP3 (56%). Dieser Unterschied ist mit 20% erheblich. Weiterhin zeigte der Vergleich mit den Peptidasen aus *Synechocystis sp.* und *E.coli*, dass die TPP3 zu diesen eine 5–7% höhere Homologie aufweist als die TPP1 und TPP2.

Nach den Ergebnissen von Kirwin et al. (1988) konnte davon ausgegangen werden, dass die TPP in Erbse an der Innenseite der Thylakoidmembran assoziiert ist. *In silico* Untersuchungen der TPP-Homologen und der Leaderpeptidasen auf mögliche Transmembranbereiche (vgl. Abbildung 3.37, S. 66) zeigten, im Gegensatz zur *E.coli*-Leaderpeptidase und den *Synechocystis*-Homologen, für keine der *Arabidopsis*-Varianten einen Transmembranbereich. Durchgeführte Hydrophobizitätsplots (vgl. Abbildung 3.38, S. 67) zeigten jedoch auch in den TPP-Homologen hydrophobe Bereiche, die auf eine mögliche Membranassoziation schließen lassen. Genauere Vergleiche dieser Plots (vgl. auch Abbildung 3.39, S. 68) zeigten eine erstaunliche Ähnlichkeit des Hydrophobizitätsprofils der TPP3 mit der LepB2 aus *Synechocystis*. Auch der Vergleich der TPP3 mit TPP1+2 zeigte erneut die, schon bei den einfachen Sequenzvergleichen erkennbare, Gruppierung der Homologen in TPP3 und TPP1+2. Gerade die hohe Ähnlichkeit der TPP3 zur LepB2, bezüglich des Hydrophobizitätsprofils, war ein weiteres wichtiges Indiz dafür, dass es sich bei der TPP3 möglicherweise um die funktionelle Thylakoidprozessierungspeptidase handelt.

Die im weiteren Verlauf durchgeführten *in silico* Vorhersagen, über eine mögliche chloroplastidäre bzw. mitochondrielle Lokalisierung, untermauerten diesen Eindruck (vgl. Abbildung 3.3, S. 69). Während für die TPP3 eine deutliche Plastidenlokalisierung vorhergesagt wird, ist für die TPP1 eine mitochondrielle und für die TPP2 keine eindeutige Lokalisierung vorhergesagt. Diese Ergebnisse werden von Expressionsanalysen (vgl. Abbildung 3.40, S. 70) gestützt. Dabei ist zu erkennen, dass die TPP3 zwar in fast allen Pflanzengewebe exprimiert wird, ihre höchsten Expressionsraten aber in grünen, photosynthetisch aktivem Gewebe zeigt. Die TPP1 und TPP2 werden ebenfalls in der gesamten Pflanze exprimiert, wobei in diesen Fällen, die höchsten Expressionsraten in seneszenten und nicht grünen Gewebe liegen, was die Vermutung einer möglichen nicht-chloroplastidären Lokalisierung von TPP1 und TPP2 stützt. Ein wichtiger Punkt, der an dieser Stelle erwähnt werden muss, ist, dass in der verwendeten Datenbank TPP1 und TPP2 als ein Protein angesehen werden, wodurch eine getrennte Betrachtung von TPP1 und TPP2 nicht möglich ist.

4.2.3 Nur die TPP3 wird *in vitro* in Chloroplasten importiert

Die *in silico* Analysen deuteten ohne Ausnahme auf die TPP3 als mögliche plastidäre TPP hin. Deshalb wurden die authentischen TPP1–3 *in vitro* transkribiert und unter Verwendung von ³⁵S-Methionin durch *in vitro* Translation radioaktiv markiert. Diese markierten

TPP-Homologen wurden dann zunächst *in organello* in isolierte Erbsenchloroplasten und -mitochondrien importiert (vgl. Abbildung 3.41, S. 72). Dieses Experiment zeigte, dass nur die TPP3 in Chloroplasten importiert wird. Für TPP1 und TPP2 konnten Importprodukte nur in den Mitochondrienimporten nachgewiesen werden. In Mitochondrien sind bisher nur die Imp1 und Imp2 als Typ I-Signalpeptidasen bekannt (Paetzel et al., 2002b). Zu diesen existieren jedoch in *Arabidopsis thaliana* Gene, die im Vergleich zu denen von TPP1 und TPP2 eine stärkere Homologie aufweisen. Damit gibt es keine weiteren Hinweise auf mögliche Funktionen der TPP1 und TPP2 in Mitochondrien, sofern TPP1 und TPP2 auch *in vivo* mitochondrienlokalisiert sind. Über die Größen der *in organello* Importprodukte kann, aufgrund der unbekanntenen Funktion, keine eindeutige Aussage getroffen werden. Sowohl TPP1 als auch TPP2 zeigen allerdings je zwei Importsignale, die kleiner sind als der jeweilige Vorläufer, was auf eine zweifache Prozessierung durch mitochondrielle Prozessierungspeptidasen (z.B. MPP oder zuvor genannte Imps) hinweist. Geht man davon aus, dass es sich dabei um spezifische Prozessierungen handelt, kann dies als Hinweis für eine mögliche Funktion der TPP1+2 in Mitochondrien interpretiert werden. Ein Indiz für eine Prozessierung durch die Imps wäre ein Ala-X-Ala Motiv bei der TPP1 und TPP2 (im Bereich von Position 190, vgl. Abbildung 3.35, S. 64). Allerdings ergäbe eine solche Prozessierung Produkte von ca. 20 kDa, was mit den beobachteten Größen nicht übereinstimmt.

Im Fall der TPP3 zeigt sich ein deutlicheres Bild. Das Hauptprodukt liegt mit seiner Größe von 28 kDa genau in dem von Chaal et al. (1998) gezeigten Größenbereich. Richtet man sich nach der vorhergesagten Schnittstelle (ChloroP), würde für die TPP ein stromales Prozessierungsprodukt von ca. 25 kDa resultieren. Da bereits der Vorläufer mit ca. 36 kDa um 4 kDa langsamer im SDS-Gel migriert, als die berechnete Größe von 32 kDa, würde das beobachtete Importprodukt mit dem erwarteten stromalen Importprodukt übereinstimmen. Die mit TPP1-Antikörpern von Chaal et al. (1998) in Erbsenthylakoiden beschriebenen Signale im Bereich von ca. 30 kDa liegen damit zwar geringfügig höher, aber immer in einem vergleichbaren Bereich. Dazu muss erwähnt werden, dass in diesem Fall Antikörper gegen die katalytische Domäne der TPP1 erstellt wurden. Diese Domäne ist, vergleicht man TPP1–3, zu über 85% ähnlich, wodurch diese Daten, bezüglich der TPP1 als plastidäre TPP, vorsichtig zu interpretieren sind und eine entsprechende Kreuzreaktion des TPP1-Antikörpers mit der TPP3 wahrscheinlich ist. Die Chloroplasten, die Chaal et al. (1998) als Grundlage der Western-Analysen dienten, wurden aus Erbse gewonnen und nicht aus *Arabidopsis thaliana*, was eine mögliche Begründung für die geringfügig abweichende Größe des Westernsignals ist (30 kDa im Vergleich zu 28–29 kDa des *in organello* Importprodukts der TPP3). Weiterhin haben eigene Western-Analysen (Daten nicht gezeigt) mit Antikörpern gegen die Vollängen TPP1 und 2 gezeigt, dass diese in Erbse ein Protein gleicher Größe erkennen, wobei in *Arabidopsis*-Extrakten mit beiden Antikörpern

keine entsprechenden Signale detektierbar waren. Neben dem Hauptprodukt bei ca. 28 kDa sind reproduzierbar zwei weitere Signale im Bereich von ca. 29 kDa und 32 kDa zu detektieren. Bei diesen könnte es sich um Prozessierungsintermediate der TPP3 handeln, welche durch die stromale Prozessierungspeptidase (SPP) erzeugt werden.

4.2.4 Die TPP3 inseriert in die Thylakoidmembran

Nachdem aus den vorherigen Ergebnissen gefolgert werden konnte, dass es sich bei der TPP3 um die vermutlich einzige plastidäre TPP handelt, wurde deren Lokalisierung genauer untersucht. Dazu wurden die Chloroplasten, nach dem Import und dem Abbau der nicht importierten Substrate durch Proteasebehandlung, subfraktioniert (vgl. Abbildung 3.42, S. 74). Dabei zeigt sich, dass das importierte Produkt bereits im Stroma zu seiner reifen Form prozessiert wird, welches anschließend angereichert in den Thylakoiden nachgewiesen werden kann. Beim Proteaseverdau der Thylakoide wird ein Teil der TPP3 abgebaut und ein verkürztes Abbauprodukt entsteht. Daraus kann geschlossen werden, dass der größte Teil der TPP3 in den Thylakoiden lokalisiert, nur ein kleiner Teil stromaexponiert und durch die Protease angreifbar ist. Ein Modell was dieses Verhalten theoretisch erklärt ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Die Ergebnisse in Kombination mit dem gezeigten Modell sind ein Indiz dafür, dass die TPP3 nicht nur an der Innenseite der Thylakoidmembran assoziiert, sondern vielmehr als integrales Membranprotein mit transmembraner Topologie in der Membran verankert ist, eine Eigenschaft, die für die bakteriellen Homologen typisch ist (Paetzel et al., 2002b). In diesem Experiment fällt auf, dass in den Thylakoidfraktionen ein gegenüber dem Hauptprodukt um 2 kDa verkürztes Fragment zu sehen ist. Da dieses in den Chloroplastenfraktionen nicht auftritt, ist zu vermuten, dass es sich dabei um ein Fragment handelt, was durch eine C-terminale Prozessierung nach dem Transport in die Thylakoide erzeugt wird. Dieser Prozess benötigt

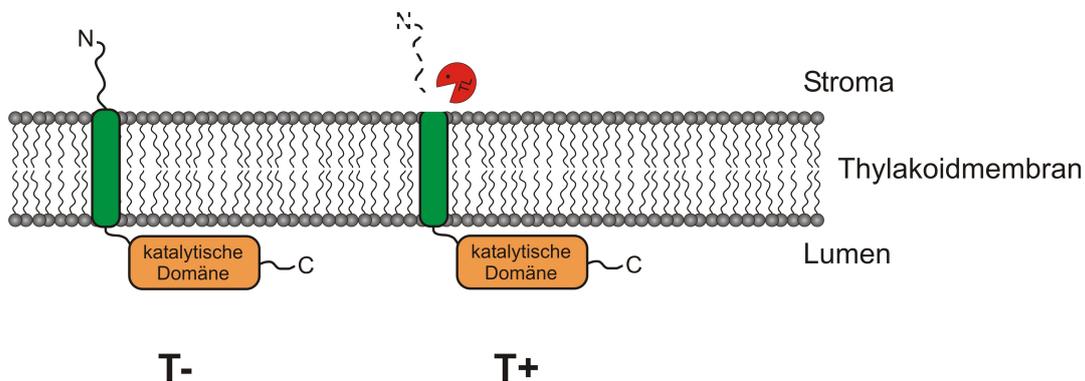


Abb. 4.1: Modell der TPP-Insertion in die Thylakoidmembran. Gezeigt ist ein theoretisches Modell der Insertion der TPP3 in die Thylakoidmembran und die damit verbundene Erklärung der proteolytischen Fragmente beim Vergleich von unbehandelten (**T-**) und thermolysinbehandelten (**T+**) Thylakoiden nach *in organello* Import und anschließender Subfraktionierung der Chloroplasten (vgl. Abbildung 3.42, S. 74).

vermutlich einen gewissen Zeitraum und ist deshalb möglicherweise erst nach der Aufarbeitung in den Thylakoiden detektierbar.

Neben der Lokalisierung in der Thylakoidmembran konnte mit Hilfe der nativen Gelelektrophorese zuvor solubilisierter Thylakoidmembranen (nach Import der TPP3) gezeigt werden (vgl. Abbildung 3.43, S. 76), dass die TPP3 zum größten Teil in monomerer Form vorliegt. Neben den Signalen der Monomere, ist noch ein diffuses höhermolekulares Signal detektierbar. Bei diesem könnte es sich um einen möglichen TPP/Substratkomplex handeln. Diese Daten weisen darauf hin, dass die Prozessierung des Signalpeptids nicht in einem TPP/Translokasekomplex erfolgt, sondern separat nach abgeschlossenen Transport. Diese Ergebnisse stimmen mit ersten Hinweisen von Frielingsdorf & Klösgen (2007) überein, wo gezeigt werden konnte, dass sich das unprozessierte, aber bereits translozierte Substrat (Zustand entsprechend dem Ti-2 Intermediat) in der Thylakoidmembran anreichert, ohne dabei eine Interaktion mit einem höhermolekularen Translokasekomplex einzugehen und dennoch eine vollständige Prozessierung zum reifen Protein erfolgte. Insofern kann postuliert werden, dass nach der erfolgreichen Translokation des Substrats, dieses lateral in die Membran diffundiert, um dort von der TPP zur reifen Form prozessiert zu werden. Dieses Modell stützt gleichermaßen die Aussage, dass eine einzige TPP für die Prozessierung aller Substrate verantwortlich ist.

Betrachtet man die ebenfalls mittels nativer Gelelektrophorese analysierte Stromafraktion, so ist ein schwaches Signal im Bereich von 420–440 kDa zu erkennen. Dieser Komplex migriert im Vergleich zum Rieske/Cpn60-Komplex (Molik et al., 2001) etwas schneller im PAA-Gel. Auch wenn es sich dabei um ein verhältnismäßig schwaches Signal handelt, so wäre denkbar (wenn auch sehr spekulativ), dass die TPP im Stroma mit Hilfe von Chaperonen faltet und dann gefaltet in die Thylakoidmembran insertiert. Über die Art und Weise, wie die TPP3 in die Thylakoidmembran gelangt (Transportweg) kann bisher keine Aussage getroffen werden, da ein *in thylakoido* Import, auch unter Zugabe von Stroma, nicht funktioniert und damit eine Analyse des genutzten Transportweges nicht möglich ist. Eine Faltung im Stroma ist nicht unwahrscheinlich, da der pH im Thylakoidlumen starken Schwankungen unterworfen ist (abhängig von der Aktivität der Photosysteme), was definierte Faltungsbedingungen nahezu unmöglich macht.

Die gesamten bisherigen Daten sind ein starkes Indiz dafür, dass es sich bei der TPP3 um die funktionelle TPP handelt. Allerdings fehlte bisher ein wichtiger Beweis für die Funktionalität – die Aktivität. Diese fehlenden Informationen liefert die bereits erwähnte Veröffentlichung von Inoue et al. (2005). In dieser wurde eine T-DNA-Insertionslinie verwendet, in der das Gen für die TPP3 (dort bezeichnet als *plsp1*) ausgeschaltet wurde. Die homozygoten Pflanzen waren dabei embryolethal und nur auf zuckerhaltigen Medium wachstumsfähig, zeigten unter diesen Bedingungen einen vollständigen Albinophänotyp.

Der Knockout konnte durch Komplementation mit dem Gen der TPP3/Plsp1 aufgehoben werden. Die Albinomutanten zeigten weiterhin eine starke Degeneration der Thylakoidmembran, ein Ergebnis was sehr gut zur Argumentation der TPP3 als TPP passt. Denn wenn man annimmt, dass nur diese eine TPP die Prozessierung der Vorläuferproteine sicherstellt, hätte ihr Ausfall die Folge, dass ein Großteil der Thylakoidproteine nicht ihre Funktion erfüllen können, womit z.B. der Aufbau funktioneller Photosynthesekomplexe unmöglich wäre (Albinophänotyp). Daraus folgend würde die Pflanze ihre Fähigkeit zum photoautotrophen Wachstum verlieren. Weiterhin ist in der Knockout-Mutante die Anreicherung der stromalen Intermediatsform des 33 kDa-Proteins des Wasserspaltungsapparates von Photosystem II zu erkennen. Das 33 kDa-Protein ist ein typisches Sec-Substrat und wird ebenfalls von der TPP zum reifen Protein prozessiert. Die Autoren diskutieren auch eine Lokalisierung in der inneren Hüllmembran, doch betrachtet man die Abbildung 4B in [Inoue et al. \(2005\)](#) genau, so ist zu erkennen, dass der größere Teil des Proteins (TPP3/Plsp1) thylakoidlokalisiert ist (Verhältnis 6:1). Allerdings ist denkbar, dass die TPP3/Plsp1 sowohl in der Thylakoidmembran, als auch in der Hüllmembran eine Funktion erfüllt, wobei davon auszugehen ist, dass ihre Hauptfunktion in der Thylakoidmembran liegt. Nur so wäre sowohl die Prozessierung von Thylakoidproteinen als auch die des Toc75-Intermediats zu begründen.

Die bisher diskutierten Ergebnisse unter Zuhilfenahme der Veröffentlichung von [Inoue et al. \(2005\)](#) zeigen deutlich, dass es sich bei der TPP3 auch funktionell um die Thylakoidprozessierungspeptidase handelt. Die Abhängigkeit der Prozessierung des Toc75-Stromaintermediats von der TPP3, weist auf eine funktionelle Lokalisierung der TPP sowohl in der Thylakoidmembran als auch der inneren Hüllmembran des Chloroplasten hin. Der im Stroma identifizierte TPP3-Komplex kann als Faltungskomplex diskutiert werden.

4.2.5 *In vivo* Studien der TPP

Nachdem gezeigt werden konnte, dass es sich bei der TPP3 um die plastidäre TPP handelt, stellte sich die Frage, welche Funktionen die anderen beiden TPP-Homologen besitzen. Schon die *in silico* Analysen zeigten, dass sich die TPP1 und TPP2 untereinander sehr ähnlich sind (auch im Vergleich zur TPP3, vgl. Diskussion [4.2.2](#), S. 101). Die *in vitro* Importe in isolierte Mitochondrien und Chloroplasten zeigten, dass die TPP1 und TPP2 nur in Mitochondrien importiert wurden. Die *in organello* Experimente haben allerdings einen entscheidenden Nachteil, da sie den Einfluss cytosolischer Faktoren auf die Sortierung nicht berücksichtigen. Aus diesem Grund wurden Fusionsproteine aus den TPP-Homologen und EYFP konstruiert. Dabei wurden zum einen die ersten 100 Aminosäuren des N-Terminus mit EYFP fusioniert (alle TPP, Bezeichnung als TPPx-AS/EYFP) und

zum anderen die Vollängenproteine mit EYFP (TPP1/EYFP und TPP3/EYFP, vgl. Abbildung 3.44, S. 77). Die Wahl fiel auf das EYFP, da dieser Reporter für spätere Co-Transformationen mit z.B. ECFP oder DsRed geeignet wäre. Diese Konstrukte wurden mittels ballistischer Transformation in Erbsenblätter transient transformiert (vgl. Abschnitt 3.2.3.1, S. 78).

4.2.5.1 *In vivo* Lokalisierung der verkürzten EYFP-Konstrukte

Basierend auf den bisherigen Ergebnissen konnte die TPP3 als Kontrolle für eine plastidäre Lokalisierung verstanden werden. Die *in vivo* Analysen zeigten zunächst für die TPP3-AS/EYFP, wie erwartet, eine eindeutige Plastidenlokalisierung (vgl. Abbildung 3.48, S. 81).

Die TPP1-AS/EYFP zeigt sowohl in Plastiden als auch Mitochondrien ein EYFP-Signal (vgl. Abbildung 3.46, S. 80), was auf eine Lokalisierung in beide Organellen hinweist. Dabei zeigt sich allerdings eine interessante Unterteilung der transformierten Zellen in zwei Gruppen. In einem Teil der Zellen sind in beiden Organellen EYFP-Signale zu erkennen. Andere Zellen zeigen im Gegensatz dazu eine ausschließliche Mitochondrienlokalisierung und keine EYFP-Signale in Plastiden. Für dieses uneinheitliche Bild konnte bisher keine Erklärung gefunden werden.

