

# Funktionelle Charakterisierung von Teilschritten des Tat-abhängigen Proteintransports an der Thylakoidmembran

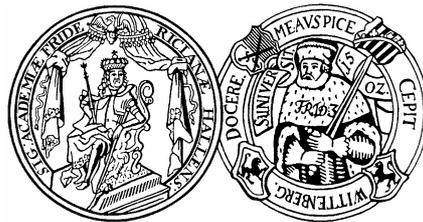


Dissertation

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

vorgelegt der

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



von Stefan Frielingsdorf  
geb. am 3.5.1979 in Lahr/Schwarzwald

Gutachter:

1. Prof. Dr. Ralf Bernd Klösgen
2. PD Dr. Thomas Brüser
3. Prof. Dr. Richard Zimmermann

Halle (Saale), 18.08.2008

Verteidigt am: 12.12.2008

**urn:nbn:de:gbv:3-000014989**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000014989>]

Der Saal ist voll, die Logen funkeln;  
Parterre und Sessel summt und lebt;  
Ganz oben klatscht man schon im Dunkeln,  
Bis rauschend sich der Vorhang hebt.

Alexander Puschkin

## Summary

To date four protein transport pathways have been identified at the thylakoid membrane of chloroplasts. One of these pathways, which also operates at the cytoplasmic membranes of bacteria and archaea, is referred to as Tat pathway (twin-arginine translocation) and mediates the transport of folded proteins across energised membranes. The Tat pathway acts independent from nucleoside triphosphates like ATP but depends on a proton gradient ( $\Delta\text{pH}$ ) or electric potential ( $\Delta\Psi$ ) across the membrane, respectively. The transport of passenger proteins is mediated by N-terminal extensions, the so-called signal peptides, which carry a highly conserved twin-arginine motif. This motif in turn led to the term twin-arginine translocation (Tat). Upon completion of the transport process signal peptides are generally removed by a corresponding signal peptidase. To date three proteins, namely TatA, TatB, and TatC, have been identified to be essential for Tat-dependent protein translocation in the plant system.

Since the Tat pathway is capable of transporting folded proteins a mechanism can be assumed differing from other pathways like the Sec pathway, which exclusively transports proteins in an unfolded conformation. Therefore, the present study focussed primarily on the characterisation of distinct steps of the translocation process aiming for the elucidation of the underlying mechanism. Analysis of single steps of the transport process was facilitated by using a chimeric protein referred to as 16/23 protein. Tat-dependent translocation of this protein is drastically slowed down so that two translocation intermediates can be detected. Thus, any manipulation of the transport system can be traced back to a certain step of the transport process.

In the first part of the present study this system revealed that proteins of the Tat translocase are dispensable for the initiation of the transport process. Instead, the presence of a membrane is sufficient for the formation of the first translocation intermediate. In the second part the protein TatA was found to be present in high molecular weight complexes within the chloroplast stroma. So far TatA was assumed to be an integral membrane component of the Tat translocase exclusively located within the thylakoid membrane. Soluble TatA is able to mediate the translocation step in particular, like it was previously described for membrane-integral TatA. The last part of the present study concentrated on the special feature of the 16/23 protein which leads to its slowed transport. It turned out that an increase in hydrophobicity within the processing site of the precursor protein leads to prolonged

association with a complex composed of the proteins TatB and TatC leading to a retardation of the transport process. In addition, dissociation of the precursor protein from the above mentioned complex is a prerequisite for terminal processing of the precursor protein to its mature form.

## Zusammenfassung

Bislang konnten vier Wege identifiziert werden, auf denen ein Protein in die chloroplastidäre Thylakoidmembran integriert bzw. über diese Membran transportiert werden kann. Einer dieser Wege ist der sogenannte Tat-Weg (*twin-arginine translocation*). Dieser Transportweg, der auch in der Cytoplasmamembran von Bakterien und Archaeen gefunden wird, zeichnet sich insbesondere durch die Fähigkeit aus, Proteine in vollständig gefalteter Konformation über eine Membran, welche einen Protonengradienten aufrechterhält, transportieren zu können. Gleichzeitig ist der Transport energetisch unabhängig von Nukleosidtriphosphaten wie ATP und benötigt lediglich einen Protonengradienten ( $\Delta\text{pH}$ ) bzw. einen elektrochemischen Gradienten ( $\Delta\Psi$ ), der an der Membran anliegt. Vermittelt wird der Transport durch Signalpeptide, die sich am N-Terminus des zu transportierenden Proteins befinden und ein sogenanntes Zwillingsarginin-Motiv (engl. *twin-arginine motif*) enthalten. Da dieses Motiv in den entsprechenden Signalpeptiden sehr stark konserviert ist, trug es auch zur Benennung des Transportwegs bei. Nach Abschluss des Transports werden die Signalpeptide im Allgemeinen durch eine Prozessierungspeptidase abgespalten. Bis heute wurden drei Proteine gefunden, die für den Tat-abhängigen Transport an der Thylakoidmembran essentiell sind und als TatA, TatB und TatC bezeichnet werden.

Da der Tat-Weg in der Lage ist gefaltete Proteine zu transportieren, ist davon auszugehen, dass die Translokation mechanistisch gesehen grundlegend anders ablaufen muss als z.B. der Transport über den Sec-Weg, welcher Proteine ausschließlich in ungefalteter Form transportiert. Daher lag der Fokus der vorliegenden Arbeit vorwiegend auf der genaueren Charakterisierung von Teilschritten des Tat-abhängigen Proteintransports, mit dem Ziel die Aufklärung des zu Grunde liegenden Mechanismus voranzutreiben. Die Analyse von Einzelschritten des Tat-Wegs wurde durch den Einsatz eines bestimmten chimären Transportsubstrats, dem sogenannten 16/23-Protein, ermöglicht. Der Transport dieses Proteins über den Tat-Weg ist derart verlangsamt, dass zwei Translokationsintermediate detektiert werden können. Durch die Verwendung des 16/23-Proteins ist es also jederzeit möglich zu verfolgen, inwiefern sich Veränderungen am Transportsystem auf den Fortgang des Transportprozesses auswirken.

So wurde im ersten Teil der Arbeit festgestellt, dass die Proteine der Translokase für die Initiation des Transportvorgangs nicht essentiell sind. Stattdessen muss lediglich eine Membran vorhanden sein, damit das erste Translokationsintermediat ausgebildet werden

kann. Im zweiten Teil der Arbeit stellte sich heraus, dass das Protein TatA in hochmolekularen Komplexen in löslicher Form im Stroma von Chloroplasten vorkommt. Bislang wurde es aber hauptsächlich als membranständiger Teil der Tat-Translokase beschrieben. Die lösliche Form ist, wie es zuvor für die membranständige Form beschrieben wurde, in der Lage den eigentlichen Translokationsschritt, in dem der reife Teil des Transportsubstrats über die Membran transportiert wird, zu vermitteln. Im letzten Teil der Arbeit wurde nach der besonderen Eigenschaft gesucht, die zur Verlangsamung des Transportprozesses des 16/23-Proteins führt. Dabei zeigte sich, dass eine Erhöhung der Hydrophobizität im Bereich der Prozessierungsstelle zu einer verlängerten Bindung an einen Komplex aus den Proteinen TatB und TatC führt. Dies hat wiederum insgesamt eine Verlangsamung des Transportprozesses zur Folge. Des Weiteren stellte sich heraus, dass die Dissoziation des Transportsubstrats von dem genannten Komplex aus TatB und TatC auch eine Voraussetzung für die finale Prozessierung zum reifen Protein und somit für den Abschluss des Transportprozesses darstellt.