Die TPP2-AS/EYFP zeigte sowohl eine plastidäre als auch mitochondrielle Lokalisierung (vgl. Abbildung 3.47, S. 81). In diesem Fall zeigen alle untersuchten transformierten Zellen das gleiche Bild.

Damit weichen die *in vivo* Analysen der verkürzten Konstrukte, mit Ausnahme der TPP3-AS/EYFP, von der erwarteten Lokalisierung ab, wie sie in den *in vitro* Analysen für die authentische TPP1 und TPP2 gezeigt wurden (vgl. Abbildung 3.41, S. 72).

4.2.5.2 *In vitro* Importversuche bestätigen die *in vivo* Lokalisierung der verkürzten EYFP-Konstrukte

Um zu untersuchen, ob es sich bei diesen Unterschieden um Unterschiede zwischen dem *in vitro* und *in vivo* System handelt, wurden die TPP1–3-AS/EYFP zusätzlich *in vitro* getestet (vgl. Abbildung 3.49, S. 82). Diese zeigten sowohl für TPP1-AS/EYFP und TPP2-AS/EYFP einen eindeutigen Chloroplastenimport und in beiden Fällen einen zusätzlichen schwachen Mitochondrienimport. Damit stimmen die experimentellen Daten *in vitro* und *in vivo* qualitativ überein. Quantitative Aussagen sind bei den *in vitro* Importen schwierig, da die Importeffizienz vom Zustand der präparierten Organellen abhängig ist. Dieser Zustand der Organellen kann bei jeder Präparation zwischen Chloroplasten und Mitochondrien stark variieren.

4.2.5.3 *In vivo* Lokalisierung der Vollängen-EYFP-Konstrukte von TPP1 und TPP3

Die *in vivo* Analysen der Vollängen/EYFP-Konstrukte zeigten (vgl. Abbildung 3.50, S. 84 und 3.51, S. 85) für das TPP3/EYFP, wie erwartet, eine eindeutige Plastidenlokalisierung, wobei in diesem Fall in einigen Plastiden eine inhomogene Verteilung des Fluoreszenzsignals zu erkennen war. Dies könnte sich zum einen als mögliche Sublokalisierung interpretieren lassen, allerdings müsste diese dann in allen Plastiden zu sehen sein. Wahrscheinlicher ist eine Präzipitation ähnlich der *inclusion bodies* in Bakterien, die auf die Hydrophobizität der Vollängen-TPP zurückgehen könnte.

Das TPP1/EYFP zeigte zunächst in transformierten Zellen nur sehr schwache EYFP-Signale. Diese sind jedoch sowohl in Mitochondrien und Plastiden zu sehen und bestätigen damit die Ergebnisse, die für die verkürzten Konstrukte gezeigt werden konnten.

4.2.5.4 Überlegungen über mögliche Funktionen der TPP1 und TPP2

Hinweise zur Funktion der TPP1 und TPP2 können aus den gewonnenen Ergebnissen nicht abgeleitet werden. Die *in silico* Analysen lassen jedoch vermuten, dass es sich möglicherweise um gewebespezifisch exprimierte TPP-Homologe handelt. Im Fall einer wurzelspezifischen Expression wäre durchaus denkbar, dass Transportsignale innerhalb des fremden Gewebes (z.B. Blattgewebe) zu einer abweichenden Sortierung führen, als im dem Gewebe, wo dieses Gen seine Funktion erfüllt. Diese Vermutungen sind spekulativ, stützen sich auf eine begrenzte Zahl von DNA-Arrays und müssten durch weitere experimentelle Ansätze abgesichert werden. Eine Möglichkeit ist die Herstellung stabiler *Arabidopsis thaliana*-Linien, welche die jeweiligen EYFP-Konstrukte tragen. Eine weitere Möglichkeit sind gewebespezifische Expressionsanalysen durch Northern-Blot- oder Promotoranalysen (GUS-Analysen der TPP-Promotoren). Auch ist nicht auszuschließen, dass es sich bei der TPP1 und TPP2 um *Arabidopsis*-spezifische Effekte handelt, solange für Erbsen keine Homologen Gene für TPP1–3 bekannt sind. Daraus folgend wäre ein nächster experimenteller Ansatz die vergleichende transiente Transformation von *Arabidopsis*-Blättern oder die oben angesprochene Analyse stabil transformierter Linien. Da *in organello* Importe mit *Arabidopsis thaliana* jedoch bisher nicht möglich sind, ist dann eine vergleichende *in vitro* Analyse ausgeschlossen. Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass TPP1 und TPP2 in unterschiedlich spezialisierten Plastiden eine entsprechende Funktion erfüllen (z.B. Leukoplasten, Amyloplasten).

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass es bei der TPP3 um die plastidäre TPP handelt. Lokalisierungsstudien *in vitro* und *in vivo* zeigen eine plastidäre Lokalisierung. In den *in vitro* Experimenten konnte für die TPP3 zusätzlich eine Sublokalisierung

rung in der Thylakoidmembran nachgewiesen werden. Die Lokalisierung von TPP1 und TPP2 unterscheiden sich jedoch zwischen den authentischen Substraten und den EYFP-Konstrukten. Eine Aussage über die mögliche Funktion in den entsprechenden Organellen kann nicht getroffen werden.

5 Material und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Chemikalien

Die innerhalb dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in analytischem Reinheitsgrad (p.a.) bei folgenden Firmen bezogen:

BIOMOL (Hamburg), DIFCO-LABORATORIES (Detroit, USA), DUCHEFA (Haarlem, Niederlande), ICN BIOCHEMICALS GMBH (Meckenheim), MERCK (Darmstadt), ROTH (Karlsruhe), SERVA (Heidelberg), SIGMA-ALDRICH (München).

Das verwendete ^{35}S -Methionin wurde von GE-HEALTHCARE (Freiburg) bezogen.

5.1.2 Antibiotika

Mit Ausnahme des Chloramphenicols (in Ethanol gelöst) wurden alle Antibiotika in bidestilliertem Wasser gelöst und die Stammlösungen steril filtriert.

Antibiotikum	Stammlösung	Arbeitskonz.	Herkunft
Ampicillin (Amp)	100 mg/ml	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	SERVA (Heidelberg)
Kanamycin (Kan)	50 mg/ml	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	SERVA (Heidelberg)
Chloramphenicol (Cam)	34 mg/ml	34 $\mu\text{g}/\text{ml}$	SIGMA-ADRICH (München)

5.1.3 Kulturmedien

Zur Herstellung der Kulturmedien wurden folgende Chemikalien verwendet:

Medium	Herkunft
Bakterienpepton	DIFCO-LABORATORIES (Detroit, USA)
Bacto-Agar	BD BIOSCIENCES (Erembodegem, Belgien)
Hefeextrakt	ROTH (Karlsruhe)

Zusammensetzung der verwendeten Anzuchtmedien:

LB-Medium (flüssig)	Bakterienpepton	1,0% (w/v)
	Hefeextrakt	0,5% (w/v)
	NaCl	1,0% (w/v) $\hat{=}$ 172 mM
in ddH ₂ O lösen und auf pH 7 einstellen		
LB-Medium (fest)	wie LB (flüssig) mit zusätzlich 1,5% Bacto-Agar	
SOC-Medium	Bakterienpepton	2,0% (w/v)
	Hefeextrakt	0,5% (w/v)
	NaCl	10 mM $\hat{=}$ 0,058% (w/v)
	KCl	2,5 mM
	MgCl ₂	10 mM
	MgSO ₄	10 mM
	Glucose	20 mM
	in ddH ₂ O lösen und auf pH 7 einstellen, MgCl ₂ und MgSO ₄ aus sterilen Stammlösungen erst nach dem Autoklavieren zugeben (vgl. auch Hanahan (1983))	

5.1.4 Enzyme

Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen FERMENTAS (St. Leon-Rot), NEW ENGLAND BIOLABS (Frankfurt am Main) sowie ROCHE (Mannheim) bezogen.

Weiterhin wurden folgende Enzyme von den entsprechenden Firmen verwendet:

Enzym	Herkunft
AmpliTaq-Gold [®] DNA-Polymerase	APPLIED BIOSYSTEMS (Darmstadt)
<i>Taq</i> DNA Polymerase	BIOMASTER (Köln)
T3-RNA-Polymerase	STRATAGENE (La Jolla, USA)
T7-RNA-Polymerase	FERMENTAS (St. Leon-Rot)
T4-DNA-Ligase	PROMEGA(Mannheim)
Thermolysin	SIGMA-ADRICH (München)
Pepsin	SIGMA-ADRICH (München)
Lysozym	SERVA (Heidelberg)
DNase	ROCHE (Mannheim)

5.1.5 Längenstandards/Marker

Art	Bezeichnung	Herkunft
DNA Längenstandards	1 kB DNA Ladder	INVITROGEN (Karlsruhe)
	HyperLadder I	BIOLINE (Luckenwalde)
Proteinmarker	SDS-7	SIGMA-ADRIK (München)
	SDS-6B	SIGMA-ADRIK (München)
	HMW Native Marker Kit	GE-HEALTHCARE (Freiburg)
	PageRuler™	FERMENTAS (St. Leon Rot)

5.1.6 Reaktionskits

Bezeichnung	Herkunft
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	APPLIED BIOSYSTEMS (Darmstadt)
Nucleobond® AX	MACHERY-NAGEL (Düren)
NucleoSpin® Extract	MACHERY-NAGEL (Düren)
NucleoSpin® Plasmid	MACHERY-NAGEL (Düren)
TOPO TA Cloning® Kit	INVITROGEN (Karlsruhe)
pGEM®-T easy Kit	PROMEGA (Mannheim)

5.1.7 Säulenmaterialien und FPLC-Säulen

Bezeichnung	Art	Herkunft
MonoQ® 5/50	präparative IEX-Säule	GE-HEALTHCARE
MiniQ® PC 3.2/3	analytische IEX-Säule	GE-HEALTHCARE
Q Sepharose Fast Flow	Säulenmatrix (für Schwerkraftsäulen)	GE-HEALTHCARE
Ni Sepharose™ 6 Fast Flow	Säulenmatrix (für Schwerkraftsäulen)	GE-HEALTHCARE
Schwerkraftsäule	–	BIO-RAD (München)

5.1.8 Nukleotide/Oligonukleotide

Die Nukleotide/Oligonukleotide wurden von MWG BIOTECH (Martinsried), die RNA-Cap-Strukturanaloga von NEW ENGLAND BIOLABS (Frankfurt am Main) und Desoxyribonukleotide und Ribonukleotide von ROCHE (Mannheim) bezogen.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
TPP1-pBAT5	CCT GCA GTT CGT AGT TAT GGC GAT AAG
TPP2-pBAT5	CTG CAG TTA TGG CGA TTA GGG TTA CC
TPP3.5'PstI	CCA TTG CTG CAG TTG ATG ATG GTG ATG
TPP1.3'NotI	AGC GGC CGC TGT CAT GAA AC
TPP2.3'NotI	CAG CGG CCG CGG TCA AGA TAC
TPP3.3'NotI	CAT GCG GCC GCA AAA CGT TAC AAT ATG
TPP1 5' upper	CGT AGC CAT GGC GAT AAG AAT CAC TTT CAC
TPP2 5' upper	CCA TGG CGA TTA GGG TTA CCT TCA
TPP3.5'NcoI	GTC CAT GGT GGT GAT GAT ATC TCT TC
TPP1 3' lower	TCT TCT CGA GTG AAA CTG CAA CAG GTC C
TPP2 3' lower	GTT GCT CGA GAT ACA TCA ACA GCT C
TPP3.3'XhoI	GTT ACA ATA TCT CGA GTT GCT TAT CCA C
TPP1fC.5'BamHI	GTT CTG GAT CCA ATT CGT AGT TAT G
5'TPP2_FF2_BglII	CTT CAA GAT CTG CAT TTA TGG C
TPP3fC.5'BamHI	GGA TCC TTT CAG TTG ATG ATG GTG
TPP1fC.3'NcoI	CCA TGG AAA CTG CAA CAG GTC
3'TPP2_FF2_NcoI	GTT GCC ATG GAT ACA TCA ACA
TPP3fC.3'NcoI	CCA TGG ATC CAC AGC ACA GC
TPP1as102_NcoI	CCA TGG AAG CCT TGA AAG ATG AAA C
TPP2as97_NcoI	CCA TGG AGA TCA TAC CCA AG
TPP3as112_NcoI	CCA TGG AGG TAA AAT CCA ACC ATT C
16Esi.5'PstI	CCT GCA GAT GGC TCA GCA AGT GTC
5'PrimerpET26b	CGT CCA TAT GGC TCA GCA AGT GTC
3'PrimerpBAT	ATG CGG CCG CTT ACT TGT ACA G
3'PrimerpET26b	CAT CAC TCG AGC TTG TAC AGC TCG T

5.1.9 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp
DH5 α *	F ⁻ ϕ 80d Δ lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 endA1 recA1 hsdR17 (r _k ⁻ m _k ⁺) deoR thi-1 supE44 λ -gyrA96 relA1
BL21(DE3)**	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ , m _B ⁻) gal dcm (DE3)
Rosetta(DE3)pLysS**	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ , m _B ⁻) gal dcm (DE3)pLysSRARE ² (Cam ^R)

* Hanahan (1983); ** NOVAGEN (Darmstadt)

5.1.10 Vektoren

Vektor	Resistenz	Herkunft
pBSC KS ⁻	Amp ^R	STRATAGENE (La Jolla, USA)
pBSC M13 ⁻	Amp ^R	STRATAGENE (La Jolla, USA)
pBAT	Amp ^R	Annweiler et al. (1991)
pCR [®] 2.1-TOPO [®]	Amp ^R , Kan ^R	INVITROGEN (Karlsruhe)
pGEM [®] -T easy	Amp ^R	PROMEGA (Mannheim)
pET-19b	Amp ^R	NOVAGEN (Darmstadt)
pET-26b	Kan ^R	NOVAGEN (Darmstadt)
pET-28a	Kan ^R	NOVAGEN (Darmstadt)
pRT-Ω/Not/Asc	Amp ^R	Überlacker & Werr (1996)
pRT-Ω/Not/Asc::EYFP	Amp ^R	Baudisch (2006)
pBAT::EYFP	Amp ^R	Baudisch (2006)

5.1.11 cDNA-Klone für die *in vitro* Transkription und *in vitro* Translation

Klon	Vektor	Orientierung	Linearisierung	beschrieben in
23/23	pBAT	T3 → T7	NotI	Molik (2005)
Rie/Rie	pBAT	T3 → T7	NotI	Molik (2005)
PC/PC	pBSC M13 ⁻	T3 → T7	PstI	Clausmeyer et al. (1993)
16/23	pBSC M13 ⁻	T3 → T7	NotI	Clausmeyer et al. (1993)
16/EGFP	pBSC M13 ⁻	T3 → T7	NotI	Marques et al. (2003)
16/EGFP	pBAT	T3 → T7	NotI	dieser Arbeit
i16/EGFP	pBAT	T3 → T7	NotI	dieser Arbeit
TPP1	pBAT	T3 → T7	NotI	dieser Arbeit
TPP2	pBAT	T3 → T7	NotI	dieser Arbeit
TPP3	pBAT	T3 → T7	NotI	dieser Arbeit
TPP1-AS/EYFP	pBAT	T3 → T7	NotI	dieser Arbeit
TPP2-AS/EYFP	pBAT	T3 → T7	NotI	dieser Arbeit
TPP3-AS/EYFP	pBAT	T3 → T7	NotI	dieser Arbeit
TPP1/EYFP	pBAT	T3 → T7	NotI	dieser Arbeit
TPP3/EYFP	pBAT	T3 → T7	NotI	dieser Arbeit

5.1.12 Klone für die heterologe Überexpression in *E.coli*

Klon	Vektor	Expressionsstamm	beschrieben in/erhalten von
16/EGFP	pET-26a	BL21(DE3)	AG Klösgen
i16/EGFP	pET-26b	Rosetta(DE3)pLysS	diese Arbeit
EGFP	pET-19b	Rosetta(DE3)pLysS	H. Pultke
EGFP (His-Tag)	pET-28a	Rosetta(DE3)pLysS	diese Arbeit
TPP1	pET-28a	Rosetta(DE3)pLysS	diese Arbeit
TPP2	pET-28a	Rosetta(DE3)pLysS	diese Arbeit
TPP3	pET-28a	Rosetta(DE3)pLysS	diese Arbeit

5.1.13 Klone für die *in vivo* Analysen

Klon	Vektor	beschrieben in
TPP1-AS/EYFP	pRT- Ω /Not/Asc	dieser Arbeit
TPP2-AS/EYFP	pRT- Ω /Not/Asc	dieser Arbeit
TPP3-AS/EYFP	pRT- Ω /Not/Asc	dieser Arbeit
TPP1/EYFP	pRT- Ω /Not/Asc	dieser Arbeit
TPP3/EYFP	pRT- Ω /Not/Asc	dieser Arbeit

5.1.14 Antikörper

Antikörper	Bemerkung	Herkunft
α 16/EGFP*	aus Kaninchen	M. Jakob
α 23/EGFP*	aus Kaninchen	M. Jakob
α RabbitIgG-HRP	sekundärer Antikörper	SIGMA-ADRIK (München)
Streptavidin-HRP	Antikörper gegen 6B-Marker	SIGMA-ADRIK (München)

* Die Basis dieser Antikörper bildeten überexprimiertes 16/EGFP und 23/EGFP, welche mittels Elektrolution und anschließender HPLC gereinigt wurden. Die Antikörper selbst wurden nach einem Protokoll von [Narhi et al. \(1997\)](#) gereinigt.

5.1.15 „Tag“-freies EGFP

Für erste Versuche mit einer EGFP-Referenz wurde gereinigtes EGFP verwendet, was freundlicherweise von Heiko Pultke (Biotechnologie, MLU-Halle) zur Verfügung gestellt wurde. Später wurde eine eigene EGFP-Referenz mit C-terminalem His-Tag kloniert.

5.2 Methoden

5.2.1 Pflanzenanzucht

Zur Präparation von Chloroplasten und Thylakoiden wurden Erbsenkeimlinge (*Pisum sativum*, var. „Feltham First“) kultiviert. Diese wurden nach 7–14 Tagen geerntet, wobei die Blätter der Keimlinge noch geschlossen waren. Die Anzucht der Spinatchloroplasten ist in [Molik \(2005\)](#) nachzulesen.

Arabidopsis thaliana (L.) HEYNH. Ökotyp Columbia (col-0 bzw. col-5-13) wurde in Erde unter Kurztagsbedingungen (8 h Licht/16 h Dunkelheit) kultiviert. Die Blüten- und Samenbildung erfolgte unter Langtagbedingungen (16 h Licht/8 h Dunkelheit).