<b>Summary .....</b>	<b>III</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>V</b>
<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IX</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Plastidäre Transportsignale .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Proteintransport an der Thylakoidmembran.....</b>	<b>4</b>
1.2.1 Proteinintegration in die Thylakoidmembran .....	5
1.2.2 Translokation löslicher Proteine über die Thylakoidmembran .....	6
1.2.2.1 Sec-Weg .....	7
1.2.2.2 Tat-Weg.....	7
<b>1.3 Das 16/23-Protein und dessen Transporteigenschaften.....</b>	<b>11</b>
<b>2 Ergebnisse.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Übersicht über Publikationen und Manuskripte .....</b>	<b>14</b>
<b>2.2 Spontane Membraninsertion als initialer Schritt des DpH/Tat-abhängigen Proteintransports .....</b>	<b>15</b>
2.2.1 Zusammenfassung .....	15
2.2.2 Artikel.....	17
2.2.3 Ergänzende Ergebnisse .....	29
2.2.3.1 Die Proteasestabilität der Translokationsintermediate wird nicht unspezifisch durch hydrophobe Agenzien induziert oder stabilisiert .....	29
2.2.3.2 Die Membraninsertion des 16/23-Proteins erfolgt zeitunabhängig.....	32
2.2.3.3 Die Membraninsertion des 16/23-Proteins erfolgt unabhängig vom RR-Motiv.. .....	33
2.2.3.4 Die Membraninsertion des 16/23-Proteins erfolgt unabhängig von den Lipiden der Membran.....	34
<b>2.3 Lösliches stromales TatA fördert den Tat-abhängigen Proteintransport über die Thylakoidmembran.....</b>	<b>36</b>
2.3.1 Zusammenfassung .....	36
2.3.2 Artikel.....	38
2.3.3 Ergänzende Ergebnisse .....	49
2.3.3.1 Fraktionierung des stromalen Extrakts über Dichtegradientenzentrifugation..	49
<b>2.4 Voraussetzungen für die finale Prozessierung von thylakoidären Tat-Substraten .....</b>	<b>51</b>
2.4.1 Zusammenfassung .....	51
2.4.2 Artikel.....	53
<b>3 Diskussion.....</b>	<b>62</b>
<b>3.1 Spontane Insertion – aber wie, in welcher Konformation und warum?.....</b>	<b>62</b>
3.1.1 Die Konformation des ersten Translokationsintermediats .....	63
3.1.2 Liposomen als artifizielles Membransystem.....	65

---

3.1.3	Spontane Membraninsertion von Vorläuferproteinen gegenüber Rezeptor- vermittelter Bindung als initialer Schritt des Tat-abhängigen Proteintransports .....	66
<b>3.2</b>	<b>Lösliche stromal lokalisierte TatA-Komplexe als Komponente der Tat- Translokase .....</b>	<b>67</b>
<b>3.3</b>	<b>Die Abspaltung von Tat-Signalpeptiden erfolgt mutmaßlich erst nach der Dissoziation des Vorläuferproteins vom TatBC-Komplex .....</b>	<b>70</b>
<b>3.4</b>	<b>Abschließendes Modell zum Mechanismus des Tat-abhängigen Proteintransports .....</b>	<b>73</b>
<b>4</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>75</b>
<b>5</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>85</b>
<b>5.1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>85</b>
<b>5.2</b>	<b>Publikationsliste .....</b>	<b>87</b>

---

## Abbildungsverzeichnis

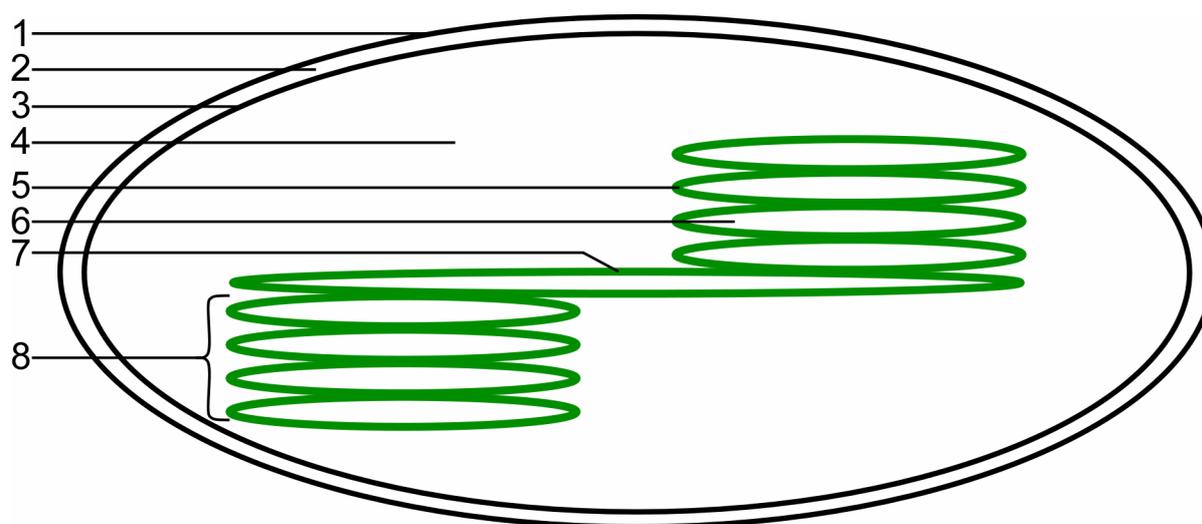
Abb. 1:	Übersicht über die chloroplastidäre Subkompartimentierung.....	2
Abb. 2:	Schematische Übersicht über Transitpeptide von Vorstufenproteinen. ....	3
Abb. 3:	Schema des Proteintransports vom Cytosol über die plastidären Hüllmembranen zu den Thylakoiden. ....	5
Abb. 4:	Struktur von Signalpeptiden. ....	7
Abb. 5:	Komponenten der Tat-Translokase in der Thylakoidmembran. ....	10
Abb. 6:	Schematische Darstellung des 16/23-Proteins. ....	11
Abb. 7:	Modell des Translokationsmechanismus. ....	12
Abb. 8:	Entstehung der für Ti-1 und Ti-2 spezifischen Degradationsprodukte. ....	15
Abb. 9:	Keine Stabilisierung der Strukturen von Translokationsintermediaten durch ein Detergens.....	29
Abb. 10:	Die Bildung von Ti-1 ist zeitunabhängig. ....	32
Abb. 11:	Die Bildung von Ti-1 ist unabhängig vom Zwillingsarginin-Motiv. ....	33
Abb. 12:	Die Bildung von Ti-1 ist unabhängig von den Lipiden der angebotenen Membran. ....	35
Abb. 13:	Aktivitätstest von Stroma-Fractionen. ....	50
Abb. 14:	Alternatives Modell zur Konformation des 16/23-Proteins nach spontaner Insertion.....	65
Abb. 15:	Analyse der Überstände nach Inkubation von Thylakoiden mit Vorläuferproteinen. ....	72
Abb. 16:	Modifiziertes Modell des Tat-abhängigen Translokationsmechanismus.....	73

## 1 Einleitung

Die Zelle als grundlegende Einheit des Lebens ist durch eine sie begrenzende Plasmamembran definiert. Membranen gewährleisten somit eine Kompartimentierung, die die Durchführung von biologischen Prozessen in einer definierten bzw. optimierten Umgebung ermöglicht. Die biologische Membran stellt jedoch keine impermeable Barriere dar, vielmehr besitzt sie eine selektive Permeabilität, die einen Fluss von z.B. Stoffwechselmetaboliten, Proteinen und Ionen zwischen den Kompartimenten reguliert. Diese selektive Permeabilität wird einerseits durch die Membran selbst und andererseits durch in die Membran integrierte Proteinkomplexe realisiert. Über solche Membranproteinkomplexe werden wiederum wichtige Prozesse ermöglicht, die zur Energiegewinnung dienen oder Signale der Umgebung ins Innere der Zelle weiterleiten bzw. verarbeiten, wie z.B. der Ablauf der Atmungskette sowie die Photosynthese oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und die Weiterleitung von sensorischen Stimuli durch Nervenimpulse.

Die eukaryotische Zelle zeichnet sich zusätzlich durch den Besitz von membranumschlossenen, subzellulären Organellen aus, wie z.B. Nukleus, Mitochondrien, Endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat, Peroxisomen und im Falle von pflanzlichen Zellen, Plastiden. Jedes Organell besitzt einen bestimmten Satz von Proteinen, die zur jeweiligen Ausführung der Organellfunktion nötig sind. Da diese Proteine überwiegend im Cytosol der Zelle synthetisiert werden, muss fast die Hälfte der Proteine einer durchschnittlichen Zelle zu den jeweiligen Bestimmungsorten über Membranen transportiert bzw. in diese integriert werden (Schatz & Dobberstein, 1996). Lediglich Mitochondrien und Plastiden tragen aufgrund ihres endosymbiontischen Ursprungs eigene Genome (Margulis, 1971; Weeden, 1981; Gray & Doolittle, 1982) und sind zur Genexpression befähigt. Der größte Teil der Genome dieser beiden Organellen wurde jedoch im Laufe der Evolution in das Kerngenom transferiert (Martin & Herrmann, 1998). Somit wird auch der größte Teil der mitochondriellen und plastidären Proteine im Cytosol synthetisiert, weshalb die Zelle die Sortierung und den Transport dieser Proteine durch entsprechende Mechanismen gewährleisten muss. Proteine, die in ein bestimmtes Organell transportiert werden sollen, werden im Allgemeinen als Vorläuferproteine synthetisiert. Das heißt, sie tragen ein zusätzliches Transportsignal, welches das Protein für den Transport in ein bestimmtes Organell markiert (Schatz & Dobberstein, 1996).

Bestimmte Organellen, wie z.B. Chloroplasten, sind wiederum auch selbst kompartimentiert (Abb. 1). Ihre Hülle besteht aus einem Doppelmembransystem und im Stroma der Chloroplasten befinden sich die Thylakoide, deren Membran der Ort des photosynthetischen Elektronentransports ist. Folglich entwickelte die Zelle auch Mechanismen für die Proteinsortierung innerhalb des Organells. Die korrekte Sortierung der Proteine innerhalb des Organells wird auch durch Transportsignale gewährleistet, die sich in der Primärsequenz der Vorläuferproteine befinden. Sie dirigieren die Proteine zu den entsprechenden Translokasen und vermitteln somit den Transport.



**Abb. 1: Übersicht über die chloroplastidäre Subkompartimentierung.**

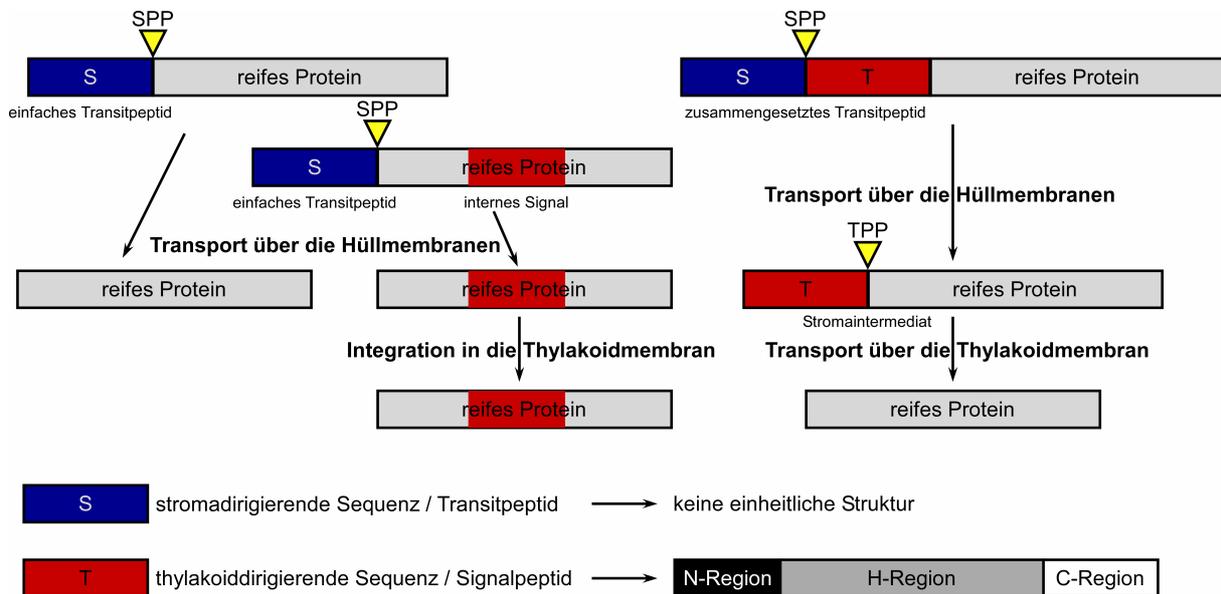
Jeder membranumschlossene Raum stellt ein Kompartiment dar, welches mit bestimmten Proteinen versorgt werden muss. (1) äußere Hüllmembran, (2) Intermembranraum, (3) innere Hüllmembran, (4) Stroma, (5) Thylakoidmembran, (6) Thylakoidlumen, (7) Stromathylakoide, (8) Granastapel.

## 1.1 Plastidäre Transportsignale

Das Transportsignal eines kerncodierten Plastidenproteins befindet sich im aminoterminalen Bereich des Vorläuferproteins und wird als Transitpeptid bezeichnet (Bruce, 2000). Dabei ist der Bestimmungsort des Proteins in der Aminosäuresequenz des Transitpeptids codiert, obwohl bislang für diese Peptide keine signifikante Sequenzhomologie festgestellt werden konnte (Bruce, 2001). Jedoch sind in Transitpeptiden häufig die Aminosäuren Serin und Threonin vertreten, wohingegen Seitenketten mit negativen Ladungen kaum vertreten sind (von Heijne *et al.*, 1989; Schatz & Dobberstein, 1996).

Es lassen sich weiterhin zwei Klassen von plastidären Transitpeptiden unterscheiden – die einfachen und die zusammengesetzten Transitpeptide (Abb. 2). Einfache Transitpeptide dirigieren ein Protein ins Stroma des Chloroplasten. Dabei wird der Transport über die beiden

Hüllmembranen durch die TOC- und TIC-Komplexe (TOC = *translocon at the outer envelope of chloroplasts*; TIC = *translocon at the inner envelope of chloroplasts*) realisiert (Jarvis, 2008). Im Stroma wird anschließend das Transitpeptid durch die stromale Prozessierungspeptidase (SPP) abgespalten (Robinson & Ellis, 1984).