5.2.2 Anzucht und Transformation der *E.coli* Zellen

5.2.2.1 Herstellung elektrokompeter Zellen

Die Hauptkultur (500 ml LB) wurde mit 5 ml Übernachtskultur (20 ml LB) angeimpft und bei 37°C bis zu einer $OD_{600} = 0,5-0,7$ wachsen gelassen. Nach einer zehnminütigen Ruhephase bei 4°C wurden die Zellen 15 min bei 4000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 500 ml sterilem, auf 4°C vorgekühltem ddH₂O resuspendiert. Nach der erneuten Zentrifugation 15 min bei 4°C und 4000 x g wurde das Pellet in 250 ml eiskaltem ddH₂O aufgenommen und erneut 15 min bei 4°C und 4000 x g zentrifugiert. Dieses Bakterienpellet wurde nun in 1,5 ml eiskaltem 10%igem (v/v) Glycerin aufgenommen, zu je 40 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

5.2.2.2 *E.coli* Transformation mittels Elektroporation

Die Transformationsküvetten (BIOZYM, Oldendorf) wurden zunächst auf Eis vorgekühlt. Zur Transformation wurden 40 µl elektrokompeter Zellen mit 1–5 µl zu transformierender Lösung (z.B. Plasmid-DNA oder Ligationsansatz) versetzt, gemischt und mit „E.coli Pulser“ (BIO-RAD, München) bei 1,8 kV transformiert. Nach der Transformation wurden sofort 960 µl SOC-Medium zugegeben, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 30–60 min bei 37°C inkubiert. Je nach erwartetem Transformationserfolg wurden zunächst 100 µl auf LB-Antibiotika-Platten ausplattiert. Die restlichen 900 µl wurden kurz sedimentiert (30 s, 10 000 x g) und wiederum in 200–300 µl SOC-Medium aufgenommen und ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.2.2.3 Herstellung Hitzeschock-kompeter Zellen

Die Hauptkultur (500 ml LB) wurde mit 5 ml Übernachtskultur (20 ml LB) angeimpft und bei 37°C bis zu einer $OD_{600} = 0,5-0,7$ wachsen gelassen. Nach einer zehnminütigen

Ruhephase bei 4°C wurden die Zellen 15 min bei 4000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 25 ml eiskalter CaCl₂-Lösung (50 mM CaCl₂) resuspendiert und anschließend erneut 15 min bei 4000 x g und 4°C zentrifugiert. Dieses Bakterienpellet wurde in 2,5 ml CaCl₂-Lösung (50 mM CaCl₂) gelöst und 1h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 2,5 ml glycerinhaltiger CaCl₂-Lösung (50 mM CaCl₂, 40% (v/v) Glycerin) zugegeben und vorsichtig gemischt. Die Zellen wurden in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

5.2.2.4 *E. coli* Transformation mittels Hitzeschock

Der Transformationsansatz, bestehend aus 100 µl hitzeschockkompetenter Zellen und der zu transformierenden Lösung (z.B. Plasmid-DNA oder Ligationsansatz), wurde 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 1–2 min im Wasserbad auf 42°C erhitzt. Anschließend wurden sofort 900 µl eiskaltes LB-Medium zugegeben und der gesamte Ansatz 60 min bei 37°C inkubiert und auf LB-Antibiotikaplatten ausplattiert (vgl. Elektroporation).

5.2.3 Molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Methoden wurden, sofern nicht separat aufgeführt, nach den Protokollen aus Sambrook & Russell (2001) durchgeführt. Für die DNA-Präparation (im Mini- und Midi-Maßstab), die Sequenzierung und die TOPO TA-Klonierung wurden Kits verwendet (vgl. Abschnitt 5.1.6, S. 112). Die Selektion positiver Klone erfolgte, sofern möglich, primär über das Antibiotikum und zum anderen durch Kolonien-PCR.

5.2.3.1 Klonierung der cDNAs für die *in vitro* Transkription und *in vitro* Translation

Das i16/EGFP wurde durch PCR basierend auf der cDNA von Marques et al. (2003) (vgl. Abschnitt 5.1.11, S. 114) amplifiziert und mittels des pGEM[®]-T easy Kits (vgl. Abschnitt 5.1.6, S. 112) in den Vektor pGEM[®]-T easy kloniert. Die entsprechenden Fragmente wurden anschließend mit PstI/NotI ausgeschnitten und in den vorgeschrittenen pBAT-Vektor umklontiert.

Die TPP3 wurde basierend auf der cDNA-Bank (186B23, Bo Hou) auf die gleiche Weise amplifiziert. Für die TPP1 und TPP2 diente die entsprechende cDNA (J. Marques, AG Klösgen) als PCR-Vorlage.

Für die EYFP-Konstrukte wurden die entsprechenden Fragmente erneut per PCR amplifiziert und unter Verwendung des TOPO TA Cloning[®] Kits in den pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor kloniert. Aus diesem wurden sie mit BamHI/NcoI herausgeschnitten und in den mit BamHI/NcoI vorgeschrittenen pBAT::EYFP-Vektor kloniert. Dieser pBAT-Vektor

enthält bereits das EYFP als Reporter mit einer NcoI-Schnittstelle am Startmethionin. Dadurch war es möglich alle nötigen TPP-Fusionen durch die Verwendung einer entsprechenden 3'NcoI-Schnittstelle „in frame“ zu klonieren. Der entsprechend modifizierte pBAT::EYFP-Vektor wurde von Bianca Baudisch zur Verfügung gestellt.

Bei den hier beschriebenen Klonierungen wurde als Transformationsmethode die Elektroporation elektrokompenter DH5 α -Zellen verwendet.

5.2.3.2 Klonierung in die Expressionsvektoren

Die Umklonierung in die Expressionsvektoren erfolgte mit entsprechend modifizierten Primern. Nach der PCR und der Klonierung in den pGEM[®]-T easy-Vektor wurden die entsprechenden Fragmente aus diesem Vektor ausgeschnitten, gereinigt und in den entsprechenden pET-Vektor kloniert. Die Vektoren (inkl. Insert) wurden dann in die Expressionsstämme durch Hitzeschock-Transformation transferiert. Das EGFP wurde direkt aus dem pET-19b Vektor herausgeschnitten (NcoI/XhoI) und in den pET-28a umkloniert.

5.2.3.3 Klonierung für die *in vivo* Analysen

Die Klonierung der TPP/EYFP Konstrukte in den pRT- Ω /Not/Asc-Vektor erfolgte analog der Klonierung in den pBAT-Vektor. Die entsprechenden Fragmente wurden per PCR amplifiziert und nach Umklonierung in den pCR[®] 2.1-TOPO[®]-Vektor, nach Amplifikation, Restriktion (BamHI/NcoI) und Reinigung in den entsprechend vorgeschrittenen pRT- Ω /Not/Asc::EYFP-Vektor kloniert. Wie schon beim pBAT::EYFP-Vektor wurde auch dieser Vektor von Bianca Baudisch zur Verfügung gestellt.

5.2.3.4 Übersicht der Klonierungen

Konstrukt	5' Primer	3' Primer	*	Zielvektor
für <i>in vitro</i> Transkription und Translation				
i16/EGFP	16Esi_5'PstI	3'PrimerpBAT	P	pBAT
TPP1	TPP1-pBAT5	TPP1_3'NotI	P	pBAT
TPP2	TPP2-pBAT5	TPP2_3'NotI	P	pBAT
TPP3	TPP3_5'PstI	TPP3_3'NotI	P	pBAT
TPP1/EYFP	TPP1fC_5'BamHI	TPP1fC_3'NcoI	T	pBAT::EYFP
TPP2/EYFP	5'TPP2_FF2_BglII	3'TPP2_FF2_NcoI	T	pBAT::EYFP
TPP3/EYFP	TPP3fC_5'BamHI	TPP3fC_3'NcoI	T	pBAT::EYFP
TPP1-AS/EYFP	TPP1fC_5'BamHI	TPP1as102_NcoI	T	pBAT::EYFP
TPP2-AS/EYFP	5'TPP2_FF2_BglII	TPP2as97_NcoI	T	pBAT::EYFP
TPP3-AS/EYFP	TPP3fC_5'BamHI	TPP3as112_NcoI	T	pBAT::EYFP

Konstrukt	5' Primer	3' Primer	*	Zielvektor
für <i>in vivo</i> Analysen				
TPP1/EYFP	TPP1fC_5'BamHI	TPP1fC_3'NcoI	T	pRT- Ω /Not/Asc::EYFP
TPP2/EYFP	5'TPP2_FF2_BglII	3'TPP2_FF2_NcoI	T	pRT- Ω /Not/Asc::EYFP
TPP3/EYFP	TPP3fC_5'BamHI	TPP3fC_3'NcoI	T	pRT- Ω /Not/Asc::EYFP
TPP1-AS/EYFP	TPP1fC_5'BamHI	TPP1as102_NcoI	T	pRT- Ω /Not/Asc::EYFP
TPP2-AS/EYFP	5'TPP2_FF2_BglII	TPP2as97_NcoI	T	pRT- Ω /Not/Asc::EYFP
TPP3-AS/EYFP	TPP3fC_5'BamHI	TPP3as112_NcoI	T	pRT- Ω /Not/Asc::EYFP
für heterologe Expression in <i>E. coli</i>				
i16/EGFP	5'PrimerpET26b	3'PrimerpET26b	P	pET26b
TPP1	TPP1 5' upper	TPP1 3' lower	P	pET28a
TPP2	TPP2 5' upper	TPP2 3' lower	P	pET28a
TPP3	TPP3_5'NcoI	TPP3_3'XhoI	P	pET28a

* Klonierungsvektor: pGEM[®]-T easy (P) bzw. -pCR[®] 2.1-TOPO[®] (T)

5.2.3.5 Kolonien-PCR

Zur Identifikation positiver Klone wurde ein Teil einzelner Klone (Kandidaten) mittels eines Holzstäbchens gepickt und im Reaktionsansatz gewendet. Der Reaktionsansatz wurde anschließend einer PCR (spezifisch für das gesuchte Fragment) unterzogen und 5 μ l nach der Reaktion mit 5 μ l 2x DNA-Ladepuffer versetzt und im Agarosegel bei 50 V getrennt. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist im Folgenden dargestellt:

5 μ l	5' Primer (12 pmol/ μ l)
5 μ l	3' Primer (12 pmol/ μ l)
2,5 μ l	dNTPs (je 25 mM)
25 μ l	10x PCR-Puffer (inkl. MgCl ₂)
5 μ l	<i>Taq</i> -Polymerase (2,5 U/ μ l)
207,5 μ l	ddH ₂ O
250 μ l	Gesamtvolumen

5.2.3.6 *In vitro* Transkription

Die in der *in vitro* Transkription eingesetzte Plsmid-DNA wurde zunächst mit Hilfe des *NucleoSpin[®] Plasmid*- bzw. *Nucleobond[®] AX*-Kits gereinigt und zur effizienteren Transkription hinter dem 3' Ende der cDNA durch Restriktionsverdau linearisiert (vgl. Abschnitt 5.1.11, S. 114). Die Transkriptionsreaktion setzt sich wie folgt zusammen:

2,0 µl	linearisierte DNA (1 µg/µl)
3,3 µl	H ₂ O (DEPC-behandelt)
5,0 µl	5x T3-Puffer
5,0 µl	5x NTPs red. GTP
7,5 µl	100 mM DTT
1,2 µl	CAP-Struktur analogon (10 mM m ⁷ G(5')ppp(5')G)
0,5 µl	RNase-Inhibitor (FERMENTAS (St. Leon Rot))
0,5 µl	T3 RNA-Polymerase (STRATAGENE (La Jolla, USA))
<hr/>	
25 µl	Gesamtvolumen

Der Transkriptionsansatz wurde 60 min bei 37°C und 600 U/min (Thermomixer comfort, EPPENDORF (Hamburg)) inkubiert, anschließend 1 µl 11,25 mM GTP zugegeben und der Ansatz weitere 30 min bei 37°C und 600 U/min inkubiert. Danach wurde der Ansatz mit H₂O (DEPC-behandelt) auf 100 µl aufgefüllt und 4 µl davon auf ein 1,5%iges Agarosegel (in 1x TAE) aufgetragen und bei 50 V elektrophoretisch getrennt. Der übrige Translationsansatz wurde mit 5 µl 4 M Ammoniumacetat und 250 µl Ethanol bei -20°C gefällt.

5.2.3.7 *In vitro* Translation

Für einen einfachen Translationsansatz wurden 15 µl der gefällten DNA 30 min bei 4°C und 15 000 xg zentrifugiert, das Pellet 5 min bei Raumtemperatur getrocknet und das getrocknete Pellet mit 25 µl des *in vitro* Translationsansatzes versetzt und 90 min bei 30°C inkubiert. Der Translationsansatz ist wie folgt zusammengesetzt:

9,3 µl	H ₂ O (DEPC-behandelt)
1,2 µl	1 M KCl
0,5 µl	100 mM Aminosäuremix (ohne Methionin)
0,5 µl	100 mM DTT
1,0 µl	³⁵ S-Methionin
12,5 µl	Retikulocytenlysat PROMEGA (Mannheim)
<hr/>	
25 µl	Gesamtvolumen

Die Translationsansätze können nach der Inkubation bei -80°C gelagert bzw. je 0,5–1 µl zum Test einer SDS-PAGE unterzogen werden.

5.2.3.8 Sequenzierung

Die Sequenzierungsreaktionen wurden mit Hilfe des BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (vgl. Abschnitt 5.1.6, S. 112) anhand des Herstellerprotokolls durchgeführt. Die eigentliche Sequenzierung wurde vom Institut für Genetik (MLU-Halle) durchgeführt.

5.2.4 Biochemische Methoden

5.2.4.1 TCA-Fällung

Bei der denaturierenden Proteinfällung mittels TCA wurde die proteinhaltige Lösung mit 0,4 Volumen 73%iger (w/v) TCA-Lösung (bezogen auf die Proteinlösung) versetzt, gemischt und 30 min auf Eis bzw. bei -20°C inkubiert und im Anschluss 30 min bei 4°C und 19 000 U/min (SORVALL Super T21; ST-Micro-Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, neutralisiert und verworfen. Das Pellet wurde mit 1 ml kaltem 80%igem Aceton (v/v) gewaschen und 10 min bei 4°C 16 000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und dieser Waschschrift nochmals wiederholt. Das Pellet wurde abschließend getrocknet, in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen (siehe 5.2.4.4, S. 122) und ggf. zum Lösen des Pellets bei Raumtemperatur geschüttelt (1 h bzw. über Nacht, Thermomixer comfort, EPPENDORF (Hamburg)). Im Fall der Herstellung der denaturierten EGFP-Substrate wurden diese TCA-gefällt und anschließend in 8 M Harnstoff (anstelle von Probenpuffer) gelöst.

5.2.4.2 Proteinbestimmung nach Gill & von Hippel

Bei dieser von Gill & von Hippel (1989) entwickelten Art der Proteinbestimmung über das UV/VIS-Spektrum wurde ein proteinspezifischer molarer Extinktionskoeffizient anhand der spezifischen Extinktionskoeffizienten der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Cystein bei 280 nm berechnet. Voraussetzung für diese Methode ist einerseits eine sehr hohe Reinheit der zu messenden Probe ($>95\%$) und andererseits muss die Proteinsequenz bekannt sein, um die Anzahl der entsprechenden Aminosäuren zu bestimmen.

5.2.4.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford wurde entsprechend der Literaturangabe (Bradford, 1976) durchgeführt. Dabei wurden 800 μl proteinhaltige Lösung mit 200 μl Bradford Reagenz versetzt und nach 5 min Inkubation bei RT die Absorption bei 595 nm gemessen (SHIMADZU UV-1602). Anhand einer Eichgerade, die mit eine BSA-Verdünnungsreihe erstellt wurde, kann anschließend die Proteinkonzentration bestimmt werden.

5.2.4.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die verwendete SDS-PAGE orientiert sich an der Methode von [Laemmli \(1970\)](#). Dabei kamen Gradientengele mit einem Gradient von 10–17,5% PAA bzw. Minigele (HOEFER-Gelsystem) mit isokratischer PAA-Konzentration zum Einsatz.

Lösungen:

30% Acrylamidlösung	Acrylamid	29,2% (w/v)
	Methylenbisacrylamid	0,8% (w/v)
in ddH ₂ O lösen und Zugabe von 20 g SERDOLIT [®] , über Nacht rühren und anschließend filtrieren		
4x Probenpuffer	Tris/HCl pH 6,8	250 mM
	Glycerin	40% (v/v)
	SDS	8% (w/v)
	β -Mercaptoethanol	20% (v/v)
	Bromphenolblau	0,016% (w/v)
10x SDS-Laufpuffer	Tris/HCl pH 6,8	250 mM
	Glycin	1,95 M
	SDS	1%
Der pH wurde nach dem Lösen in ddH ₂ O nicht nachgestellt!		

Pipettierschema für ein Midi-Gradientgel (20 cm x 20 cm x 1mm):

PAA (final)	10%	17,5%	isokratisch (15%)	Sammelgel (5%)
H ₂ O	9,75 ml	–	14,3 ml	14 ml
30% Acrylamid	8 ml	14 ml	24 ml	3,33 ml
Saccharose (80% (w/v))	1,4 ml	5,15 ml	–	–
2 M Tris/HCl pH 8,8	4,5 ml	4,5 ml	9 ml	–
1 M Tris/HCl pH 6,8	–	–	–	2,4 ml
10% SDS	240 μ l	240 μ l	480 μ l	200 μ l
10% APS	100 μ l	100 μ l	200 μ l	160 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l	20 μ l	16 μ l
Gesamtvolumen	24 ml	24 ml	48 ml	20 ml

Pipettierschema für 4 Mini-Gele (HOEFER-System; 10 cm x 8 cm x 0,75 mm):

PAA (final)	10%	15%	17%	Sammelgel (5%)
H ₂ O	14 ml	9 ml	6,5 ml	6,95 ml
30% Acrylamid	10 ml	15 ml	17,5 ml	1,66 ml
2 M Tris/HCl pH 8,8	5,5 ml	5,5 ml	5,5 ml	–
1 M Tris/HCl pH 6,8	–	–	–	1,2 ml
10% SDS	300 µl	300 µl	300 µl	100 µl
10% APS	180 µl	180 µl	180 µl	80 µl
TEMED	18 µl	18 µl	18 µl	8 µl
Gesamtvolumen	30 ml	30 ml	30 ml	10 ml

5.2.4.5 Native Gelelektrophorese (BN-PAGE, CN-PAGE)

Zur Auftrennung von Membrankomplexen der Thylakoidmembran wurde die *Blue Native*-PAGE (BN-PAGE) und zur Trennung der löslichen Proteinkomplexe des Stromas die *Colorless-Native*-PAGE (CN-PAGE) verwendet (Schägger & von Jagow, 1991; Schägger et al., 1994). Beide Elektrophoresen wurden entsprechend der Protokolle von Berghöfer & Klösgen (1999) und Molik (2005) durchgeführt.

5.2.4.6 Coomassie-Colloidal-Färbung

Die Färbung von Proteinen in PAA-Gelen nach der SDS-PAGE wurde nach dem Protokoll von Neuhoff et al. (1985) durchgeführt.

5.2.4.7 Silberfärbung

Die Proteinfärbung mit Hilfe der Silberfärbung wurde basierend auf den Arbeiten von Merril et al. (1981) nach dem in Molik (2005) beschriebenen Protokoll durchgeführt.

5.2.4.8 Western-Analyse**Transfer:**

Der Transfer der Proteine aus den Polyacrylamidgelen auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P[®], MILLIPORE (Billerica, USA)) erfolgte mit Hilfe einer *Semi Dry-Blot* Apparatur (*HEP-3 Semi Dry Electroblothing System*) von THERMO SCIENTIFIC (Rochester, USA) und wurde entsprechend dem Herstellerprotokoll (*Immobilon-P Transfer Membrane User Guide*) durchgeführt. Dabei wurde der Blot bei 2,5 mA/cm² über einen Zeitraum von 2 h durchgeführt.