**Abb. 2: Schematische Übersicht über Transitpeptide von Vorstufenproteinen.**

**Einfache Transitpeptide** vermitteln den Transport eines Proteins über die plastidären Hüllmembranen ins Stroma des Chloroplasten. Die stromadirigierende Sequenz (S) wird nach erfolgtem Transport durch die stromale Prozessierungspeptidase (SPP) abgespalten. Proteine der Thylakoidmembran, die nur über ein einfaches Transitpeptid verfügen, werden anhand eines internen Signals (*rot markiert*), welches nicht abgespalten wird, zur Thylakoidmembran geleitet.

**Zusammengesetzte Transitpeptide** vermitteln den Transport von Proteinen ins Thylakoidlumen bzw. deren Integration in die Thylakoidmembran. Dabei erfolgt zunächst der Transport ins Stroma, wo in den meisten Fällen die stromadirigierende Sequenz (S) durch die SPP abgespalten wird. Das entstandene Intermediat wird in die Thylakoide transportiert, wo anschließend das thylakoiddirigierende Signalpeptid (T) durch die Thylakoidprozessierungspeptidase (TPP) abgespalten wird. Stromadirigierende Sequenzen weisen keine einheitliche Struktur auf, die Strukturen thylakoiddirigierender Sequenzen können hingegen in drei Regionen eingeteilt werden.

Zusammengesetzte Transitpeptide bestehen hingegen aus einem stromadirigierenden und einem thylakoiddirigierenden Teil (Smeekens *et al.*, 1986; Ko & Cashmore, 1989). Der stromadirigierende Teil bewirkt, wie ein einfaches Transitpeptid, den Transport über die plastidären Hüllmembranen und wird in der Regel auch durch die SPP im Stroma abgespalten. Anschließend interagiert der thylakoiddirigierende Teil mit einer Translokase der Thylakoidmembran, das Protein wird schließlich über die Membran transloziert und die Thylakoidprozessierungspeptidase (TPP) (Kirwin *et al.*, 1987) setzt durch Abspaltung dieses Peptids das reife Protein frei. Allerdings gibt es Proteine, die in ihrem Transportverhalten von diesem Grundschemata abweichen. Das CF<sub>0</sub>II-Protein (Untereinheit II des CF<sub>0</sub>-Membranankers der ATP-Synthase) und die Untereinheit N des Photosystems I besitzen beispielsweise keine

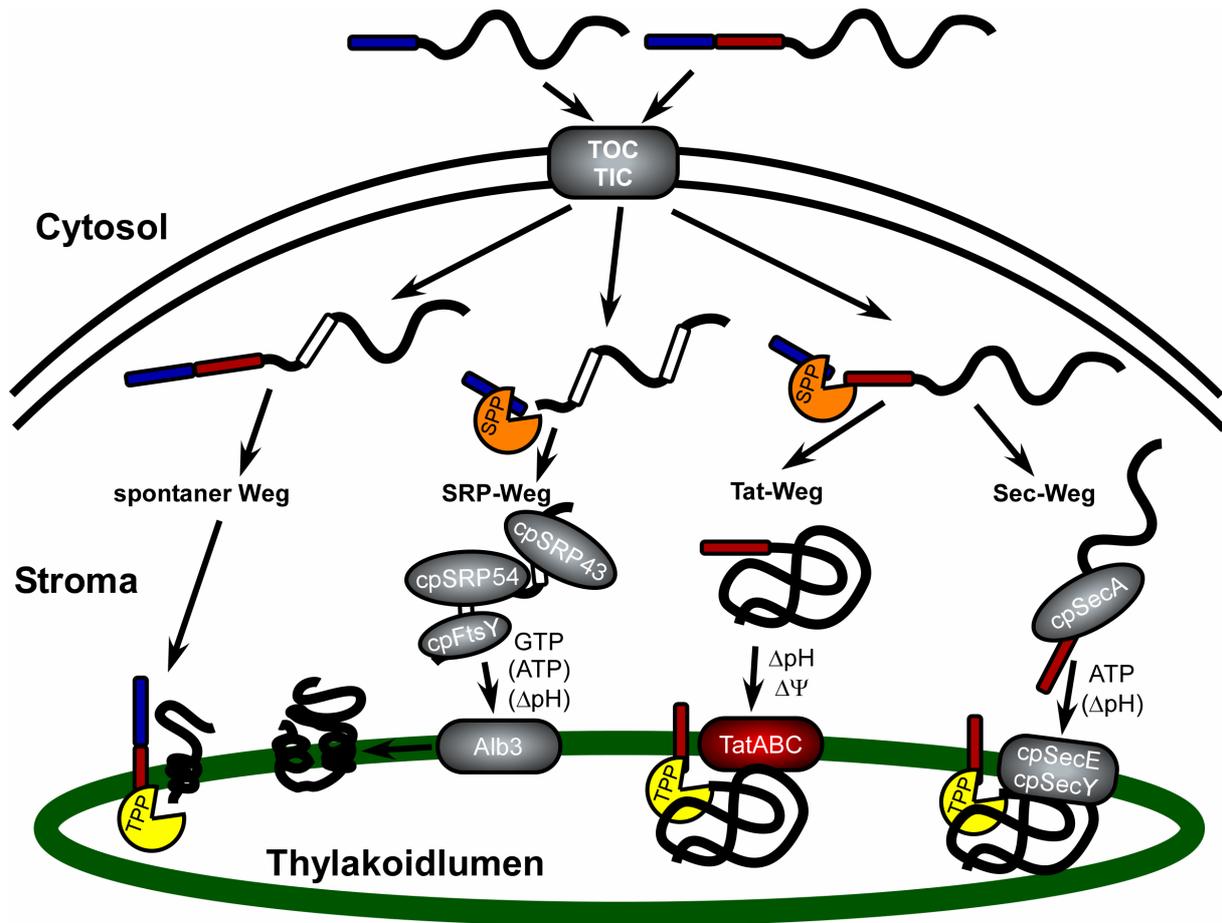
Prozessierungsstelle für die SPP. Das gesamte Transitpeptid wird daher erst nach Integration des Proteins in die Thylakoidmembran durch die TPP abgespalten (Michl *et al.*, 1994; Nielsen *et al.*, 1994).

Proteine der Thylakoidmembran bzw. des Thylakoidlumens, die nur ein einfaches Transitpeptid tragen, verfügen über eine thylakoiddirigierende Sequenz im reifen Teil (Viitanen *et al.*, 1988; Madueño *et al.*, 1994), die nicht abgespalten wird. Beispiele dafür sind das Rieske-Protein, LHCP (das Apoprotein des LHCII Komplexes) und CP24 (das 20 kDa Apoprotein des CP24-Komplexes von Photosystem II).

Die thylakoiddirigierenden Teile der zusammengesetzten Transitpeptide weisen eine weitgehend einheitliche Struktur auf, die allgemein als Signalpeptid bezeichnet wird. Diese Struktur kann in drei Bereiche eingeteilt werden (von Heijne *et al.*, 1989; von Heijne, 1990): Eine hydrophile, positiv geladene, N-terminale Region (N-Region), eine hydrophobe Kernregion (H-Region) und eine polare C-terminale Region (C-Region), welche an den Positionen -3 und -1 der TPP-Prozessierungsstelle Aminosäurereste mit kleinen Seitenketten besitzt (Abb. 2).

## 1.2 Proteintransport an der Thylakoidmembran

Derzeit sind vier verschiedene Wege bekannt, auf denen ein Protein über die Thylakoidmembran transportiert bzw. in diese integriert werden kann. Diese sind als SRP-abhängiger-, Sec-abhängiger-, spontaner und Tat-abhängiger Weg bekannt (Abb. 3) (Gutensohn *et al.*, 2006; Schünemann, 2007). Obwohl alle vier Wege in der Lage sind Membranproteine in die Thylakoidmembran zu integrieren, werden integrale Proteine hauptsächlich über den SRP-Weg in die Membran integriert bzw. inserieren sie spontan in die Thylakoidmembran. Lösliche Proteine hingegen werden ausschließlich über den Sec- als auch den Tat-Weg ins Thylakoidlumen transportiert.



**Abb. 3: Schema des Proteintransports vom Cytosol über die plastidären Hüllmembranen zu den Thylakoiden.**

Vorläuferproteine mit einfachen oder zusammengesetzten Transitpeptiden werden über die *TOC/TIC*-Komplexe zunächst ins Stroma transportiert. Dort wird in den meisten Fällen die stromadirigierende Sequenz durch die stromale Prozessierungspeptidase (*SPP*) abgespalten. Anschließend dirigieren N-terminale Signalpeptide oder interne Transportsignale die Proteine zu den verschiedenen Translokasen bzw. im Fall der spontanen Integration direkt zur Membran. Nachdem die Proteine das Thylakoidlumen erreicht haben bzw. in die Thylakoidmembran integriert wurden, spaltet die Thylakoidprozessierungspeptidase (*TPP*) die N-terminalen Signalpeptide ab.

### 1.2.1 Proteinintegration in die Thylakoidmembran

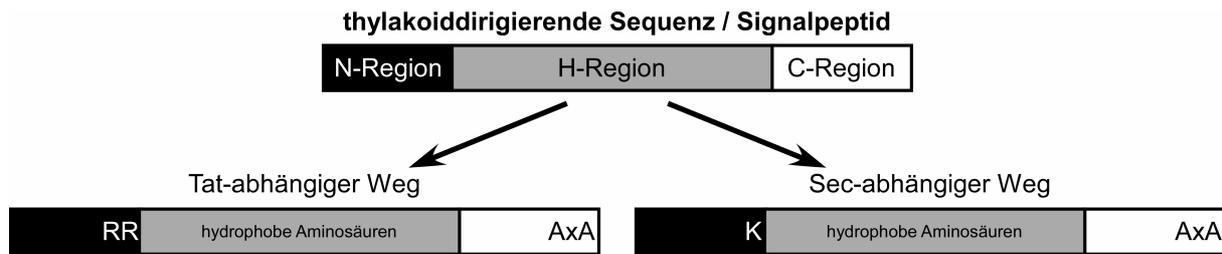
Eine bestimmte Klasse bitoper Membranproteine ist zur ‚spontanen‘ Integration in die Thylakoidmembran befähigt. Der entsprechende Transportweg wird als spontan bezeichnet, weil Proteine dieses Weges weder stromale Faktoren, noch Nukleosidtriphosphate oder einen Protonengradienten zur Integration benötigen (Michl *et al.*, 1994). Auch die Beteiligung von stromaexponierten Proteinkomponenten bzw. Rezeptorstrukturen ist unwahrscheinlich, da die Proteinintegration auch nach Proteasebehandlung von Thylakoiden noch möglich ist (Robinson *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1998). Dieser Weg zur Integration von Thylakoidmembranproteinen wurde zuerst für das  $CF_0II$ -Protein beschrieben (Michl *et al.*, 1994). Weitere spontan integrierende Proteine sind die Untereinheiten PsbW, PsbX und PsbY

des Photosystems II (Lorkovic *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1998; Thompson *et al.*, 1999) sowie die Untereinheit PsaK des Photosystems I (Mant *et al.*, 2001). Anhand der genannten Proteine ließ sich ableiten, dass die Integration dieser Klasse von Proteinen allerdings davon abhängt, dass ein thylakoiddirigierendes Signalpeptid vorhanden ist, welches wiederum die für die Integration nötige Hydrophobizität in sich trägt (Gutensohn *et al.*, 2006).

Der plastidäre SRP-Weg (*signal recognition particle*) dient in Analogie zum bakteriellen SRP-System (Müller *et al.*, 2001) vermutlich als Hauptroute zur Integration von polytopen Membranproteinen in die Thylakoidmembran. Er wurde vorrangig unter Verwendung von LHCP (das Apoprotein des LHCII Komplexes) als Transportsubstrat charakterisiert und scheint vorrangig für dieses Protein bzw. für dessen Derivate wirksam zu sein. Der Transport über diesen Weg hängt von den stromalen Faktoren cpSRP54 (Franklin & Hoffman, 1993; Li *et al.*, 1995), cpSRP43 (Schuenemann *et al.*, 1998) und cpFtsY (Kogata *et al.*, 1999) ab. Dabei weist cpSRP54 Homologie zum cytosolischen SRP auf. Außerdem ist das Membranprotein Alb3 (ein homologes Protein zum bakteriellen YidC bzw. zum mitochondrialen Oxa1p) am Transport beteiligt (Moore *et al.*, 2000). Als Energiequelle wird GTP für den Transport benötigt, wobei ATP und ein an der Thylakoidmembran anliegender Protonengradient zusätzlich stimulierend wirken (Schünemann, 2007). Erfolgt die Integration in die Membran allerdings co-translationell, so wie im Falle des D1 Proteins (eine Untereinheit des Photosystems II), wird das zu transportierende Protein lediglich von cpSRP54 im Stroma gebunden und anschließend über die cpSec-Translokase in die Membran integriert (Schünemann, 2007).

### 1.2.2 Translokation löslicher Proteine über die Thylakoidmembran

Lösliche Proteine werden anhand von Signalpeptiden zum Sec- bzw. Tat-Weg dirigiert. Diese Signalpeptide weisen zwar eine einheitliche Struktur auf, aber dennoch konnten Peptide, die zum Sec- bzw. Tat-Weg dirigieren, noch genauer charakterisiert und klassifiziert werden (Abb. 4). Eine Lysin-Seitenkette am Übergang der N- zur H-Region dirigiert dabei zum Sec-Weg, zwei aufeinanderfolgende Arginin-Reste (Zwillingsarginin-Motiv) an dieser Stelle leiten hingegen ein Protein zum Tat-abhängigen Weg (Chaddock *et al.*, 1995). Zusätzlich besitzen Tat-dirigierende Signalpeptide häufig die Aminosäure Lysin in ihrer C-Region (Bogsch *et al.*, 1997), welche ein Fehlleiten zum Sec-Weg verhindert und daher auch als „*Sec-avoidance*“-Motiv bezeichnet wird.



**Abb. 4: Struktur von Signalpeptiden.**

Die Struktur der Signalpeptide gliedert sich in eine positiv geladene *N-Region*, eine hydrophobe *H-Region* und eine *C-Region*, welche im Allgemeinen eine Schnittstelle für die Thylakoidprozessierungspeptidase mit der Sequenz Ala-x-Ala enthält. Ob ein Signalpeptid zum Tat-Weg oder zum Sec-Weg leitet, legt ein Zwillingsarginin-Motiv (*RR*) bzw. ein einzelnes Lysin (*K*) am Ende der *N-Region* fest.