ECL-Entwicklung:

10x PBS	NaCl	1,37 mM
	KCl	27 mM
	Na ₂ HPO ₄	100 mM
	KH ₂ PO ₄	20 mM
Lösung I	1x PBS	–
	Tween 20	0,05% (v/v)
	Magermilchpulver	5% (w/v)
Lösung II	1x PBS	–
	Tween 20	0,05% (v/v)
ECL-Entwicklerlösung	1 M Tris/HCl pH 8,3	500 µl
	250 mM Luminol (in DMSO)	50 µl
	90 mM Coumarinsäure (in DMSO)	22 µl
	30% H ₂ O ₂ (8,8 M)	3 µl
	mit ddH ₂ O auf 10 ml auffüllen	

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurden die Membran kurz mit ddH₂O gewaschen und anschließend in Lösung I für 2 h inkubiert, um spezifische Bindungsstellen abzusättigen (Blockierung). Dann wurde die Membran weitere 2 h mit dem primären Antikörper inkubiert (Antikörper in Lösung I), anschließend 3x 10 min mit Lösung I gewaschen und im Anschluss daran 1 h mit dem sekundären Antikörper inkubiert (α RabbitIgG-HRP – 1:30 000, Streptavidin-HRP – 1:10 000, jeweils in Lösung I). Im Anschluss wurde die Membran 3x 10 min mit Lösung II gewaschen. Die ECL-Entwicklerlösung wurde vor jeder Entwicklung frisch hergestellt, wobei die Stammlösungen von Luminol und Coumarinsäure bei –20°C gelagert wurden. Die Membran wurde 1 min mit der Entwicklerlösung inkubiert, anschließend in Frischhaltefolie eingeschlagen und auf einen ECL-Film (Hyperfilm[®]-ECL, GE-HEALTHCARE) aufgelegt und je nach erwarteter Signalintensität zwischen 5 und 60 min in einer Filmkassette exponiert.

5.2.5 Heterologe Überexpression in *E. coli*

5.2.5.1 Analytische Überexpression in *E. coli*

Bei der Expressionsanalyse im analytischen Maßstab wurden 5 ml LBG (LB-Medium mit 0,5% (w/v) Glucose, inkl. Antibiotikum) mit je 1/50 (100 µl) einer Übernachtskultur (5 ml LBG) angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ = 1 bei 37°C inkubiert. Nun wurde 1 ml Kultur entnommen, 1 min bei 16 000 x g zentrifugiert und das Pellet in 150 µl 4x Laemmli-

Lösungen:

Puffer A (pH 8,0)	Tris/HCl	20 mM
	Saccharose	20% (w/v)
	EDTA	2 mM
Puffer B (pH 8,0)	Tris/HCl	50 mM
	EDTA	2 mM
Lysozym	in Puffer B	10 mg/ml

Probenpuffer (vgl. Abschnitt 5.2.4.4, S. 122) aufgenommen (*Minus-Fraktion*). Die restlichen 4 ml Kultur wurden mit final 1 mM IPTG induziert und weitere 3 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde erneut 1 ml Kultur entnommen, 1 min bei 16 000 x g zentrifugiert und das Pellet erneut in 150 µl 4x Laemmli-Probenpuffer (*Plus-Fraktion*) aufgenommen. Die restlichen 3 ml Kultur wurden nun zur Subfraktionierung verwendet:

Dazu wurden die Bakterienzellen durch Zentrifugation (1 min, 16 000 x g) sedimentiert, in 1 ml Puffer A resuspendiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 16 000 x g) wurde der Überstand einer TCA-Fällung unterzogen (vgl. Abschnitt 5.2.4.1, S. 121) und dabei in final 50 µl 4x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen (*Periplasmafraktion*). Das Pellet wurde mit Puffer B resuspendiert und mit 100 µl Lysozym (10 mg/ml, in Puffer B) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Ansatz wurde anschließend in flüssigen Stickstoff eingefroren und danach wieder bei 37°C (Wasserbad) aufgetaut. Dieser Gefrier/Tau-Zyklus wurde zweimal wiederholt und der Ansatz bei 5 min 2 500 x g zentrifugiert, das Pellet in 100 µl 2x Laemmli-Probenpuffer gelöst (*Fraktion der inclusion bodies*). Der Überstand wurde wie schon im Fall des Periplasmas TCA-gefällt und in final 50 µl 4x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen (*Cytoplasma-Fraktion*). Die gewonnenen Fraktionen wurden, wie im Folgenden dargestellt, auf ein SDS-Gel aufgetragen (Midi-SDS-Gel, vgl. Abschnitt 5.2.4.4, S. 122). Die aufgetragene Menge ist dabei vom Verwendungszweck (Proteinfärbung oder Western-Analyse) anhängig:

Fraktion	Proteinfärbung	Western-Analyse
Minus	30 µl	5 µl
Plus	30 µl	5 µl
Periplasma	10 µl	2 µl
Cytosol	10 µl	2 µl
<i>inclusion bodies</i>	20 µl	3 µl

5.2.5.2 Präparative Überexpression in *E.coli* und Reinigung der *inclusion bodies*

Die Expression von Proteinen im präparativen Maßstab wurde basierend auf einem Protokoll durchgeführt, wie es in [Rudolph et al. \(1997\)](#) beschrieben ist.

Lösungen:

LBG (flüssig)	LB + 0,5% (w/v) Glucose	vgl. Abschnitt 5.1.3 , S. 110
Homogenisationspuffer	Tris/HCl	100 mM
	EDTA	1 mM
	pH 7,0 mit HCl einstellen, Lagerung bei 4°C	
Membranwaschpuffer	NaCl	1,5 M
	Triton X-100	6% (v/v)
	EDTA	60 mM
Waschpuffer	Tris/HCl	100 mM
	EDTA	20 mM
	pH 7,0 mit HCl einstellen, Lagerung bei 4°C	
Denaturierungspuffer	Guanidin/HCl	6 M
	Glycin	20 mM
	DTT	1 mM
	EDTA	1 mM
pH 2,5 mit HCl einstellen, Lagerung bei 4°C		

Zur Expression wurden 500 ml LBG-Medium (inkl. dem entsprechenden Antibiotikum) mit 5 ml einer Übernachtskultur (5–20 ml LBG) angeimpft und bis zu einer $OD_{600} = 1$ bei 37°C inkubiert. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von final 1 mM IPTG. Anschließend wurde die induzierte Expressionskultur weitere 3 h bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen 15 min auf 4°C abgekühlt, 30 min bei 4°C und 4000 U/min (SORVALL Super T21; SLC-750T-Rotor) zentrifugiert. Die sedimentierten Bakterien wurden in 25 ml Homogenisationspuffer pro 5 g Frischgewicht vorsichtig resuspendiert, Lysozym zugegeben (1,5 mg Lysozym pro g Frischgewicht) und 30 min bei 4°C inkubiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch zweimalige „French Press“ (SIM-AMINGOR, SPECTROMIC INSTRUMENTS, French-Pressure-Cell FA-031). Die bei dem Aufschluss der Zellen freigesetzte DNA wurde durch Zugabe von DNase (2,4 U pro ml „French Press“-Lösung und 3 mM $MgCl_2$) und 20 minütiger Inkubation bei 25°C abge-

baut. Zum Waschen der *inclusion bodies* wurde nun 0,5 Volumen Membranwaschpuffer zugegeben. Nach 30 minütiger Inkubation auf einem Drehrad bei 4°C wurden die *inclusion bodies* 15 min bei 4°C und 31 000 x g zentrifugiert und mit Hilfe des Polytron® PT3000 (KINEMATICA® (Littau-Lucerne, Schweiz), Polytron PT-DA 3007/2) bei 12 000–14 000 U/min in 40 ml Waschpuffer resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde 4x wiederholt, um das Triton möglichst vollständig zu entfernen. Die gereinigten *inclusion bodies* wurden abschließend 15 min bei 4°C und 31 000 x g zentrifugiert. Die Pellets können mehrere Wochen bei –20°C gelagert bzw. direkt in Denaturierungspuffer oder 8 M Harnstoff aufgenommen werden. Das Lösen des Pellets erfolgte durch Resuspendieren mittels des Polytron® PT3000 mit nachfolgender Inkubation über Nacht auf einem Drehrad bei Raumtemperatur. Nach Zentrifugation für 30 min bei 25°C und 31 000 x g konnte der Überstand für weitere Reinigungsschritte bzw. Rückfaltungsansätze verwendet werden.

5.2.6 Rückfaltung der EGFP-Substrate

Die Rückfaltung der EGFP-Substrate erfolgte über einen Verdünnungssprung in Kombination mit einem pH-Sprung. Dabei wurden 25–30 ml gereinigte *inclusion bodies*, welche zuvor in einem sauren Denaturierungspuffer gelöst wurden (siehe 5.2.5.2, S. 126), mit Hilfe einer Pumpe (ISMATEC ISM297D) und einer Flussrate von 30–50 µl/min in 1 Liter Neutralpuffer bei 4°C unter Rühren getropft (50 mM HEPES/KOH pH 7,5–8,0). Nach Ende der Eintropfzeit wurde der Ansatz weitere 8–12 h bei 4°C gerührt. Im Anschluss an die Rückfaltung wurde ausgefallenes Protein durch Filtration und anschließender Zentrifugation (30 min, 4°C, 7 500 U/min; SORVALL Super T21; SLC-750T-Rotor) entfernt.

5.2.7 Ni-Affinitätschromatographie

Zur Ni-Affinitätschromatographie wurde die Ni-Sepharose™ 6 Fast Flow Matrix von GE-HEALTHCARE (Freiburg) verwendet. Bei der Vorbereitung der Matrix wurde nach dem

Lösungen:

Bindepuffer	Na ₂ HPO ₄	20 mM
	NaCl	500 mM
	Imidazol	5 mM
	pH 7,0 mit HCl einstellen, Lagerung bei 4°C	
Elutionspuffer	Na ₂ HPO ₄	20 mM
	NaCl	500 mM
	Imidazol	500 mM
	pH 7,0 mit HCl einstellen, Lagerung bei 4°C	

Herstellerprotokoll vorgegangen. Die Reinigung selbst wurde im „BATCH“-Verfahren durchgeführt. Dies bedeutet, dass die vorbereitete Matrix (2–4 ml) direkt zum Rückfaltungsansatz gegeben und dieser Ansatz über 8–12 h bei 4°C unter Rühren inkubiert wurde. Dabei musste darauf geachtet werden, dass das aus dem Denaturierungspuffer stammende EDTA (0,03–0,05 mM) durch 0,1 mM MgCl₂ gebunden wurde. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurde das Rühren eingestellt und der Ansatz 2–3 h bei 4°C ruhen gelassen. Die sedimentierte Matrix konnte anschließend mit einer Glaspipette vom Boden des Gefäßes aufgenommen, auf eine Schwerkraftsäule (BIO-RAD (München)) gegeben und das Matrixvolumen abgeschätzt werden. Nach dem Waschen der Matrix mit dem 2–3 fachen Matrixvolumen (meist 4–5 ml) Bindepuffer, wurden die gebundenen EGFP-Substrate mit zwei Matrixvolumen Elutionspuffer eluiert und gegen 20 mM Phosphatpuffer pH 7,5, 50 mM NaCl bzw. 3 M Harnstoff, 20 mM Tris/HCl pH 7,5 dialysiert. Nach Ultrazentrifugation (60 min, 4°C, 50 000 U/min, BECKMANN Optima™ MAX Ultrazentrifuge, MLA-80-Rotor) wurde der Überstand (nach Proteinkonzentrationsbestimmung) in 250 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80°C gelagert.

5.2.8 Ionenenaustauschchromatographie (FPLC)

Lösungen:

Eluent A	Tris/HCl	20 mM
	Harnstoff	3 M
	pH 7,5 mit HCl einstellen, vor Verwendung entgasen	
Eluent B	Tris/HCl	20 mM
	Harnstoff	3 M
	NaCl	500 mM
	pH 7,5 mit HCl einstellen, vor Verwendung entgasen	

Die Ionenaustauschchromatographie (IEX) wurde mit Hilfe des Ettan-*LC* Systems (Box-900, pH/C-900, UV-900, P-905, Fraktionssammler Frac-950) von GE-HEALTHCARE (Freiburg) durchgeführt. Die dabei verwendeten Säulen waren die MiniQ[®] PC 3.2/3 (analytischer Maßstab) und MonoQ[®] 5/50 (präparativer Maßstab). Die bei der Chromatographie verwendeten Lösungen wurden vor der Benutzung entgast. Die Verwendung von 3 M Harnstoff in den Eluenten verhinderte das Ausfallen der EGFP-Substrate während der Chromatographie. Die Proteinkonzentration der EGFP-Substrate betrug 5–10 mg/ml. Der Fraktionierungsbeginn und das Ende der Probenaufnahme wurden entsprechend dem

Substrat angepasst. Dazu wurde zunächst ein Trennungslauf mit durchgehender Fraktionssammlung durchgeführt. Aufgrund des Elutionsprofils wurde dann die Fraktionssammlung eingeschränkt. Für beide Säulentypen sind die Trennungparameter im Folgenden aufgeführt:

MiniQ [®] PC 3.2/3	Säulenvolumen (CV)	0,241 ml
	Wellenlänge 1	210 nm
	Wellenlänge 2 (EGFP)	488 nm
	Flussrate	0,2 ml/min
	Fraktionssammmlung	50 µl (5–15% B)
	Startkonzentration	0% B
	1. Equilibrierung	5 CV
	2. Injektion	25–50 µl
	3. Waschschrift	3 CV
	4. Gradient 1 (0–30% B)	10 CV
	5. Gradient 2 (30–100% B)	2 CV
	6. Waschschrift (100% B)	3 CV
	7. Reequilibrierung (0% B)	3 CV
MonoQ [®] 5/50	Säulenvolumen (CV)	0,982 ml
	Wellenlänge 1	280 nm
	Wellenlänge 2 (EGFP)	488 nm
	Flussrate	0,35 ml/min
	Startkonzentration	0% B
	1. Equilibrierung	3 CV
	2. Injektion	100 µl
	3. Waschschrift	2 CV
	4. Gradient 1 (0–50% B)	1 CV
	5. Gradient 2 (50–80% B)	3 CV
	6. Fraktionssammmlung	50 µl (55–65% B)
	7. Gradient 3 (50–80% B)	1 CV
	8. Waschschrift (100% B)	2 CV
9. Reequilibrierung (0% B)	2 CV	

5.2.9 Methoden zum *in vitro* Import

5.2.9.1 Isolierung von Thylakoidvesikeln

Präparierte Chloroplasten wurden sedimentiert (1 min bei 4°C und 10 000 x g) und zur osmotischen Lyse in einem solchen Volumen HM-Puffer (10 mM HEPES/KOH pH 8,0, 5 mM MgCl₂) aufgenommen, dass der Chlorophyllgehalt 0,75 mg/ml betrug. Nach Inkubation für 10 min auf Eis wurde zentrifugiert (5 min bei 10 000 U/min). Der Überstand (Stroma) wurde aufgehoben, das Sediment erneut in HM-Puffer resuspendiert und wiederum für 5 min bei 10 000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Waschschrift nochmals wiederholt. Die Thylakoide wurden schließlich so in HM-Puffer aufgenommen, dass der Chlorophyllgehalt 0,75 mg/ml beträgt.

5.2.9.2 *In thylakoido* Importexperimente

Importansatz:

Thylakoide (0,75 mg Chlorophyll/ml)	40 µl
HM-Puffer	5 µl
<i>in vitro</i> Translationsansatz	5 µl
Gesamvolumen	50 µl

Die Importreaktion erfolgte 20 min bei 25°C im belichteten Wasserbad. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 µl eiskaltem HM-Puffer (10 mM HEPES/KOH pH 8,0, 5 mM MgCl₂) abgestoppt und zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Nach Zentrifugation (5 min, 10 000 x g, 4°C) wurde das Pellet in 200 µl HM-Puffer resuspendiert, erneut 5 min bei 10 000 x g und 4°C zentrifugiert und anschließend das Pellet in 100 µl HM-Puffer aufgenommen. Die Hälfte dieses Ansatzes (50 µl) wurde zentrifugiert (5 min, 10 000 x g, 4°C) und in 50 µl 2x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen (*Minus-Fraktion*). Zum restlichen Ansatz (50 µl) wurden 10 µl Thermolysin-Lösung (2 mg/ml, 25 mM CaCl₂) zugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert (*Plus-Fraktion*). Die Reaktion wurde anschließend durch 200 µl HME-Puffer (10 mM HEPES/KOH pH 8,0, 5 mM MgCl₂, 10 mM EDTA) gestoppt. Nach der Sedimentierung der Thylakoide (5 min, 10 000 x g, 4°C) wurde das Pellet nochmals mit HME-Puffer gewaschen und die Thylakoide nach Sedimentierung (5 min, 10 000 x g, 4°C) in 50 µl 2x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen. Die Denaturierung der Proteine erfolgt durch Inkubation der Proben für 5 min bei 95°C. Nach einer abschließenden Zentrifugation (5 min, 16 000 x g) konnten die Proben (Überstand) auf ein SDS-Gradientengel (vgl. Abschnitt 5.2.4.4, S. 122) aufgetragen werden (jeweils 25 µl, das entspricht einer Ausgangsmenge an Thylakoiden von ca. 7,5 µg Chlorophyll). Die Inhibition mit Nigericin wurde nach dem Protokoll von Berghöfer & Klösger (1999) durchgeführt.

5.2.9.3 Variationen des *in thylakoido* Importansatzes – Kompetitionen

Die Konkurrenzexperimente wurden analog dem oben beschriebenen *in thylakoido* Import durchgeführt. Der einzige Unterschied besteht darin, dass zusätzlich ein nicht radioaktiv markierter Kompetitor zugegeben wurde. Dazu stehen entsprechend des Importansatzes ein Volumen von 5 μl zur Verfügung. Da ungefaltete Kompetitoren in 8 M Harnstoff gelöst sind, wurde darauf geachtet, dass die Harnstoffkonzentration 200 mM nicht übersteigt. Bei den Verdünnungsexperimenten wurde zunächst ein Stammansatz mit der maximalen Kompetitorkonzentration erstellt. Aufgrund der späteren 1:1 Verdünnung ist dieser mit einem Volumen von 100 μl doppelt so groß, wie der Standard-Import-Ansatz. Zur Verdünnung wurde eine Stammlösung erstellt, die bezogen auf Thylakoidkonzentration, Menge an radioaktiven Translationsprodukt und Harnstoffkonzentration zum Stammansatz identisch ist:

Ansätze:

	Stammansatz (100 μl)	Verdünnungslösung (1 ml)
Thylakoide (0,75 mg Chlorophyll/ml)	80 μl	800 μl
Kompetitionslösung	10 μl	–
Harnstoffausgleich	–	100 μl
<i>in vitro</i> Translation	10 μl	100 μl

Der Anteil an Harnstoff in der Konkurrenzlösung/Ausgleichslösung wurde so gewählt, dass die Konzentration im Gesamtansatz 200 mM beträgt.

Bei der Erstellung der Verdünnungsreihe wurden entsprechend der Anzahl der Verdünnungsstufen Reaktionsgefäße mit je 50 μl Verdünnungsansatz vorgelegt (siehe Abbildung 5.1). Nun wurden 50 μl des Stammansatzes entsprechend in das erste Reaktions-

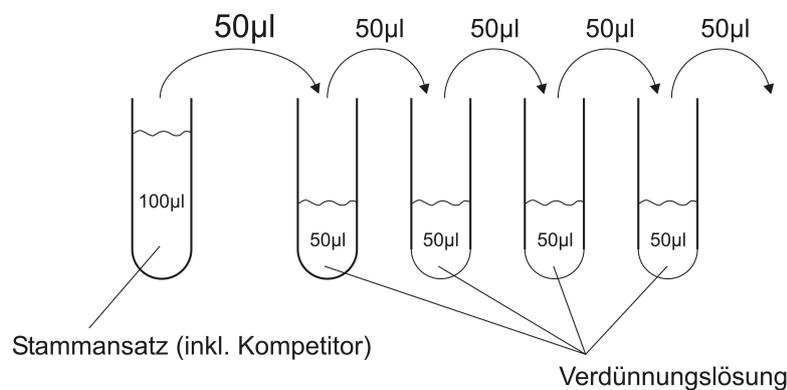


Abb. 5.1: Modellhafte Darstellung der Verdünnungsreihe.

gefäß mit Verdünnungslösung gegeben, gemischt und wieder 50 µl in das nächste Gefäß überführt. Dadurch wurden Pipettierfehler bei kleinen Volumina verhindert und eine Reproduzierbarkeit der Versuche gewährleistet.

5.2.9.4 Berechnung der IC₅₀-Werte

Die Berechnung der Kompetitionswirkung (IC₅₀) erfolgte nach folgender Gleichung:

$$k_i = k_e / (1 + I_0 / IC_{50})$$

Dabei ist k_i die Geschwindigkeitskonstante der kompetierten Reaktion, k_e , die der unkompetierten Reaktion. I_0 ist die eingesetzte Konkurrentkonzentration.

5.2.9.5 Präparation von Chloroplasten und Mitochondrien aus *Pisum sativum*

Die Parallelpräparation von Chloroplasten und Mitochondrien aus Erbsenkeimlingen (7–14 Tage alt) basiert auf Arbeiten von Rudhe et al. (2002) und wurde nach dem von Anja Rödiger in unserer Arbeitsgruppe etablierten Protokoll durchgeführt.

Lösungen:

EB-Puffer (Teil 1) (Extraktionspuffer)	Saccharose	450 mM
	MOPS	15 mM
	EGTA	1,5 mM
pH 7,4 mit KOH einstellen, autoklavieren, Lagerung bei 4°C		
EB-Puffer (Teil 2)	PVP	0,6% (w/v)
	BSA	0,2% (w/v)
	DTT	10 mM
	PMSF	0,2 mM
diesen Teil der Lösung unmittelbar vor Gebrauch zugeben		
WB-Puffer (Waschpuffer)	Saccharose	300 mM
	MOPS	10 mM
	EGTA	1 mM
	PMSF	0,2 mM
erst unmittelbar vor Gebrauch zugeben		

Lösungen (Fortsetzung):

RB-Puffer (Resuspensionspuffer)	Mannitol	400 mM
	Tricin	10 mM
	EGTA	1 mM
pH 7,4 mit KOH einstellen, autoklavieren, Lagerung bei 4°C		
5x GP (Gradientpuffer)	Saccharose	1,5 M
	MOPS	50 mM
	EGTA	5 mM
pH 7,4 mit KOH einstellen, autoklavieren, Lagerung bei 4°C		
5x SRM (Sorbitolresuspensionsmedium)	Sorbitol	1,65 M
	HEPES/KOH pH 8,0	250 mM

Percoll-Lösungen:

Mitochondrienpräparation	Stufe	18%	23%	40%
	Percoll	9 ml	11,5 ml	20 ml
	5x GP	10 ml	10 ml	10 ml
	ddH ₂ O	31 ml	28,5 ml	20 ml
	Gesamtvolumen	50 ml	50 ml	50 ml
Chloroplastenpräparation	Stufe	18%	80%	
	Percoll	17,5 ml	40 ml	
	5x SRM	10 ml	10 ml	
	ddH ₂ O	22,5 ml	–	
	Gesamtvolumen	50 ml	50 ml	

Bei der Parallelpräparation wurden alle Schritte bei 4°C im Kühlraum bzw. auf Eis durchgeführt und die verwendeten Pufferlösungen, Zentrifugen und Rotoren vorgekühlt. Zum Pipettieren wurden abgeschnittene Pipettenspitzen verwendet, um einer Zerstörung der Organellen durch Scherkräfte entgegenzuwirken.

5.2.9.6 Zellaufschluss und differentielle Zentrifugation

Es wurden ca. 40 g 7–10 Tage alte Erbsenkeimlinge in 250 ml EB-Puffer im *Waring Blender 8011E* (WARING PRODUCTS (New Hartford, USA)) homogenisiert (5x 2 s) und anschließend durch zwei Lagen *Miracloth*[®] (100 µm Porengröße; CALBIOCHEM (La Jolla, USA)) und eine Schicht Nylongewebe (31 µm Porengröße) filtriert. Danach wurde das Filtrat 5 min bei 4°C und 2 000 x g zentrifugiert (SORVALL Super T21; SLC-250T-Rotor). Das Pellet wurde vorsichtig mit Hilfe eines weichen Pinsels in 5 ml 1xSRM resuspendiert. Diese Suspension, welche später als Basis der Chloroplastenisolierung diente, wurde während der Mitochondrienpräparation im Dunkeln auf Eis gelagert.

Der Überstand, der zur Mitochondrienpräparation diente, wurde 5 min bei 4°C und 6 000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 2 ml RB-Puffer mit einem weichen Pinsel resuspendiert.

5.2.9.7 Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation

Mitochondrienpräparation:

Zur Präparation der Mitochondrien wurden in zwei 30 ml *Corex*-Zentrifugenröhrchen (DU PONT INSTRUMENTS, Dreieich) jeweils ein dreistufiger Percollgradient vorgelegt. Dazu wurden mit Hilfe eines Korkstückchens 6 ml 40%ige, 10 ml 23%ige und 6 ml 18%ige Percoll-Lösung vorsichtig übereinander geschichtet. Diese Gradienten wurden nun mit den in RB-Puffer resuspendierten Organellen überschichtet und 45 min bei 4°C und 12 000 x g zentrifugiert (SORVALL Super T21; SL-50T-Rotor, Bremse unterhalb 5 000 x g abgeschaltet). Die intakten Mitochondrien wurden aus der Interphase zwischen der 23%igen und 40%igen Percoll-Lösung entnommen und in einen 250 ml Zentrifugenbecher überführt, in dem bereits 100 ml RB-Puffer vorgelegt worden. In dem folgenden 15 minütigen Zentrifugationsschritt bei 4°C und 10 000 U/min (SORVALL Super T21; SLC-250T-Rotor) wurden die Mitochondrien erneut sedimentiert und der Überstand möglichst vollständig entfernt. Das Pellet wurde erneut vorsichtig in RB-Puffer resuspendiert und 15 min bei 4°C, 10 000 U/min (SORVALL Super T21; SLC-50T-Rotor) zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde mindestens zweimal wiederholt und das resultierende Pellet in maximal 1 ml RB-Puffer resuspendiert. Diese Suspension wurde abschließend 15 min bei 4°C und 16 000 x g zentrifugiert und das Pellet in 300 µl RB-Puffer aufgenommen. Die so erhaltene Mitochondrienpräparation wurde einer Proteinkonzentrationsbestimmung unterzogen (vgl. Abschnitt 5.2.9.9, S. 135) und bis zu ihrer weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Chloroplastenpräparation:

Die aus dem Zellaufschluss stammende chloroplastenhaltige Suspension wurde auf zwei 15 ml *Corex*-Röhrchen verteilt. Dabei wurde der bereits vorgelegte zweistufige Percoll-

gradient (3–5 ml 80%ige und 5 ml 35%ige Percoll-Lösung) vorsichtig mit der Chloroplastensuspension überschichtet und 7 min bei 4°C und 4 000 U/min (SORVALL Super T21; SLC-50T-Rotor) zentrifugiert. Die intakten Chloroplasten wurden anschließend aus der Interphase zwischen dem 80%igen und 23%igen Percoll-Lösung entnommen und in zwei neue 15 ml *Corex*-Röhrchen überführt und mit 1xSRM auf 6–8 ml aufgefüllt. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei 4°C und 3 000 U/min (SORVALL Super T21; SLC-50T-Rotor) wurden die Pellets in je 2 ml 1xSRM resuspendiert und in einem 15 ml *Corex*-Röhrchen vereinigt. Die so erhaltene Chloroplastensuspension wurde mit 1xSRM auf ca. 10 ml aufgefüllt, erneut 2 min bei 4°C und 3 000 U/min zentrifugiert und das Pellet in maximal 2 ml 1xSRM resuspendiert. Diese Chloroplastenlösung wurde einer Chlorophyllbestimmung unterzogen (vgl. Abschnitt 5.2.9.8) und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

5.2.9.8 Chlorophyllbestimmung

Die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes isolierter Chloroplasten wurde basierend auf Arbeiten von Arnon (1949) durchgeführt. 10 µl Chloroplastensuspension wurden mit 990 µl 80%igem Aceton (v/v) versetzt und ca. 10 min im Dunkeln bei 4°C (Kühlschrank) inkubiert. Anschließend wurde 5 min bei 16 000 x g zentrifugiert. Die Extinktion des Überstands wurde bei 645 und 663 nm gemessen (SHIMADZU UV-1602) und die Gesamtchlorophyll-Konzentration nach folgender Formel berechnet:

$$c \text{ (in mg Chlorophyll/ml)} = 20,2 \cdot \text{Abs}_{645} + 8,02 \cdot \text{Abs}_{663} (\cdot 100)$$

5.2.9.9 Proteinbestimmung der Mitochondrien (nach Bradford)

Die Proteinbestimmung der Mitochondrien basierte auf der Methode von Bradford (1976). Dabei wurden 1 µl der Mitochondrienpräparation mit 99 µl 1 M Harnstoff und 700 µl ddH₂O versetzt und für 1 min bei 4°C und 16 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 200 µl Bradford-Reagenz versetzt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, die Absorption bei 595 nm gemessen (SHIMADZU UV-1602) und der Proteingehalt mit Hilfe einer BSA-Bradford-Eichgeraden bestimmt. Die Verwendung von Harnstoff sollte dabei Schwankungen bei den Messungen vermindern (Anja Rödiger, persönliche Mitteilung).

5.2.10 *In organello* Import (paralleler Ansatz)

Das im Zuge dieser Arbeit angewandte parallele *in organello* Importsystem basiert auf Arbeiten von Rudhe et al. (2002) und wurde nach dem von Anja Rödiger in unserer Arbeitsgruppe etablierten Protokoll durchgeführt.

Lösungen:

RB-Puffer (Resuspensionspuffer für Mitochondrien)		siehe 5.2.9.5, S. 132
1x SRM (Resuspensionspuffer für Chloroplasten)		siehe 5.2.9.5, S. 132
2x Dualimportpuffer	Saccharose	0,6 M
	HEPES/KOH	30 mM
	KH ₂ PO ₄	10 mM
	BSA	0,2% (w/v)
	pH 7,4 mit KOH einstellen	
Dual-Mastermix	1x Dualimportpuffer	0,6 M
	MgCl ₂	4 mM
	Methionin	4 mM
	ATP	4 mM
	GTP	4 mM
	ADP	0,2 mM
	Malat	5 mM
	DTT	4,5 mM
	Kaliumacetat	10 mM
	NaHCO ₃	10 mM

Die Chloroplasten wurden nach der Chlorophyllbestimmung sedimentiert (Zentrifugation 1 min bei 4°C und 10 000 x g) und in einem solchen Volumen 1x SRM aufgenommen, dass die Chlorophyllkonzentration 1 mg/ml beträgt. Die Mitochondrien wurden in gleicher Weise auf eine Proteinkonzentration von 10 µg/µl eingestellt. Beim Pipettieren der Organellen wurden wieder abgeschnittene Spitzen verwendet, um die Beschädigung der Organellen durch Scherkräfte zu vermeiden. Der Importansatz wurde 25 min bei 25°C im beleuchteten Wasserbad inkubiert, die Importreaktion durch die Zugabe von 90 µl eiskaltem 1x Dualimportpuffer abgestoppt und der Reaktionsansatz geteilt (2x 100 µl).

Importansatz:

	Chloroplastenimport	Mitochondrienimport
Chloroplasten (1 mg Chlorophyll/ml)	25 µl	–
Mitochondrien (10 µg/µl Protein)	–	10 µl
<i>in vitro</i> Translation	10 µl	10 µl
Dual-Mastermix	75 µl	90 µl
Gesamtvolumen	110 µl	110 µl

Ein Teil wurde sedimentiert (Chloroplasten: 3 min, 4°C, 3 500 x g; Mitochondrien: 15 min, 4°C, 16 000 x g) und das Pellet gewaschen (Chloroplasten: 200 µl 1xSRM; Mitochondrien: 200 µl RB-Puffer). Dieser Waschschrift wurde nochmals wiederholt und das Pellet in 20 µl 2x Laemmli-Probenpuffer (siehe 5.2.4.4, S. 122) aufgenommen und 5 min bei 95°C denaturiert (C-, M-).

Der zweite Teil des abgestoppten Importansatzes wurde mit 1/20 Volumen Thermolysin (2 mg/ml in 25 mM MgCl₂) versetzt und 40 min auf Eis inkubiert. Nach Abstoppen des Verdau durch Zugabe von 1/50 Volumen 0,5 M EDTA wurden auch diese Ansätze zentrifugiert (Chloroplasten: 3 min, 4°C, 3 500 x g; Mitochondrien: 15 min, 4°C, 16 000 x g), die Pellets resuspendiert (Chloroplasten: 200 µl 1xSRM; Mitochondrien: 200 µl RB-Puffer), dieser Waschschrift wiederholt und die gewaschenen Pellets in 20 µl 2x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95°C denaturiert.

Nach einer abschließenden Zentrifugation der denaturierten Proben (5 min, 6 000 x g) konnten die Überstände über SDS-PAGE analysiert werden. Bei vollständiger Auftragung (20 µg) entsprach dies bei den Chloroplasten einer Chlorophyllmenge von 12,5 µg (C-, C+) und bei den Mitochondrien einer Proteinmenge von 5 µg (M-, M+).

5.2.11 Chloroplastenimport mit Subfraktionierung

Der *in organello* Import von radioaktiv markierten Substraten in Erbsen- bzw. Spinat-chloroplasten, mit anschließender Subfraktionierung in Stroma und Thylakoide (C-, C+, S, T-, T+; vgl. Ergebnisteil 3.2.2.2, S. 73), wurde nach den Protokollen von Molik (2005) durchgeführt.

5.2.12 Biolistische Transformation

Die verwendete biolistische Schussapparatur wurde von der technischen Abteilung der Universität Freiburg angefertigt. Das in dieser Arbeit verwendete und im Folgenden beschriebenen Protokoll wurde von Bianca Baudisch während Ihrer Diplomarbeit (Baudisch, 2006) in unserer Arbeitsgruppe etabliert.

Materialien:

Agar-Platten	Micro-Agar	2% (w/v)
Plasmid-DNA	pRT-Ω/Not/Asc::Konstrukt	300 ng/µl
Gold-Partikel	0,6 µm Durchmesser	60 µg/µl
CaCl ₂	in steril ddH ₂ O	2,5 M
Spermidin (free base)	in steril ddH ₂ O	0,1 M

Fällungsansatz:

Goldpartikel (60 µg/µl)	3,3 µl
Plasmid (300 ng/µl)	1,3 µl
CaCl ₂ (2,5 M)	4,0 µl
Spermidin (0,1 M)	1,0 µl

Zur Transformation wurden zwei Wochen alte, bereits geöffnete, Erbsenblätter verwendet und unter sterilen Bedingungen im Zentrum der Agarplatte platziert. Der Fällungsansatz wurde sorgfältig gemischt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei Raumtemperatur 15–30 s bei 16 000 x g zentrifugiert. 7,5 µl des Überstandes wurden verworfen, der restliche Ansatz gemischt und 2,5 µl auf den Träger geladen und die Agarplatte mit dem Erbsenblatt in der biologischen Kammer positioniert. Der Abstand zwischen Träger und Pflanzenmaterial betrug 8,0 cm. Nun wurde ein Vakuum von 0,2 bar angelegt und die Partikel mit Hilfe eines Heliumdruckes von 12 bar beschleunigt und in das Blattgewebe geschossen. Im Anschluss an den Beschuss wurden die Agar-Platten mit ParafilmTM luftdicht verschlossen und 14 h im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die mikroskopische Analyse.

5.2.13 Filmwaage/IRRAS

Wie im Ergebnisteil bereits erwähnt, wurden die Untersuchungen an hydrophoben Grenzflächen in Kooperation mit Andreas Kerth, Anette Meister und Tina Weber aus der Arbeitsgruppe von Prof. Blume (Physikalische Chemie, MLU-Halle) durchgeführt. Die Details zu den einzelnen Methoden (Filmwaage und IRRAS) sind in [Weber \(2007\)](#) und in [Kerth \(2003\)](#) ausführlich beschrieben.

Literaturverzeichnis

- Agarraberes, F. A. & Dice, J. F. (2001)** Protein translocation across membranes. *Biochim Biophys Acta* **1513**(1), 1–24
- Alder, N. N. & Theg, S. M. (2003)** Protein transport via the cptat pathway displays cooperativity and is stimulated by transport-incompetent substrate. *FEBS Lett* **540**(1-3), 96–100
- Alkaabi, K. M., Yafea, A., & Ashraf, S. S. (2005)** Effect of pH on thermal- and chemical-induced denaturation of GFP. *Appl Biochem Biotechnol* **126**(2), 149–156
- Altmann, K. H., Wójcik, J., Vásquez, M., & Scheraga, H. A. (1990)** Helix-coil stability constants for the naturally occurring amino acids in water. xxiii. proline parameters from random poly (hydroxybutylglutamine-co-l-proline). *Biopolymers* **30**(1-2), 107–120
- Annweiler, A., Hipkind, R. A., & Wirth, T. (1991)** A strategy for efficient in vitro translation of cDNAs using the rabbit beta-globin leader sequence. *Nucleic Acids Res* **19**(13), 3750
- Arnon, D. I. (1949)** Copper enzymes in isolated chloroplasts. polyphenoloxidase in beta vulgaris. *Plant Physiol* **24**(1), 1–15
- Asai, T., Shinoda, Y., Nohara, T., Yoshihisa, T., & Endo, T. (1999)** Sec-dependent pathway and delta-pH-dependent pathway do not share a common translocation pore in thylakoidal protein transport. *J Biol Chem* **274**(29), 20075–20078
- Barbrook, A. C., Packer, J. C., & Howe, C. J. (1996)** Inhibition by penem of processing peptidases from cyanobacteria and chloroplast thylakoids. *FEBS Lett* **398**(2-3), 198–200
- Barrett, C. M. L., Ray, N., Thomas, J. D., Robinson, C., & Bolhuis, A. (2003)** Quantitative export of a reporter protein, GFP, by the twin-arginine translocation pathway in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **304**(2), 279–284
- Bassham, D. C., Bartling, D., Mould, R. M., Dunbar, B., Weisbeek, P., Herrmann, R. G., & Robinson, C. (1991)** Transport of proteins into chloroplasts. delineation of envelope "transit" and thylakoid "transfer" signals within the pre-sequences of three imported thylakoid lumen proteins. *J Biol Chem* **266**(35), 23606–23610

- Baudisch, B. (2006)** Subzelluläre lokalisierung chimärer egfp-derivate nach transienter transformation verschiedener pflanzenspezies, Master's thesis, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Bedard, J. & Jarvis, P. (2005)** Recognition and envelope translocation of chloroplast pre-proteins. *J Exp Bot* **56**(419), 2287–2320
- Behrens, M., Michaelis, G., & Pratje, E. (1991)** Mitochondrial inner membrane protease 1 of *saccharomyces cerevisiae* shows sequence similarity to the *escherichia coli* leader peptidase. *Mol Gen Genet* **228**(1-2), 167–176
- Bellafiore, S., Ferris, P., Naver, H., Göhre, V., & Rochaix, J.-D. (2002)** Loss of albino3 leads to the specific depletion of the light-harvesting system. *Plant Cell* **14**(9), 2303–2314
- Berghöfer, J. (1998)** **Charakterisierung von Komponenten der plastidären Proteinmaschinerie.**, PhD thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München
- Berghöfer, J., Karnauchov, I., Herrmann, R. G., & Klösgen, 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**(31), 18341–18346
- Berghöfer, J. & Klösgen, R. B. (1996)** The electronic plant gene register - isolation and characterization of a cDNA encoding the *secy* protein from spinach chloroplasts (accession no. z54351) *Plant Physiol* **112**, 861–864 (PGR 96–090)
- Berghöfer, J. & 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**(2), 328–332
- Berks, B. C. (1996)** A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol Microbiol* **22**(3), 393–404
- Berks, B. C., Sargent, F., Leeuw, E. D., Hinsley, A. P., Stanley, N. R., Jack, R. L., Buchanan, G., & Palmer, T. (2000)** A novel protein transport system involved in the biogenesis of bacterial electron transfer chains. *Biochim Biophys Acta* **1459**(2-3), 325–330
- Überlacker, B. & Werr, W. (1996)** Vectors with rare-cutter restriction enzyme sites for expression of open reading frames in transgenic plants *Molecular Breeding* **2**, 293–295
- Blaber, M., Zhang, X. J., & Matthews, B. W. (1993)** Structural basis of amino acid alpha helix propensity. *Science* **260**(5114), 1637–1640
- Black, M. T. (1993)** Evidence that the catalytic activity of prokaryote leader peptidase depends upon the operation of a serine-lysine catalytic dyad. *J Bacteriol* **175**(16), 4957–4961