### 1.2.2.1 Sec-Weg

Der Sec-abhängige Proteintransport über die Thylakoidmembran ist dem für Bakterien beschriebenen Sec-Weg (*secretory pathway*) sehr ähnlich (Mitra *et al.*, 2006; Robson & Collinson, 2006). Die bisher bekannten beteiligten Proteinkomponenten sind cpSecA, bei dem es sich um die Transport-ATPase handelt (Nakai *et al.*, 1994; Yuan *et al.*, 1994; Berghöfer *et al.*, 1995), cpSecY (Laidler *et al.*, 1995; Berghöfer & Klösigen, 1996) und cpSecE (Schuenemann *et al.*, 1999), die zusammen als Komplex die Translokationspore bilden. Alle Proteine zeigen Homologie zu entsprechenden bakteriellen Komponenten. Der Transport eines Proteins über die Thylakoidmembran wird durch die Hydrolyse von ATP getrieben (Robinson *et al.*, 1994), während ein Protonengradient über die Thylakoidmembran zwar nicht essentiell ist, aber häufig einen stimulierenden Effekt auf die Transporteffizienz aufweist (Mant *et al.*, 1995). Wie auch im bakteriellen System müssen Vorläuferproteine des Sec-Wegs im ungefalteten Zustand vorliegen, um transportiert werden zu können (Hynds *et al.*, 1998; Marques *et al.*, 2004).

### 1.2.2.2 Tat-Weg

Ähnlich wie beim Sec-Weg findet man auch zum plastidären Tat-Weg stark homologe Systeme in Bakterien und Archaeen (Sargent, 2007), was auf den endosymbiotischen Ursprung des in Plastiden vorhandenen Tat-Systems schließen lässt. Der Translokationsmechanismus dieses Weges ist im Vergleich zu anderen bisher bekannten Proteintransportwegen ungewöhnlich, weil für den Transport weder Energie in Form von Nukleosidtriphosphaten, noch stromale Faktoren benötigt werden (Mould *et al.*, 1991; Cline *et al.*, 1992; Klösigen *et al.*, 1992; Nielsen *et al.*, 1994). Lediglich ein Protonengradient ( $\Delta\text{pH}$ )

bzw. ein elektrochemischer Gradient ( $\Delta\Psi$ ) über der Thylakoidmembran ist als treibende Kraft essentiell (Braun *et al.*, 2007). Daher wurde der Tat-Weg ursprünglich auch als  $\Delta\text{pH}$ -Weg bezeichnet (Mould *et al.*, 1991; Cline *et al.*, 1992; Klösigen *et al.*, 1992). Außerdem sind drei Membranproteine nötig, die den Transportapparat bilden und als TatA, TatB und TatC bezeichnet werden (Müller & Klösigen, 2005).

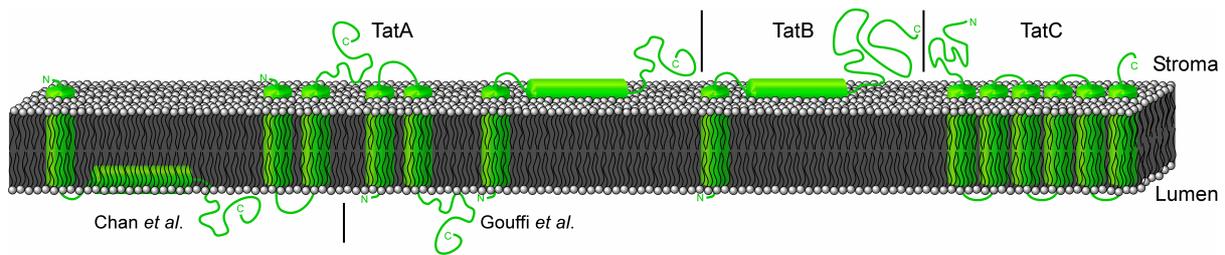
Die bemerkenswerteste Besonderheit des Tat-abhängigen Transportwegs ist aber die Fähigkeit, Proteine im gefalteten Zustand über eine Membran transportieren zu können, die einen Protonengradienten aufrecht erhält (Clark & Theg, 1997; Hynds *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 2001; Marques *et al.*, 2004). Daher handelt es sich bei den Substraten häufig um Proteine, die bereits vor dem Transport einen Cofaktor binden (Santini *et al.*, 1998; Weiner *et al.*, 1998) oder eine so stabile Faltung besitzen, dass sie nicht mehr zum Transport entfaltet werden können. Allerdings ist eine Faltung des Vorläuferproteins keine Voraussetzung für den Transport. Lediglich Proteine, die größere hydrophobe Bereiche auf ihrer Oberfläche exponieren, sind inkompatibel mit der Tat-Translokase (Richter *et al.*, 2007). Zudem werden selbst oligomere Strukturen über den Tat-Weg transportiert (Rodrigue *et al.*, 1999). Da sich unter den Substraten Proteine der Größenordnung von über 100 kDa finden, wurde der Durchmesser der entstehenden Transportpore auf 60-70 Å geschätzt (Berks *et al.*, 2000). Kryoelektronenmikroskopische Analysen von TatA zeigten, dass dieses Protein homooligomere Komplexe bildet, die eine verschlossene Pore darstellen könnten. Dabei wurde eine Vielzahl an Komplexen unterschiedlicher Größe gefunden, deren innere Durchmesser 30-70 Å betragen (Gohlke *et al.*, 2005).

Die Charakterisierung der Proteinkomponenten des beteiligten Transportapparats begann im pflanzlichen System mit der Maismutante *hcf106*. Diese Mutante weist eine erhöhte Chlorophyllfluoreszenz (*high chlorophyll fluorescence, hcf*) auf, da die Assemblierung der Photosysteme I und II sowie des Cytochrom *b<sub>6</sub>/f*-Komplexes gestört ist (Martienssen *et al.*, 1989). Weiterhin wurde eine Akkumulation der 16 und 23 kDa Untereinheiten des Wasserspaltungsapparats im Stroma der Chloroplasten beobachtet. Andere Proteine der Photosynthesekomplexe zeigten dieses Verhalten jedoch nicht (Voelker & Barkan, 1995). Da die 16 und 23 kDa Proteine keine Substrate des Sec-Wegs sind, sondern in Abhängigkeit vom Protonengradienten ( $\Delta\text{pH}$ ) transportiert werden (Mould *et al.*, 1991; Klösigen *et al.*, 1992), schlussfolgerte man, dass es sich bei dem *hcf106*-Protein um eine Komponente der  $\Delta\text{pH}$ -Translokase handeln musste. Nachdem das *hcf106*-Gen kloniert und dessen Nuklein- und Aminosäuresequenz aufgeklärt wurde (Settles *et al.*, 1997), zeigten Homologievergleiche, dass ein solches System auch in Bakterien existiert. In *E. coli* wurden

daraufhin vier Komponenten der Translokase identifiziert (Bogsch *et al.*, 1997; Sargent *et al.*, 1998; Weiner *et al.*, 1998; Sargent *et al.*, 1999). Da zwischenzeitlich im pflanzlichen System auf der Seite der Transportsubstrate das wichtige Zwillingsarginin-Motiv (*twin-arginine motif*) innerhalb der Signalpeptide identifiziert werden konnte (Chaddock *et al.*, 1995), wurde der entsprechende Transportweg und die bakteriellen Komponenten nach diesem Motiv als ‚Tat‘ für *twin-arginine translocation* bezeichnet (Sargent *et al.*, 1998). Die in Bakterien gefundenen Gene sind *tatA*, *tatB* und *tatC*, die zusammen auf dem *tatABCD* Operon liegen, und das monocistronische *tatE*. TatE weist allerdings eine hohe Homologie zu TatA auf (Wu *et al.*, 2000) und es handelt sich dabei offensichtlich um eine kryptische Genduplikation von TatA (Jack *et al.*, 2001).