- Blobel, G. & Dobberstein, B. (1975)** Transfer of proteins across membranes. i. presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol* **67**(3), 835–851
- Blume, A. (1979)** A comparative study of the phase transitions of phospholipid bilayers and monolayers. *Biochim Biophys Acta* **557**(1), 32–44
- Bogsch, E., Brink, S., & Robinson, C. (1997)** Pathway specificity for a delta ph-dependent precursor thylakoid lumen protein is governed by a 'sec-avoidance' motif in the transfer peptide and a 'sec-incompatible' mature protein. *EMBO J* **16**(13), 3851–3859
- Bogsch, E. G., Sargent, F., Stanley, N. R., Berks, B. C., Robinson, C., & Palmer, T. (1998)** An essential component of a novel bacterial protein export system with homologues in plastids and mitochondria. *J Biol Chem* **273**(29), 18003–18006
- Bohnert, M., Pfanner, N., & van der Laan, M. (2007)** A dynamic machinery for import of mitochondrial precursor proteins. *FEBS Lett* **581**(15), 2802–2810
- Bokman, S. H. & Ward, W. W. (1981)** Renaturation of aequorea green-fluorescent protein. *Biochem Biophys Res Commun* **101**(4), 1372–1380
- Bolhuis, A., Mathers, J. E., Thomas, J. D., Barrett, C. M., & Robinson, C. (2001)** Tatb and tate form a functional and structural unit of the twin-arginine translocase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **276**(23), 20213–20219
- Bradford, M. M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254
- Braun, N. A., Davis, A. W., & Theg, S. M. (2007)** The chloroplast tat pathway utilizes the transmembrane electric potential as an energy source. *Biophys J* **93**(6), 1993–1998
- Braun, N. A. & Theg, S. M. (2008)** The chloroplast tat pathway transports substrates in the dark. *J Biol Chem* **283**(14), 8822–8828
- Brink, S., Bogsch, E. G., Edwards, W. R., Hynds, P. J., & Robinson, C. (1998)** Targeting of thylakoid proteins by the delta ph-driven twin-arginine translocation pathway requires a specific signal in the hydrophobic domain in conjunction with the twin-arginine motif. *FEBS Lett* **434**(3), 425–430
- Brock, I. W., Mills, J. D., Robinson, D., & Robinson, C. (1995)** The delta ph-driven, atp-independent protein translocation mechanism in the chloroplast thylakoid membrane. kinetics and energetics. *J Biol Chem* **270**(4), 1657–1662
- Brüser, T. & Sanders, C. (2003)** An alternative model of the twin arginine translocation system. *Microbiol Res* **158**(1), 7–17

- Bruce, B. D. (2001)** The paradox of plastid transit peptides: conservation of function despite divergence in primary structure. *Biochim Biophys Acta* **1541**(1-2), 2–21
- Cai, D., Herrmann, R. G., & Klösgen, R. B. (1993)** The 20 kda apoprotein of the cp24 complex of photosystem ii: an alternative model to study import and intraorganellar routing of nuclear-encoded thylakoid proteins. *Plant J* **3**, 383–392
- Chaal, B. K., Mould, R. M., Barbrook, A. C., Gray, J. C., & Howe, C. J. (1998)** Characterization of a cDNA encoding the thylakoidal processing peptidase from *Arabidopsis thaliana*. implications for the origin and catalytic mechanism of the enzyme. *J Biol Chem* **273**(2), 689–692
- Chaddock, A. M., Mant, A., Karnauchoy, I., Brink, S., Herrmann, R. G., Klösgen, R. B., & 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**(12), 2715–2722
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., & Prasher, D. C. (1994)** Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**(5148), 802–805
- Chen, X., Valkenburgh, C. V., Fang, H., & Green, N. (1999)** Signal peptides having standard and nonstandard cleavage sites can be processed by *implp* of the mitochondrial inner membrane protease. *J Biol Chem* **274**(53), 37750–37754
- Clark, S. A. & Theg, S. M. (1997)** A folded protein can be transported across the chloroplast envelope and thylakoid membranes. *Mol Biol Cell* **8**(5), 923–934
- Clausmeyer, S., Klösgen, R. B., & 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**(19), 13869–13876
- Cline, K., Ettinger, W. F., & 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**(4), 2688–2696
- Cline, K. & Henry, R. (1996)** Import and routing of nucleus-encoded chloroplast proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**, 1–26
- Cline, K. & Mori, H. (2001)** Thylakoid delta pH-dependent precursor proteins bind to a *cptatc-hcf106* complex before *tha4*-dependent transport. *J Cell Biol* **154**(4), 719–729
- Cody, C. W., Prasher, D. C., Westler, W. M., Prendergast, F. G., & Ward, W. W. (1993)** Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Biochemistry* **32**(5), 1212–1218

- Cola, A. D., Bailey, S., & Robinson, C. (2005)** The thylakoid delta ph/delta psi are not required for the initial stages of tat-dependent protein transport in tobacco protoplasts. *J Biol Chem* **280**(50), 41165–41170
- Cormack, B. P., Valdivia, R. H., & Falkow, S. (1996)** Facs-optimized mutants of the green fluorescent protein (gfp). *Gene* **173**(1 Spec No), 33–38
- Cramer, A., Whitehorn, E. A., Tate, E., & Stemmer, W. P. (1996)** Improved green fluorescent protein by molecular evolution using dna shuffling. *Nature Biotechnol* **14**(3), 315–319
- Creighton, A. M., Hulford, A., Mant, A., Robinson, D., & Robinson, C. (1995)** A monomeric, tightly folded stromal intermediate on the delta ph-dependent thylakoidal protein transport pathway. *J Biol Chem* **270**(4), 1663–1669
- Cubitt, A. B., Woollenweber, L. A., & Heim, R. (1999)** Understanding structure–function relationships in the aequorea victoria green fluorescent protein. *Methods Cell Biol* **58**, 19–30
- Dabney-Smith, C., Mori, H., & Cline, K. (2006)** Oligomers of tha4 organize at the thylakoid tat translocase during protein transport. *J Biol Chem* **281**(9), 5476–5483
- Dalbey, R. E. & Chen, M. (2004)** Sec-translocase mediated membrane protein biogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1694**(1-3), 37–53
- Dalbey, R. E. & Heijne, G. V. (1992)** Signal peptidases in prokaryotes and eukaryotes—a new protease family. *Trends Biochem Sci* **17**(11), 474–478
- Dalbey, R. E. & Robinson, C. (1999)** Protein translocation into and across the bacterial plasma membrane and the plant thylakoid membrane. *Trends Biochem Sci* **24**(1), 17–22
- Date, T. & Wickner, W. (1981)** Isolation of the escherichia coli leader peptidase gene and effects of leader peptidase overproduction in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(10), 6106–6110
- Deber, C. M. & Li, S. C. (1995)** Peptides in membranes: helicity and hydrophobicity. *Biopolymers* **37**(5), 295–318
- Delagrave, S., Hawtin, R. E., Silva, C. M., Yang, M. M., & Youvan, D. C. (1995)** Red-shifted excitation mutants of the green fluorescent protein. *Nature Biotechnol* **13**(2), 151–154
- DeLille, J., Peterson, E. C., Johnson, T., Moore, M., Kight, A., & Henry, R. (2000)** A novel precursor recognition element facilitates posttranslational binding to the signal recognition particle in chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(4), 1926–1931
- DeLisa, M. P., Tullman, D., & Georgiou, G. (2003)** Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin-arginine translocation pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(10), 6115–6120

- Della-Cioppa, G., Bauer, S. C., Klein, B. K., Shah, D. M., Fraley, R. T., & Kishore, G. M. (1986)** Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(18), 6873–6877
- den Broeck, G. V., Timko, M. P., Kausch, A. P., Cashmore, A. R., Montagu, M. V., & Herrera-Estrella, L. (1985)** Targeting of a foreign protein to chloroplasts by fusion to the transit peptide from the small subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase. *Nature* **313**(6001), 358–363
- Dierstein, R. & Wickner, W. (1986)** Requirements for substrate recognition by bacterial leader peptidase. *EMBO J* **5**(2), 427–431
- Dopf, J. & Horiagon, T. M. (1996)** Deletion mapping of the aequorea victoria green fluorescent protein. *Gene* **173**(1 Spec No), 39–44
- Dubini, A. & Sargent, F. (2003)** Assembly of tat-dependent [nife] hydrogenases: identification of precursor-binding accessory proteins. *FEBS Lett* **549**(1-3), 141–146
- Duchene, A.-M., Giritch, A., Hoffmann, B., Cognat, V., Lancelin, D., Peeters, N. M., Zaepfel, M., Maréchal-Drouard, L., & Small, I. D. (2005)** Dual targeting is the rule for organellar aminoacyl-trna synthetases in arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(45), 16484–16489
- Eichacker, L. A. & Henry, R. (2001)** Function of a chloroplast srp in thylakoid protein export. *Biochim Biophys Acta* **1541**(1-2), 120–134
- Feilmeyer, B. J., Iseminger, G., Schroeder, D., Webber, H., & Phillips, G. J. (2000)** Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in escherichia coli. *J Bacteriol* **182**(14), 4068–4076
- Fikes, J. D., Barkocy-Gallagher, G. A., Klapper, D. G., & Bassford, P. J. (1990)** Maturation of escherichia coli maltose-binding protein by signal peptidase i in vivo. sequence requirements for efficient processing and demonstration of an alternate cleavage site. *J Biol Chem* **265**(6), 3417–3423
- Finazzi, G., Chasen, C., Wollman, F.-A., & de Vitry, C. (2003)** Thylakoid targeting of tat passenger proteins shows no delta ph dependence in vivo. *EMBO J* **22**(4), 807–815
- Franklin, A. E. & Hoffman, N. E. (1993)** Characterization of a chloroplast homologue of the 54-kda subunit of the signal recognition particle. *J Biol Chem* **268**(29), 22175–22180
- Frielingsdorf, S. & Klösgen, R. B. (2007)** Prerequisites for terminal processing of thylakoidal tat substrates. *J Biol Chem* **282**(33), 24455–24462
- Gill, S. C. & von Hippel, P. H. (1989)** Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* **182**(2), 319–326

- Glaser, E., Sjöling, S., Tanudji, M., & Whelan, J. (1998)** Mitochondrial protein import in plants. signals, sorting, targeting, processing and regulation. *Plant Mol Biol* **38**(1-2), 311–338
- Gohlke, U., Pullan, L., McDevitt, C. A., Porcelli, I., de Leeuw, E., Palmer, T., Saibil, H. R., & Berks, B. C. (2005)** The tata component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(30), 10482–10486
- Gouffi, K., Santini, C.-L., & Wu, L.-F. (2002)** Topology determination and functional analysis of the escherichia coli tatc protein. *FEBS Lett* **525**(1-3), 65–70
- Gray, M. W., Burger, G., & Lang, B. F. (1999)** Mitochondrial evolution. *Science* **283**(5407), 1476–1481
- Gray, M. W. & Doolittle, W. F. (1982)** Has the endosymbiont hypothesis been proven? *Microbiol Rev* **46**(1), 1–42
- Groves, M. R., Mant, A., Kuhn, A., Koch, J., Dübel, S., Robinson, C., & Sinning, I. (2001)** Functional characterization of recombinant chloroplast signal recognition particle. *J Biol Chem* **276**(30), 27778–27786
- Gutensohn, M., Fan, E., Frielingsdorf, S., Hanner, P., Hou, B., Hust, B., & Klösgen, R. B. (2006)** Toc, tic, tat et al.: structure and function of protein transport machineries in chloroplasts. *J Plant Physiol* **163**(3), 333–347
- H.-J. Galla, H.-J. M. (1988)** *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*, Thieme Verlag, Stuttgart
- Haas, J., Park, E. C., & Seed, B. (1996)** Codon usage limitation in the expression of hiv-1 envelope glycoprotein. *Curr Biol* **6**(3), 315–324
- Hageman, J., Baecke, C., Ebskamp, M., Pilon, R., Smeekens, S., & Weisbeek, P. (1990)** Protein import into and sorting inside the chloroplast are independent processes. *Plant Cell* **2**(5), 479–494
- Hageman, J., Robinson, C., Smeekens, & Weisbeek, P. (1986)** A thylakoid processing protease is required for complete maturation of the lumen protein plastocyanin. *Nature* **324**, 567–569
- Halbig, D., Hou, B., Freudl, R., Sprenger, G. A., & Klösgen, R. B. (1999a)** Bacterial proteins carrying twin-r signal peptides are specifically targeted by the delta ph-dependent transport machinery of the thylakoid membrane system. *FEBS Lett* **447**(1), 95–98
- Halbig, D., Wiegert, T., Blaudeck, N., Freudl, R., & Sprenger, G. A. (1999b)** The efficient export of nadp-containing glucose-fructose oxidoreductase to the periplasm of zymomonas mobilis depends both on an intact twin-arginine motif in the signal peptide and on the

- generation of a structural export signal induced by cofactor binding. *Eur J Biochem* **263**(2), 543–551
- Halpin, C., Elderfield, P. D., James, H. E., Zimmermann, R., Dunbar, B., & Robinson, C. (1989)** The reaction specificities of the thylakoidal processing peptidase and escherichia coli leader peptidase are identical. *EMBO J* **8**(12), 3917–3921
- Hanahan, D. (1983)** Studies on transformation of escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **166**(4), 557–580
- Harms, G. S., Cognet, L., Lommerse, P. H., Blab, G. A., & Schmidt, T. (2001)** Autofluorescent proteins in single-molecule research: applications to live cell imaging microscopy. *Biophys J* **80**(5), 2396–2408
- Hartl, F. U. & Neupert, W. (1990)** Protein sorting to mitochondria: evolutionary conservations of folding and assembly. *Science* **247**(4945), 930–938
- Head, J. F., Inouye, S., Teranishi, K., & Shimomura, O. (2000)** The crystal structure of the photoprotein aequorin at 2.3 Å resolution. *Nature* **405**(6784), 372–376
- Heim, R., Cubitt, A. B., & Tsien, R. Y. (1995)** Improved green fluorescence. *Nature* **373**(6516), 663–664
- Heim, R., Prasher, D. C., & Tsien, R. Y. (1994)** Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(26), 12501–12504
- Heim, R. & Tsien, R. Y. (1996)** Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr Biol* **6**(2), 178–182
- Henry, R., Carrigan, M., McCaffrey, M., Ma, X., & Cline, K. (1997)** Targeting determinants and proposed evolutionary basis for the sec and the delta ph protein transport systems in chloroplast thylakoid membranes. *J Cell Biol* **136**(4), 823–832
- Henry, R., Kapazoglou, A., McCaffery, M., & Cline, K. (1994)** Differences between lumen targeting domains of chloroplast transit peptides determine pathway specificity for thylakoid transport. *J Biol Chem* **269**(14), 10189–10192
- Hoffman, N. E. & Franklin, A. E. (1994)** Evidence for a stromal gtp requirement for the integration of a chlorophyll a/b-binding polypeptide into thylakoid membranes. *Plant Physiol* **105**(1), 295–304
- Hou, B., Frielingsdorf, S., & Klösgen, R. B. (2006)** Unassisted membrane insertion as the initial step in deltaph/tat-dependent protein transport. *J Mol Biol* **355**(5), 957–967
- Hulford, A., Hazell, L., Mould, R. M., & Robinson, C. (1994)** Two distinct mechanisms for the translocation of proteins across the thylakoid membrane, one requiring the presence of a stromal protein factor and nucleotide triphosphates. *J Biol Chem* **269**(5), 3251–3256

- Hynds, P. J., Plücker, H., Westhoff, P., & Robinson, C. (2000)** Different lumen-targeting pathways for nuclear-encoded versus cyanobacterial/plastid-encoded hef136 proteins. *FEBS Lett* **467**(1), 97–100
- Hynds, P. J., Robinson, D., & 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**(52), 34868–34874
- Inoue, K., Baldwin, A. J., Shipman, R. L., Matsui, K., Theg, S. M., & Ohme-Takagi, M. (2005)** Complete maturation of the plastid protein translocation channel requires a type i signal peptidase. *J Cell Biol* **171**(3), 425–430
- James, H. E., Bartling, D., Musgrove, J. E., Kirwin, P. M., Herrmann, R. G., & Robinson, C. (1989)** Transport of proteins into chloroplasts. import and maturation of precursors to the 33-, 23-, and 16-kda proteins of the photosynthetic oxygen-evolving complex. *J Biol Chem* **264**(33), 19573–19576
- Jarvis, P. (2008)** Targeting of nucleus-encoded proteins to chloroplasts in plants. *New Phytol* **Epub ahead of print**
- Kapazoglou, A., Sagliocco, F., & Dure, L. (1995)** Psii-t, a new nuclear encoded luminal protein from photosystem ii. targeting and processing in isolated chloroplasts. *J Biol Chem* **270**(20), 12197–12202
- Karamyshev, A. L., Karamysheva, Z. N., Kajava, A. V., Ksenzenko, V. N., & Nesmeyanova, M. A. (1998)** Processing of escherichia coli alkaline phosphatase: role of the primary structure of the signal peptide cleavage region. *J Mol Biol* **277**(4), 859–870
- Karnauchov, I., Cai, D., Schmidt, I., Herrmann, R. G., & Klösgen, R. B. (1994)** The thylakoid translocation of subunit 3 of photosystem i, the psaf gene product, depends on a bipartite transit peptide and proceeds along an azide-sensitive pathway. *J Biol Chem* **269**(52), 32871–32878
- Kates, M. (1990)** **Handbook of lipid research (Glycolipids of higher plants, algae, yeasts and fungi)**, Plenum Press, New York
- Keegstra, K. & Cline, K. (1999)** Protein import and routing systems of chloroplasts. *Plant Cell* **11**(4), 557–570
- Kerth, A. (2003)** **Infrarot-Reflexions-Adsorptions-Spektroskopie an Lipid-, Peptid- und Flüssigkristall-Filmen an der Luft/Wasser-Grenzfläche.**, PhD thesis, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Kessler, F. & Schnell, D. J. (2006)** The function and diversity of plastid protein import pathways: a multilane gtpase highway into plastids. *Traffic* **7**(3), 248–257

- Kim, S. J., Jansson, S., Hoffman, N. E., Robinson, C., & Mant, A. (1999)** Distinct "assisted and spontaneous" mechanisms for the insertion of polytopic chlorophyll-binding proteins into the thylakoid membrane. *J Biol Chem* **274**(8), 4715–4721
- Kim, S. J., Robinson, C., & Mant, A. (1998)** Sec/srp-independent insertion of two thylakoid membrane proteins bearing cleavable signal peptides. *FEBS Lett* **424**(1-2), 105–108
- Kimata, Y., Lim, C. R., & Kohno, K. (1999)** S147p green fluorescent protein: a less thermosensitive green fluorescent protein variant. *Methods Enzymol* **302**, 373–378
- Kipping, M., Lilie, H., Lindenstrauss, U., Andreesen, J. R., Griesinger, C., Carlucci, T., & Brüser, T. (2003)** Structural studies on a twin-arginine signal sequence. *FEBS Lett* **550**(1-3), 18–22
- Kirwin, P. M., Elderfield, P. D., & Robinson, C. (1987)** Transport of proteins into chloroplasts. partial purification of a thylakoidal processing peptidase involved in plastocyanin biogenesis. *J Biol Chem* **262**(34), 16386–16390
- Kirwin, P. M., Elderfield, P. D., Williams, R. S., & Robinson, C. (1988)** Transport of proteins into chloroplasts. organization, orientation, and lateral distribution of the plastocyanin processing peptidase in the thylakoid network. *J Biol Chem* **263**(34), 18128–18132
- Kleffmann, T., Russenberger, D., von Zychlinski, A., Christopher, W., Sjölander, K., Gruissem, W., & Baginsky, S. (2004)** The arabidopsis thaliana chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions. *Curr Biol* **14**(5), 354–362
- Klein, T. M., Arentzen, R., Lewis, P. A., & Fitzpatrick-McElligott, S. (1992)** Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment. *Nature Biotech* **10**(3), 286–291
- Klostermann, E., Helling, I. D. G., Carde, J.-P., & Schünemann, D. (2002)** The thylakoid membrane protein alb3 associates with the cpsecy-translocase in arabidopsis thaliana. *Biochem J* **368**(Pt 3), 777–781
- Klöggen, R. B. (1997)** Protein transport into and across the thylakoid membrane. *J Photochem Photobiol B* **38**, 1–9
- Klöggen, R. B., Brock, I. W., Herrmann, R. G., & Robinson, C. (1992)** Proton gradient-driven import of the 16 kda oxygen-evolving complex protein as the full precursor protein by isolated thylakoids. *Plant Mol Biol* **18**(5), 1031–1034
- Kneen, M., Farinas, J., Li, Y., & Verkman, A. S. (1998)** Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator. *Biophys J* **74**(3), 1591–1599
- Knott, T. G. & 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**(11), 7843–7846

- Ko, K. & Cashmore, A. R. (1989)** Targeting of proteins to the thylakoid lumen by the bipartite transit peptide of the 33 kd oxygen-evolving protein. *EMBO J* **8**(11), 3187–3194
- Kogata, N., Nishio, K., Hirohashi, T., Kikuchi, S., & Nakai, M. (1999)** Involvement of a chloroplast homologue of the signal recognition particle receptor protein, ftsy, in protein targeting to thylakoids. *FEBS Lett* **447**(2-3), 329–333
- Kozak, M. (1987)** An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger rnas. *Nucleic Acids Res* **15**(20), 8125–8148
- Kremers, G.-J., Goedhart, J., van den Heuvel, D. J., Gerritsen, H. C., & Gadella, T. W. J. (2007)** Improved green and blue fluorescent proteins for expression in bacteria and mammalian cells. *Biochemistry* **46**(12), 3775–3783
- Kuhn, A., Stuart, R., Henry, R., & Dalbey, R. E. (2003)** The alb3/oxal/yidc protein family: membrane-localized chaperones facilitating membrane protein insertion? *Trends Cell Biol* **13**(10), 510–516
- Kuhn, A., Wickner, W., & Kreil, G. (1986)** The cytoplasmic carboxy terminus of m13 procoat is required for the membrane insertion of its central domain. *Nature* **322**(6077), 335–339
- Laemmli, U. K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature* **227**(5259), 680–685
- Laidler, V., Chaddock, A. M., Knott, T. G., Walker, D., & Robinson, C. (1995)** A secy homolog in arabidopsis thaliana. sequence of a full-length cDNA clone and import of the precursor protein into chloroplasts. *J Biol Chem* **270**(30), 17664–17667
- Lange, C., Müller, S. D., Walther, T. H., Bürck, J., & Ulrich, A. S. (2007)** Structure analysis of the protein translocating channel tata in membranes using a multi-construct approach. *Biochim Biophys Acta* **1768**(10), 2627–2634
- Larkum, A. W. D., Lockhart, P. J., & Howe, C. J. (2007)** Shopping for plastids. *Trends Plant Sci* **12**(5), 189–195
- Lee, P. A., Tullman-Ercek, D., & Georgiou, G. (2006)** The bacterial twin-arginine translocation pathway. *Annu Rev Microbiol* **60**, 373–395
- Leister, D. (2003)** Chloroplast research in the genomic age. *Trends Genet* **19**(1), 47–56
- Li, X., Henry, R., Yuan, J., Cline, K., & Hoffman, N. E. (1995)** A chloroplast homologue of the signal recognition particle subunit srp54 is involved in the posttranslational integration of a protein into thylakoid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(9), 3789–3793

- Li, X., Zhang, G., Ngo, N., Zhao, X., Kain, S. R., & Huang, C. C. (1997)** Deletions of the *aequorea victoria* green fluorescent protein define the minimal domain required for fluorescence. *J Biol Chem* **272**(45), 28545–28549
- Logan, D. C. (2006)** Plant mitochondrial dynamics. *Biochim Biophys Acta* **1763**(5-6), 430–441
- Lopez-Juez, E. & Pyke, K. A. (2005)** Plastids unleashed: their development and their integration in plant development. *Int J Dev Biol* **49**(5-6), 557–577
- Lorkovic, Z. J., Schröder, W. P., Pakrasi, H. B., Irrgang, K. D., Herrmann, R. G., & Oelmüller, R. (1995)** Molecular characterization of psbw, a nuclear-encoded component of the photosystem ii reaction center complex in spinach. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(19), 8930–8934
- Luo, W., Fang, H., & Green, N. (2006)** Substrate specificity of inner membrane peptidase in yeast mitochondria. *Mol Genet Genomics* **275**(5), 431–436
- Madueno, F., Napier, J. A., & Gray, J. C. (1993)** Newly imported rieske iron-sulfur protein associates with both cpn60 and hsp70 in the chloroplast stroma. *Plant Cell* **5**(12), 1865–1876
- Makino, Y., Amada, K., Taguchi, H., & Yoshida, M. (1997)** Chaperonin-mediated folding of green fluorescent protein. *J Biol Chem* **272**(19), 12468–12474
- Mant, A., Nielsen, V. S., Knott, T. G., Müller, B. L., & Robinson, C. (1994)** Multiple mechanisms for the targeting of photosystem i subunits f, h, k, l, and n into and across the thylakoid membrane. *J Biol Chem* **269**(44), 27303–27309
- Mant, A., Schmidt, I., Herrmann, R. G., Robinson, C., & Klösgen, R. B. (1995)** Sec-dependent thylakoid protein translocation. delta ph requirement is dictated by passenger protein and atp concentration. *J Biol Chem* **270**(40), 23275–23281
- Mant, A., Woolhead, C. A., Moore, M., Henry, R., & Robinson, C. (2001)** Insertion of psak into the thylakoid membrane in a "horseshoe" conformation occurs in the absence of signal recognition particle, nucleoside triphosphates, or functional albino3. *J Biol Chem* **276**(39), 36200–36206
- Marques, J. P., Dudeck, I., & Klösgen, R. B. (2003)** Targeting of egfp chimeras within chloroplasts. *Mol Genet Genomics* **269**(3), 381–387
- Marques, J. P., Schattat, M. H., Hause, G., Dudeck, I., & 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**(403), 1697–1706

- Marston, F. A. (1986)** The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem J* **240**(1), 1–12
- Martienssen, R. A., Barkan, A., Freeling, M., & Taylor, W. C. (1989)** Molecular cloning of a maize gene involved in photosynthetic membrane organization that is regulated by Robertson's mutator. *EMBO J* **8**(6), 1633–1639
- Martin, W., Rujan, T., Richly, E., Hansen, A., Cornelsen, S., Lins, T., Leister, D., Stoebe, B., Hasegawa, M., & Penny, D. (2002)** Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(19), 12246–12251
- McFadden, G. I. (1999)** Endosymbiosis and evolution of the plant cell. *Curr Opin Plant Biol* **2**(6), 513–519
- Mereschkowsky, C. (1905)** Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. [title translation: On the origin of plastids in plants.] *Biol Zentralbl* **25**, 593–604
- Merril, C. R., Goldman, D., Sedman, S. A., & Ebert, M. H. (1981)** Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* **211**(4489), 1437–1438
- Mühlenhoff, U., Haehnel, W., Witt, H., & Herrmann, R. G. (1993)** Genes encoding eleven subunits of photosystem I from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* sp. *Gene* **127**(1), 71–78
- Michl, D., Karnauchov, I., Berghöfer, J., Herrmann, R. G., & 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**(1), 31–40
- Michl, D., Robinson, C., Shackleton, J. B., Herrmann, R. G., & Klösgen, R. B. (1994)** Targeting of proteins to the thylakoids by bipartite presequences: CfoII is imported by a novel, third pathway. *EMBO J* **13**(6), 1310–1317
- Miguel, M. S., Marrington, R., Rodger, P. M., Rodger, A., & Robinson, C. (2003)** An *Escherichia coli* twin-arginine signal peptide switches between helical and unstructured conformations depending on the hydrophobicity of the environment. *Eur J Biochem* **270**(16), 3345–3352
- Müller, M. & Klösgen, R. B. (2005)** The Tat pathway in bacteria and chloroplasts (review). *Mol Membr Biol* **22**(1-2), 113–121
- Müller, M., Koch, H. G., Beck, K., & Schäfer, U. (2001)** Protein traffic in bacteria: multiple routes from the ribosome to and across the membrane. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **66**, 107–157

- Molik, S. (2005) Das plastidäre Rieske Fe/S-Protein: Analyse des Transport- und Assemblierungsprozesses.**, PhD thesis, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Molik, S., Karlauchov, I., Weidlich, C., Herrmann, R. G., & Klösigen, 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**(46), 42761–42766
- Moore, M., Harrison, M. S., Peterson, E. C., & Henry, R. (2000)** Chloroplast oxa1p homolog albino3 is required for post-translational integration of the light harvesting chlorophyll-binding protein into thylakoid membranes. *J Biol Chem* **275**(3), 1529–1532
- Mori, H. & Cline, K. (1998)** A signal peptide that directs non-sec transport in bacteria also directs efficient and exclusive transport on the thylakoid delta ph pathway. *J Biol Chem* **273**(19), 11405–11408
- Mori, H. & Cline, K. (2001)** Post-translational protein translocation into thylakoids by the sec and deltaph-dependent pathways. *Biochim Biophys Acta* **1541**(1-2), 80–90
- Mori, H. & 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**(2), 205–210
- Mori, H., Summer, E. J., & Cline, K. (2001)** Chloroplast tatec plays a direct role in thylakoid (delta)ph-dependent protein transport. *FEBS Lett* **501**(1), 65–68
- Mori, H., Summer, E. J., Ma, X., & Cline, K. (1999)** Component specificity for the thylakoidal sec and delta ph-dependent protein transport pathways. *J Cell Biol* **146**(1), 45–56
- Morin, J. G. & Hastings, J. W. (1971)** Energy transfer in a bioluminescent system. *J Cell Physiol* **77**(3), 313–318
- Motohashi, R., Nagata, N., Ito, T., Takahashi, S., Hobo, T., Yoshida, S., & Shinozaki, K. (2001)** An essential role of a tatec homologue of a delta ph- dependent protein transporter in thylakoid membrane formation during chloroplast development in arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(18), 10499–10504
- Mould, R. M. & Robinson, C. (1991)** A proton gradient is required for the transport of two luminal oxygen-evolving proteins across the thylakoid membrane. *J Biol Chem* **266**(19), 12189–12193
- Musser, S. M. & Theg, S. M. (2000a)** Characterization of the early steps of oe17 precursor transport by the thylakoid deltaph/tat machinery. *Eur J Biochem* **267**(9), 2588–2598
- Musser, S. M. & Theg, S. M. (2000b)** Proton transfer limits protein translocation rate by the thylakoid deltaph/tat machinery. *Biochemistry* **39**(28), 8228–8233

- Nakai, M., Goto, A., Nohara, T., Sugita, D., & Endo, T. (1994)** Identification of the seca protein homolog in pea chloroplasts and its possible involvement in thylakoidal protein transport. *J Biol Chem* **269**(50), 31338–31341
- Narhi, L. O., Caughey, D. J., Horan, T. P., Kita, Y., Chang, D., & Arakawa, T. (1997)** Fractionation and characterization of polyclonal antibodies using three progressively more chaotropic solvents. *Anal Biochem* **253**(2), 246–252
- Nelson, B. K., Cai, X., & Nebenführ, A. (2007)** A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in arabidopsis and other plants. *Plant J* **51**(6), 1126–1136
- Nelson, N. & Ben-Shem, A. (2004)** The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(12), 971–982
- Neuhoff, V., Stamm, R., & Eibl, H. (1985)** Clear background and highly sensitive protein staining with coomassie blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis *Electrophoresis* **6**(9), 427–448
- Neupert, W. & Herrmann, J. M. (2007)** Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem* **76**, 723–749
- Nielsen, V. S., Mant, A., Knoetzel, J., Müller, B. L., & Robinson, C. (1994)** Import of barley photosystem i subunit n into the thylakoid lumen is mediated by a bipartite pre-sequence lacking an intermediate processing site. role of the delta ph in translocation across the thylakoid membrane. *J Biol Chem* **269**(5), 3762–3766
- Nilsson, R., Brunner, J., Hoffman, N. E., & van Wijk, K. J. (1999)** Interactions of ribosome nascent chain complexes of the chloroplast-encoded d1 thylakoid membrane protein with cpsrp54. *EMBO J* **18**(3), 733–742
- Nishiuchi, Y., Inui, T., Nishio, H., Bódi, J., Kimura, T., Tsuji, F. I., & Sakakibara, S. (1998)** Chemical synthesis of the precursor molecule of the aequorea green fluorescent protein, subsequent folding, and development of fluorescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(23), 13549–13554
- Nohara, T., Asai, T., Nakai, M., Sugiura, M., & Endo, T. (1996)** Cytochrome f encoded by the chloroplast genome is imported into thylakoids via the seca-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **224**(2), 474–478
- Nunnari, J., Fox, T. D., & Walter, P. (1993)** A mitochondrial protease with two catalytic subunits of nonoverlapping specificities. *Science* **262**(5142), 1997–2004
- Nurizzo, D., Halbig, D., Sprenger, G. A., & Baker, E. N. (2001)** Crystal structures of the precursor form of glucose-fructose oxidoreductase from zymomonas mobilis and its complexes with bound ligands. *Biochemistry* **40**(46), 13857–13867

- Oliver, D. B., Cabelli, R. J., Dolan, K. M., & Jarosik, G. P. (1990)** Azide-resistant mutants of *Escherichia coli* alter the *SecE* protein, an azide-sensitive component of the protein export machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(21), 8227–8231
- Ormö, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y., & Remington, S. J. (1996)** Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **273**(5280), 1392–1395
- Paetzel, M., Dalbey, R. E., & Strynadka, N. C. (1998)** Crystal structure of a bacterial signal peptidase in complex with a beta-lactam inhibitor. *Nature* **396**(6707), 186–190
- Paetzel, M., Dalbey, R. E., & Strynadka, N. C. (2000)** The structure and mechanism of bacterial type I signal peptidases. A novel antibiotic target. *Pharmacol Ther* **87**(1), 27–49
- Paetzel, M., Dalbey, R. E., & Strynadka, N. C. J. (2002a)** Crystal structure of a bacterial signal peptidase apoenzyme: implications for signal peptide binding and the Ser-Lys dyad mechanism. *J Biol Chem* **277**(11), 9512–9519
- Paetzel, M., Karla, A., Strynadka, N. C. J., & Dalbey, R. E. (2002b)** Signal peptidases. *Chem Rev* **102**(12), 4549–4580
- Palmer, T., Sargent, F., & Berks, B. C. (2005)** Export of complex cofactor-containing proteins by the bacterial Tat pathway. *Trends Microbiol* **13**(4), 175–180
- Patterson, G. H., Knobel, S. M., Sharif, W. D., Kain, S. R., & Piston, D. W. (1997)** Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys J* **73**(5), 2782–2790
- Peeters, N. & Small, I. (2001)** Dual targeting to mitochondria and chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* **1541**(1-2), 54–63
- Peltier, J. B., Friso, G., Kalume, D. E., Roepstorff, P., Nilsson, F., Adamska, I., & van Wijk, K. J. (2000)** Proteomics of the chloroplast: systematic identification and targeting analysis of lumenal and peripheral thylakoid proteins. *Plant Cell* **12**(3), 319–341
- Phillips, G. N. (1997)** Structure and dynamics of green fluorescent protein. *Curr Opin Struct Biol* **7**(6), 821–827
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., & Cormier, M. J. (1992)** Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**(2), 229–233
- Pujol, C., Maréchal-Drouard, L., & Duchene, A.-M. (2007)** How can organellar protein N-terminal sequences be dual targeting signals? In silico analysis and mutagenesis approach. *J Mol Biol* **369**(2), 356–367

- Reid, B. G. & Flynn, G. C. (1997)** Chromophore formation in green fluorescent protein. *Biochemistry* **36**(22), 6786–6791
- Reyes-Prieto, A., Weber, A. P. M., & Bhattacharya, D. (2007)** The origin and establishment of the plastid in algae and plants. *Annu Rev Genet* **41**, 147–168
- Richly, E. & Leister, D. (2004)** An improved prediction of chloroplast proteins reveals diversities and commonalities in the chloroplast proteomes of arabidopsis and rice. *Gene* **329**, 11–16
- Richter, S. & Lamppa, G. K. (2002)** Determinants for removal and degradation of transit peptides of chloroplast precursor proteins. *J Biol Chem* **277**(46), 43888–43894
- Richter, S., Lindenstrauss, U., Lücke, C., Bayliss, R., & Brüser, T. (2007)** Functional tat transport of unstructured, small, hydrophilic proteins. *J Biol Chem* **282**(46), 33257–33264
- Robinson, C. (2000)** The twin-arginine translocation system: a novel means of transporting folded proteins in chloroplasts and bacteria. *Biol Chem* **381**(2), 89–93
- Robinson, C., Cai, D., Hulford, A., Brock, I. W., Michl, D., Hazell, L., Schmidt, I., Herrmann, R. G., & Klösgen, R. B. (1994)** The presequence of a chimeric construct dictates which of two mechanisms are utilized for translocation across the thylakoid membrane: evidence for the existence of two distinct translocation systems. *EMBO J* **13**(2), 279–285
- Robinson, C. & Ellis, R. J. (1984)** Transport of proteins into chloroplasts. partial purification of a chloroplast protease involved in the processing of important precursor polypeptides. *Eur J Biochem* **142**(2), 337–342
- Robinson, D., Karnauchov, I., Herrmann, R. G., Klösgen, R. B., & Robinson, C. (1996)** Protease-sensitive thylakoidal import machinery for sec-, delta ph- and signal recognition particle-dependent protein targeting pathways, but not for cf0ii integration. *Plant J* **10**, 149–155
- Rodrigue, A., Chanal, A., Beck, K., Müller, M., & Wu, L. F. (1999)** Co-translocation of a periplasmic enzyme complex by a hitchhiker mechanism through the bacterial tat pathway. *J Biol Chem* **274**(19), 13223–13228
- Roy, L. M. & Barkan, A. (1998)** A secy homologue is required for the elaboration of the chloroplast thylakoid membrane and for normal chloroplast gene expression. *J Cell Biol* **141**(2), 385–395
- Rudhe, C., Chew, O., Whelan, J., & Glaser, E. (2002)** A novel in vitro system for simultaneous import of precursor proteins into mitochondria and chloroplasts. *Plant J* **30**(2), 213–220