Nachdem die Untereinheiten der Tat-Translokase in Bakterien identifiziert wurden, fand man neben dem bereits bekannten Hcf106 (TatB) auch die plastidären Homologen Tha4 (TatA/E) (Mori *et al.*, 1999; Walker *et al.*, 1999) und cpTatC (TatC) (Mori *et al.*, 2001; Motohashi *et al.*, 2001). Aus Gründen der Einfachheit spricht man allerdings heute auch im Falle der plastidären Komponenten der Tat-Translokase von TatA, TatB und TatC. Diese Begriffe werden auch im Rahmen dieser Arbeit synonym zu den ursprünglichen Bezeichnungen verwendet.

Die genauen Strukturen von TatA, TatB und TatC sind bislang nicht bekannt. Strukturvorhersagen und Topologiestudien zufolge geht man aber davon aus, dass TatA und TatB über jeweils eine Transmembrandomäne sowie eine amphipathische  $\alpha$ -Helix verfügen (Abb. 5) (Settles *et al.*, 1997; Chanal *et al.*, 1998), wobei sich die N-Termini beider Proteine auf der luminalen Seite der Membran (bzw. im Periplasma bei Bakterien) befinden. TatC hingegen zeichnet sich durch den Besitz von sechs Transmembrandomänen aus, wobei sich sowohl der N- als auch der C-Terminus im Stroma (bzw. Cytoplasma bei Bakterien) befinden (Behrendt *et al.*, 2004). Die angenommene Struktur von TatA konnte mittels Circular dichroismus- (CD) sowie Kernresonanzspektroskopie-Messungen (NMR) experimentell bestätigt werden (Lange *et al.*, 2007; Müller *et al.*, 2007). Andererseits ist die Topologie von TatA innerhalb der Membran noch nicht abschließend geklärt. Dabei wird diskutiert, dass die amphipathische  $\alpha$ -Helix auch eine Transmembrankonformation annehmen kann, wodurch sich sowohl N- als auch C-Terminus auf der luminalen Seite befinden können (Gouffi *et al.*, 2004). Einer neueren Studie zufolge ist TatA sogar genau entgegengesetzt zu den bisherigen Annahmen in der Membran verankert (Chan *et al.*, 2007) (Abb. 5).



**Abb. 5: Komponenten der Tat-Translokase in der Thylakoidmembran.**

Schematische Darstellung von *TatA*, *TatB* und *TatC*. Die Topologie von *TatA* innerhalb der Membran ist noch umstritten. Daher sind die bisher beschriebenen möglichen Topologien dargestellt (Gouffi *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2007). *TatB* verfügt über eine Transmembrandomäne sowie über eine amphipathische  $\alpha$ -Helix. *TatC* ist durch 6 Transmembrandomänen in der Membran verankert und verfügt über eine kleine N-terminale stromale Domäne.

Funktionell gesehen treten *TatB* und *TatC* in stabilen Komplexen in der Größenordnung von ca. 560-700 kDa zusammen und bilden den sogenannten Rezeptor-Komplex, an den das zu transportierende Vorläuferprotein bindet (Berghöfer & Klösgen, 1999; Cline & Mori, 2001). In Anwesenheit eines Protonengradienten kommt *TatA* hinzu und vermittelt den Transport des Proteins über die Membran, wobei ein konservierter Glutamat-Rest essentiell für die Funktion von *TatA* ist (Mori & Cline, 2002). Der Mechanismus dieses Translokationsschritts ist aber noch immer ungeklärt. Außerdem wird die Rolle des Protonengradienten noch immer diskutiert. Zunächst war unbestritten, dass der Protonengradient die einzige essentielle Energiequelle darstellt (Mould *et al.*, 1991; Cline *et al.*, 1992; Klösgen *et al.*, 1992), bis dessen Relevanz *in vivo* in Frage gestellt wurde (Finazzi *et al.*, 2003). Anhand von *in vitro* Daten wurde im gleichen Jahr berechnet, dass ca.  $7,9 \times 10^4$  Protonen pro transportiertem Protein freigesetzt werden, was einem  $\Delta G_{\text{Transport}}$  von  $6,9 \times 10^5$  kJ/mol transportiertem Protein entspricht (Alder & Theg, 2003). Inzwischen konnte aber auch im *in vitro* System gezeigt werden, dass der Transport sowohl vom  $\Delta\text{pH}$  als auch vom  $\Delta\Psi$  angetrieben werden kann (Braun *et al.*, 2007). Andererseits ist möglicherweise im bakteriellen System ausschließlich der  $\Delta\Psi$  für den Antrieb des Transports verantwortlich (Bageshwar & Musser, 2007).

Im Allgemeinen fand die funktionelle Analyse des Tat-Mechanismus hauptsächlich im pflanzlichen *in vitro* System statt, da ein entsprechendes bakterielles System bislang nur unzureichend etabliert ist. Dabei kamen häufig die Vorläuferproteine der 16 und 23 kDa Untereinheiten des Wasserspaltungsapparats von Photosystem II als Substrate zum Einsatz. Leider ist der Transport dieser Proteine im *in vitro* System zu schnell und zu effizient, um weitere Aussagen über den Transportmechanismus des Tat-Wegs machen zu können. Die Kriterien langsamer und weniger effizient transportiert zu werden erfüllt aber das sogenannte

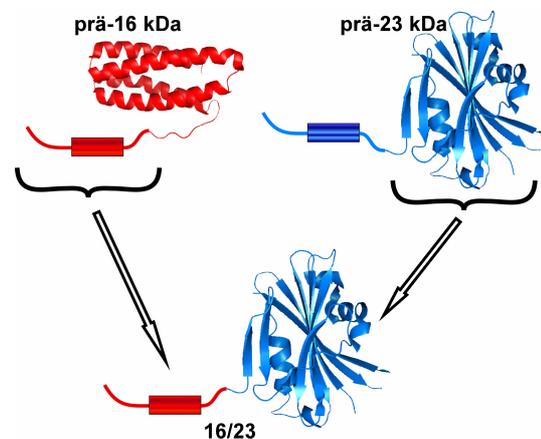
16/23-Protein, welches in dieser Arbeit hauptsächlich zum Einsatz kam und deshalb im Folgenden näher beschrieben wird.

### 1.3 Das 16/23-Protein und dessen Transporteigenschaften

Im Rahmen einer Promotionsarbeit wurde das 16/23-Protein erstellt und erstmals beschrieben (Clausmeyer, 1992). Hierbei handelt es sich nicht um ein natürliches Transportsubstrat, sondern um ein gentechnisch erzeugtes chimäres Protein, welches aus dem Transitpeptid des 16 kDa Proteins und dem reifen Teil des 23 kDa Proteins des Wasserspaltungsapparats zusammengesetzt ist (Abb. 6). Dabei sind beide Proteine Substrate des Tat-Wegs.