- Rudolph, R., Böhm, G., Lilie, H., & Jaenicke, R. (1997)** in "Protein Function: A Practical Approach" (Creighton T. E., ed), pp. 57–99, Oxford University Press, Oxford
- Rudolph, R. & Lilie, H. (1996)** In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J* **10**(1), 49–56
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001)** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3 lab edition
- Samuelson, J. C., Chen, M., Jiang, F., Möller, I., Wiedmann, M., Kuhn, A., Phillips, G. J., & Dalbey, R. E. (2000)** YidC mediates membrane protein insertion in bacteria. *Nature* **406**(6796), 637–641
- Sanders, C., Wethkamp, N., & Lill, H. (2001)** Transport of cytochrome c derivatives by the bacterial tat protein translocation system. *Mol Microbiol* **41**(1), 241–246
- Santini, C. L., Bernadac, A., Zhang, M., Chanal, A., Ize, B., Blanco, C., & 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**(11), 8159–8164
- Santini, C. L., Ize, B., Chanal, A., Müller, M., Giordano, G., & Wu, L. F. (1998)** A novel sec-independent periplasmic protein translocation pathway in escherichia coli. *EMBO J* **17**(1), 101–112
- Sargent, F., Berks, B. C., & Palmer, T. (2002)** Assembly of membrane-bound respiratory complexes by the tat protein-transport system. *Arch Microbiol* **178**(2), 77–84
- Sargent, F., Bogsch, E. G., Stanley, N. R., Wexler, M., Robinson, C., Berks, B. C., & Palmer, T. (1998)** Overlapping functions of components of a bacterial sec-independent protein export pathway. *EMBO J* **17**(13), 3640–3650
- Sargent, F., Gohlke, U., Leeuw, E. D., Stanley, N. R., Palmer, T., Saibil, H. R., & Berks, B. C. (2001)** Purified components of the escherichia coli tat protein transport system form a double-layered ring structure. *Eur J Biochem* **268**(12), 3361–3367
- Sargent, F., Stanley, N. R., Berks, B. C., & Palmer, T. (1999)** Sec-independent protein translocation in escherichia coli. a distinct and pivotal role for the tatB protein. *J Biol Chem* **274**(51), 36073–36082
- Schatz, G. & Dobberstein, B. (1996)** Common principles of protein translocation across membranes. *Science* **271**(5255), 1519–1526
- Schägger, H., Cramer, W. A., & von Jagow, G. (1994)** Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem* **217**(2), 220–230

- Schägger, H. & von Jagow, G. (1991)** Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* **199**(2), 223–231
- Schleiff, E. & Klösgen, R. B. (2001)** Without a little help from 'my' friends: direct insertion of proteins into chloroplast membranes? *Biochim Biophys Acta* **1541**(1-2), 22–33
- Schneider, A., Behrens, M., Scherer, P., Pratje, E., Michaelis, G., & Schatz, G. (1991)** Inner membrane protease i, an enzyme mediating intramitochondrial protein sorting in yeast. *EMBO J* **10**(2), 247–254
- Schneider, A., Oppliger, W., & Jenö, P. (1994)** Purified inner membrane protease i of yeast mitochondria is a heterodimer. *J Biol Chem* **269**(12), 8635–8638
- Schreier, P. H., Seftor, E. A., Schell, J., & Bohnert, H. J. (1985)** The use of nuclear-encoded sequences to direct the light-regulated synthesis and transport of a foreign protein into plant chloroplasts. *EMBO J* **4**(1), 25–32
- Schuenemann, D., Amin, P., Hartmann, E., & Hoffman, N. E. (1999)** Chloroplast secY is complexed to secE and involved in the translocation of the 33-kda but not the 23-kda subunit of the oxygen-evolving complex. *J Biol Chem* **274**(17), 12177–12182
- Schuenemann, D., Gupta, S., Persello-Cartieaux, F., Klimyuk, V. I., Jones, J. D., Nussaume, L., & 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**(17), 10312–10316
- Settles, A. M. & Martienssen, R. (1998)** Old and new pathways of protein export in chloroplasts and bacteria. *Trends Cell Biol* **8**(12), 494–501
- Settles, A. M., Yonetani, A., Baron, A., Bush, D. R., Cline, K., & Martienssen, R. (1997)** Sec-independent protein translocation by the maize hcf106 protein. *Science* **278**(5342), 1467–1470
- Shackleton, J. B. & Robinson, C. (1991)** Transport of proteins into chloroplasts. the thylakoidal processing peptidase is a signal-type peptidase with stringent substrate requirements at the -3 and -1 positions. *J Biol Chem* **266**(19), 12152–12156
- Shanmugham, A., Sang, H. W. W. F., Bollen, Y. J. M., & Lill, H. (2006)** Membrane binding of twin arginine preproteins as an early step in translocation. *Biochemistry* **45**(7), 2243–2249
- Shen, L. M., Lee, J. I., Cheng, S. Y., Jutte, H., Kuhn, A., & Dalbey, R. E. (1991)** Use of site-directed mutagenesis to define the limits of sequence variation tolerated for processing of the m13 procoat protein by the escherichia coli leader peptidase. *Biochemistry* **30**(51), 11775–11781

- Shimomura, O. (1979)** Structure of the chromophore of aequorea green fluorescent protein
FEBS Letters **104**, 220–222
- Shimomura, O. (1995)** A short story of aequorin. *Biol Bull* **189**(1), 1–5
- Shimomura, O., Musicki, B., & Kishi, Y. (1988)** Semi-synthetic aequorin. an improved tool for the measurement of calcium ion concentration. *Biochem J* **251**(2), 405–410
- Siemering, K. R., Golbik, R., Sever, R., & Haseloff, J. (1996)** Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Curr Biol* **6**(12), 1653–1663
- Small, I., Wintz, H., Akashi, K., & Mireau, H. (1998)** Two birds with one stone: genes that encode products targeted to two or more compartments. *Plant Mol Biol* **38**(1-2), 265–277
- Smeekens, S., Bauerle, C., Hageman, J., Keegstra, K., & Weisbeek, P. (1986)** The role of the transit peptide in the routing of precursors toward different chloroplast compartments. *Cell* **46**(3), 365–375
- Soll, J. & Schleiff, E. (2004)** Protein import into chloroplasts. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(3), 198–208
- Sugiura, M. (1995)** The chloroplast genome. *Essays Biochem* **30**, 49–57
- Sung, M. & Dalbey, R. E. (1992)** Identification of potential active-site residues in the escherichia coli leader peptidase. *J Biol Chem* **267**(19), 13154–13159
- Tamura, T., Asakura, T., Uemura, T., Ueda, T., Terauchi, K., Misaka, T., & Abe, K. (2008)** Signal peptide peptidase and its homologs in arabidopsis thaliana—plant tissue-specific expression and distinct subcellular localization. *FEBS J* **275**(1), 34–43
- Theg, S. M., Cline, K., Finazzi, G., & Wollman, F.-A. (2005)** The energetics of the chloroplast tat protein transport pathway revisited. *Trends Plant Sci* **10**(4), 153–154
- Thomas, J. D., Daniel, R. A., Errington, J., & Robinson, C. (2001)** Export of active green fluorescent protein to the periplasm by the twin-arginine translocase (tat) pathway in escherichia coli. *Mol Microbiol* **39**(1), 47–53
- Thompson, S. J., Robinson, C., & Mant, A. (1999)** Dual signal peptides mediate the signal recognition particle/sec-independent insertion of a thylakoid membrane polyprotein, psby. *J Biol Chem* **274**(7), 4059–4066
- Timmis, J. N., Ayliffe, M. A., Huang, C. Y., & Martin, W. (2004)** Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat Rev Genet* **5**(2), 123–135
- Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J. D., Bron, S., & van Dijl, J. M. (2000)** Signal peptide-dependent protein transport in bacillus subtilis: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(3), 515–547

- Tschantz, W. R., Sung, M., Delgado-Partin, V. M., & Dalbey, R. E. (1993)** A serine and a lysine residue implicated in the catalytic mechanism of the escherichia coli leader peptidase. *J Biol Chem* **268**(36), 27349–27354
- Tsien, R. Y. (1998)** The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **67**, 509–544
- Tu, C. J., Schuenemann, D., & Hoffman, N. E. (1999)** Chloroplast ftsy, chloroplast signal recognition particle, and gtp are required to reconstitute the soluble phase of light-harvesting chlorophyll protein transport into thylakoid membranes. *J Biol Chem* **274**(38), 27219–27224
- Valent, Q. A., Scotti, P. A., High, S., de Gier, J. W., von Heijne, G., Lentzen, G., Wintermeyer, W., Oudega, B., & Luirink, J. (1998)** The escherichia coli srp and secb targeting pathways converge at the translocon. *EMBO J* **17**(9), 2504–2512
- van Dijl, J. M., de Jong, A., Venema, G., & Bron, S. (1995)** Identification of the potential active site of the signal peptidase sips of bacillus subtilis. structural and functional similarities with lexa-like proteases. *J Biol Chem* **270**(8), 3611–3618
- VanValkenburgh, C., Chen, X., Mullins, C., Fang, H., & Green, N. (1999)** The catalytic mechanism of endoplasmic reticulum signal peptidase appears to be distinct from most eubacterial signal peptidases. *J Biol Chem* **274**(17), 11519–11525
- Viitanen, P. V., Doran, E. R., & Dunsmuir, P. (1988)** What is the role of the transit peptide in thylakoid integration of the light-harvesting chlorophyll a/b protein? *J Biol Chem* **263**(29), 15000–15007
- Voelker, R. & Barkan, A. (1995)** Two nuclear mutations disrupt distinct pathways for targeting proteins to the chloroplast thylakoid. *EMBO J* **14**(16), 3905–3914
- Voelker, R., Mendel-Hartvig, J., & Barkan, A. (1997)** Transposon-disruption of a maize nuclear gene, tha1, encoding a chloroplast seca homologue: in vivo role of cp-seca in thylakoid protein targeting. *Genetics* **145**(2), 467–478
- von Heijne, G. (1983)** Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur J Biochem* **133**(1), 17–21
- von Heijne, G. (1985)** Signal sequences. the limits of variation. *J Mol Biol* **184**(1), 99–105
- von Heijne, G., Steppuhn, J., & Herrmann, R. G. (1989)** Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur J Biochem* **180**(3), 535–545
- Walker, M. B., Roy, L. M., Coleman, E., Voelker, R., & Barkan, A. (1999)** The maize tha4 gene functions in sec-independent protein transport in chloroplasts and is related to hcf106, tata, and tatb. *J Cell Biol* **147**(2), 267–276

- Ward, W. W. & Bokman, S. H. (1982)** Reversible denaturation of aequorea green-fluorescent protein: physical separation and characterization of the renatured protein. *Biochemistry* **21**(19), 4535–4540
- Ward, W. W. & Cormier, M. J. (1979)** An energy transfer protein in coelenterate bioluminescence. characterization of the renilla green-fluorescent protein. *J Biol Chem* **254**(3), 781–788
- Weber, T. (2007)** Biophysikalische charakterisierung von tat-substraten und -membranen, Master's thesis, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Weeden, N. F. (1981)** Genetic and biochemical implications of the endosymbiotic origin of the chloroplast. *J Mol Evol* **17**(3), 133–139
- Weiner, J. H., Bilous, P. T., Shaw, G. M., Lubitz, S. P., Frost, L., Thomas, G. H., Cole, J. A., & Turner, R. J. (1998)** A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins. *Cell* **93**(1), 93–101
- Wexler, M., Bogsch, E. G., Klösgen, R. B., Palmer, T., Robinson, C., & Berks, B. C. (1998)** Targeting signals for a bacterial sec-independent export system direct plant thylakoid import by the delta ph pathway. *FEBS Lett* **431**(3), 339–342
- Whatley, J. (1978)** A suggested cycle of plastid developmental interrelationships. *New Phytologist* **80**, 489–502
- Wienk, H. L., Czisch, M., & de Kruijff, B. (1999)** The structural flexibility of the preferred redoxin transit peptide. *FEBS Lett* **453**(3), 318–326
- Wienk, H. L., Wechselberger, R. W., Czisch, M., & de Kruijff, B. (2000)** Structure, dynamics, and insertion of a chloroplast targeting peptide in mixed micelles. *Biochemistry* **39**(28), 8219–8227
- Wieprecht, T., Apostolov, O., Beyermann, M., & Seelig, J. (1999)** Thermodynamics of the alpha-helix-coil transition of amphipathic peptides in a membrane environment: implications for the peptide-membrane binding equilibrium. *J Mol Biol* **294**(3), 785–794
- Wolfe, P. B., Wickner, W., & Goodman, J. M. (1983)** Sequence of the leader peptidase gene of escherichia coli and the orientation of leader peptidase in the bacterial envelope. *J Biol Chem* **258**(19), 12073–12080
- Woolhead, C. A., Thompson, S. J., Moore, M., Tissier, C., Mant, A., Rodger, A., Henry, R., & Robinson, C. (2001)** Distinct albino3-dependent and -independent pathways for thylakoid membrane protein insertion. *J Biol Chem* **276**(44), 40841–40846
- Wu, L. F., Chanal, A., & Rodrigue, A. (2000)** Membrane targeting and translocation of bacterial hydrogenases. *Arch Microbiol* **173**(5-6), 319–324

- Yang, F., Moss, L. G., & Phillips, G. N. (1996)** The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnol* **14**(10), 1246–1251
- Yang, T. T., Sinai, P., Green, G., Kitts, P. A., Chen, Y. T., Lybarger, L., Chervenak, R., Patterson, G. H., Piston, D. W., & Kain, S. R. (1998)** Improved fluorescence and dual color detection with enhanced blue and green variants of the green fluorescent protein. *J Biol Chem* **273**(14), 8212–8216
- Yuan, J., Henry, R., McCaffery, M., & Cline, K. (1994)** Seca homolog in protein transport within chloroplasts: evidence for endosymbiont-derived sorting. *Science* **266**(5186), 796–798
- Zhang, L. & Aro, E. M. (2002)** Synthesis, membrane insertion and assembly of the chloroplast-encoded d1 protein into photosystem ii. *FEBS Lett* **512**(1-3), 13–18
- Zhang, L., Paakkanen, V., Suorsa, M., & Aro, E. M. (2001)** A secy homologue is involved in chloroplast-encoded d1 protein biogenesis. *J Biol Chem* **276**(41), 37809–37814
- Zhbanko, M., Zinchenko, V., Gutensohn, M., Schierhorn, A., & Klösgen, R. B. (2005)** Inactivation of a predicted leader peptidase prevents photoautotrophic growth of *synechocystis* sp. strain pcc 6803. *J Bacteriol* **187**(9), 3071–3078
- Zwizinski, C. & Wickner, W. (1980)** Purification and characterization of leader (signal) peptidase from *escherichia coli*. *J Biol Chem* **255**(16), 7973–7977

Erklärung

Ich erkläre 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 benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle/Saale,

Peter Hanner

Danksagung

Als erstes möchte ich Prof. Dr. Ralf Bernd Klösgen für die Möglichkeit danken, dass ich meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anfertigen konnte. Dabei möchte ich ihm insbesondere für die stets aufmerksamen, kritischen und äußerst motivierenden Gespräche danken. Ich freue mich sagen zu können, es war meine bisher schönste Zeit an der Universität.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Mario Jakob, der mir stets unermüdlich in praktischen wie theoretischen Fragen mit seinem schier unerschöpflichen Wissen zur Verfügung stand und mit seiner Betreuung einen maßgeblichen Anteil an der Entwicklung und dem Gelingen dieser Arbeit hatte. Wenn ich Eines von ihm gelernt habe, dann mich an jeder Fragestellung festzubeißen und solange an dem Problem zu arbeiten, bis es gelöst ist.

Weiterhin möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Blume, insbesondere Dr. Andreas Kerth, Tina Weber und Dr. Anette Meister für die Kooperation betreffend der Filmwaage- und IRRAS-Messungen danken, die einen wichtigen Teil dieser Arbeit ausmachen.

Außerdem danke ich Dr. Hauke Lilie für die Hilfe bei den CD-Messungen und der analytischen Ultrazentrifugation sowie Heiko Pultke für die tatkräftige Unterstützung bei den ersten EGFP-Referenzen.

Frau Rose möchte ich für die langjährige Unterstützung in allen technischen Laborfragen danken. Herrn Platzer danke ich für die unermüdliche Pflege unserer Pflänzchen und die Nervenstärke bei den Unwegbarkeiten rund um das Gewächshaus. Frau Kuhnert möchte ich für die zuverlässigen Bestellabwicklungen danken. Ebenso möchte ich Frau Kitze danke sagen, die es wie keine Zweite verstand mit unermüdlichen Fleiß und Zuverlässigkeit das Sekretariat mit allem was dazu gehört zu führen.

Ganz besonders möchte ich Birgit danken. Mit ihr hatte ich das Glück neben einer äußerst zuverlässigen und immer freundlichen Kollegin, eine neue Freundin kennen gelernt zu haben. Weiterhin danke ich Manu, David und Martin für die stets interessanten und aufrechten Gespräche, die gerade gegen Ende dieser Arbeit eine Quelle schier unglaublicher „Motivase“ waren.

Anja danke ich, ebenso wie Steffi für die Unterstützung rund um die Problemchen der lieben Mitos. Bianca „II“ danke ich für die Unterstützung bei der transienten Transformation und der Fluoreszenzmikroskopie.

Ich möchte mich natürlich bei der gesamten Arbeitsgruppe für das ausgezeichnete Klima, für die vielen schönen Erinnerungen an Sessions im Kaffeeraum oder für die gemeinsamen Grillabende bedanken.

Ein ganz besondere Dank gilt meiner lieben Frau Yvonne, die mich in allen Lebenslagen, wie auch bei den Höhen und Tiefen dieser Arbeit unglaublich unterstützt hat. Ich glaube jedoch, dass sie in nächster Zeit nichts Schriftliches mehr von mir haben will. Weiterhin möchte ich meiner Familie und meinem Freund Lothar für die manigfaltige Unterstützung danken.

Schließlich danke ich „Ad Rem“ für den manchmal so nötigen Ausgleich zum Laboralltag.

Publikationsliste

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**(3), 333-47

Jakob, M., Kaiser, S., Hanner, P., Gutensohn, M., Schierhorn, A., and Klösgen, R.B. (*submitted*) Biochemical characterisation of the twin arginine translocation (Tat) machinery from *Arabidopsis thaliana*.

Hanner, P., Jakob, M., and Klösgen, R.B. (*in Vorbereitung*) Influence of the folding status on the transport efficiency of thylakoidal pH/Tat-substrates.

Hanner, P., Rödiger, A., Klösgen, R.B., and Jakob, M. (*in Vorbereitung*) Identification of the thylakoidal processing peptidase from *Arabidopsis thaliana*.

Kerth, A., Weber, T., Meister, A., Hanner, P., Jakob, M., Klösgen, R.B. and Blume, A. (*in Vorbereitung*) Interaction of TAT substrates with Thylakoid Lipids. An Infrared Reflection-Absorption Spectroscopy Study at the Air/Water Interface.

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Peter Hanner
Geburtsort: Halle/Saale
Familienstand: verheiratet
Wohnort: Eichelweg 4
06120 Halle/Saale
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1985–1988 POS „G.E. Lessing“ Halle
1988–1989 POS „Heide Nord III“ Halle
1989–1991 POS „Dr. Adam Kuckhoff“ Halle
1991–1997 Thomas-Müntzer-Gymnasium Halle
Juli 1997 Abitur

Zivildienst:

09/1997–09/1998 am Institut für Anatomie und Zellbiologie
(Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)

Studium:

10/1998–07/2003 Biochemiestudium am Fachbereich Biochemie/Biotechnologie
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Abschluß: Diplom-Biochemiker
Thema der Diplomarbeit: „Biochemische Charakterisierung
des Δ pH/Tat-Transportapparates von *Arabidopsis thaliana*“
seit 08/2003 Doktorand in der Arbeitsgruppe Prof. Klösgen am Institut
für Biologie – Pflanzenphysiologie, Fachbereich Biologie,
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Halle/Saale, Juli 2008

Peter Hanner