**Abb. 6: Schematische Darstellung des 16/23-Proteins.**

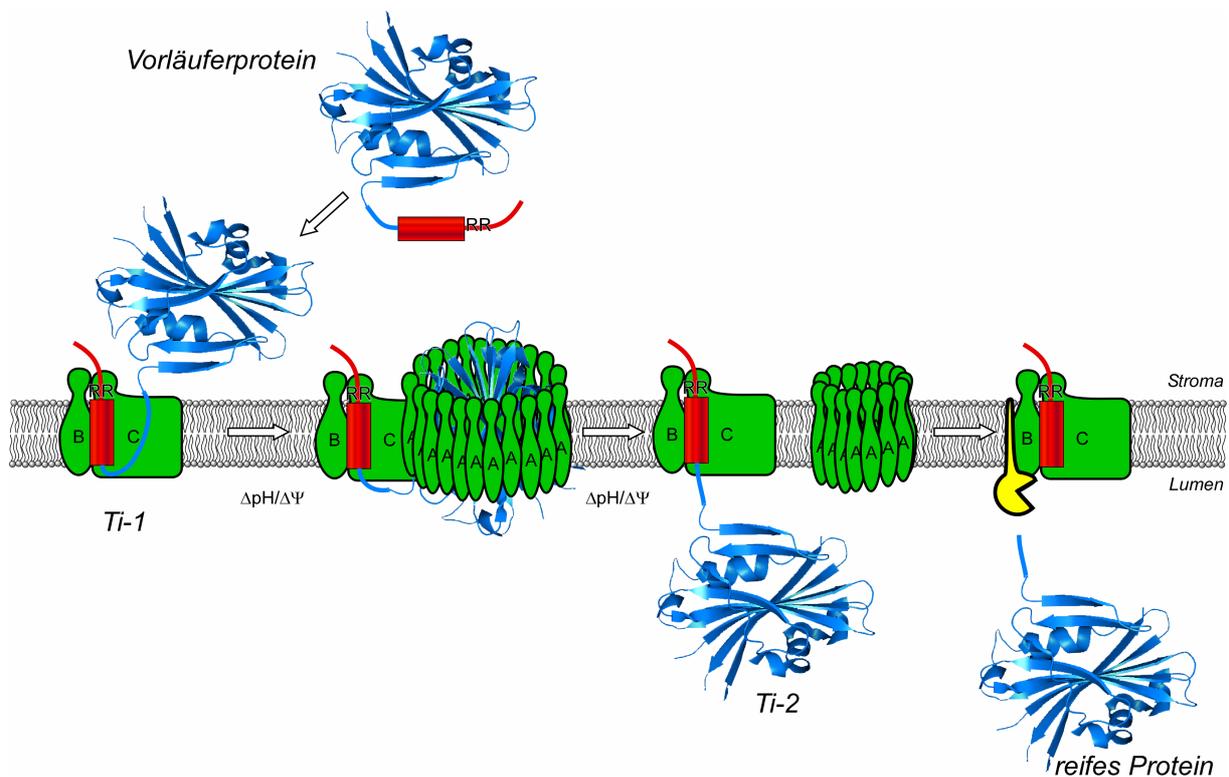
Das chimäre 16/23-Protein ist eine Fusion des gesamten Transitpeptids der 16 kDa Untereinheit (*rot*) und des reifen Teils der 23 kDa Untereinheit (*blau*) des Wasserspaltungsapparats von Photosystem II. Die hydrophoben Bereiche der Tat-dirigierenden Signalpeptide sind durch *Rechtecke* gekennzeichnet. Die Strukturen der reifen Teile der Proteine sind unter den folgenden PDB IDs verfügbar: 16 kDa – 1NZE und 23 kDa – 1V2B (Calderone *et al.*, 2003; Ifuku *et al.*, 2004).



Zunächst fiel nur auf, dass das Transitpeptid der 16 kDa Untereinheit den reifen Teil der 23 kDa Untereinheit mit nur sehr geringer Effizienz ins Thylakoidlumen transportiert (Clausmeyer, 1992; Clausmeyer *et al.*, 1993). Bei weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass dieses Protein zwar weiter auf dem Tat-Weg ins Thylakoidlumen transportiert wird, der Transportvorgang allerdings stark verlangsamt abläuft. Aufgrund der starken Retardierung ist es möglich, neben dem Vorläuferprotein und dem reifen Protein, auch zwei Translokationsintermediate zu detektieren (Berghöfer & Klösgen, 1999). Weiterhin konnten durch dieses Protein zwei mutmaßliche Komplexe der Tat-Translokase mit einem Molekulargewicht von ca. 560 und 620 kDa im *Blue Native*-Gel sichtbar gemacht werden (Berghöfer & Klösgen, 1999). Diese Komplexe enthalten die Proteine TatB und TatC, während TatA nicht vertreten ist (persönliche Mitteilung, Mario Jakob).

Verknüpft man die mechanistischen Daten anderer oben genannter Arbeiten mit den durch das 16/23-Protein gewonnenen Daten, so kann für dieses Protein ein erstes Modell des Tat-abhängigen Translokationsmechanismus erstellt werden (Abb. 7). Dem Modell zufolge

interagiert das 16/23-Protein vermutlich zunächst mit dem TatBC-Rezeptorkomplex und bildet so das erste Translokationsintermediat (Ti-1) aus. Dabei befinden sich sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus des Vorläufers im Stroma. Die Translokation des reifen Teils des Proteins über die Membran stellt den zweiten Schritt dar, welcher als einziger von einem  $\Delta pH$  bzw.  $\Delta \Psi$  abhängig ist. Die Translokation selbst wird durch TatA in einem noch unbekanntem Mechanismus vermittelt. Aus der Translokation des reifen Teils über die Membran ergibt sich das zweite Translokationsintermediat (Ti-2), welches noch durch den hydrophoben Bereich des Transitpeptids an den TatBC-Rezeptorkomplex gebunden ist und dessen N-Terminus sich im Stroma, der C-Terminus hingegen im Thylakoidlumen befindet. Im letzten Schritt spaltet die Thylakoidprozessierungspeptidase (TPP) die 23 kDa Untereinheit vom Transitpeptid ab und setzt damit das reife Protein ins Thylakoidlumen frei.



**Abb. 7: Modell des Translokationsmechanismus.**

Im ersten Schritt interagiert das Vorläuferprotein direkt mit der Translokase und bildet so das erste Translokationsintermediat (*Ti-1*). *Ti-1* weist eine Topologie auf, bei der sowohl N-, als auch C-Terminus im Stroma lokalisiert sind. Anschließend folgt die Translokation des reifen Teils ins Thylakoidlumen. Dieser Schritt hängt als einziger vom Protonengradienten ( $\Delta pH$ ) bzw. vom elektrochemischen Gradienten ( $\Delta Y$ ) ab. Das durch den Transport entstandene zweite Translokationsintermediat (*Ti-2*) wird schließlich durch die Thylakoidprozessierungspeptidase (*TPP*) gespalten und das reife Protein wird ins Thylakoidlumen freigesetzt. Das Zwillingsarginin-Motiv vor dem hydrophoben Bereich des Signalpeptids (*rotes Rechteck*) wurde durch *RR* gekennzeichnet.

Allerdings deuteten Daten einer weiteren Promotionsarbeit darauf hin, dass alternativ auch eine spontane Integration des 16/23-Proteins, durch die hydrophobe Domäne des

Signalpeptids und einen etwas weniger hydrophoben Bereich des reifen Teils, in die Thylakoidmembran als erster Schritt möglich ist (Hou, 2004). In diesem Modell würde die Interaktion des Proteins mit der Translokase erst durch laterale Verschiebung und Bindung des Vorläufers innerhalb der Membran stattfinden. Das membranintegrierte Vorläuferprotein weist dabei die gleiche Topologie auf wie die translokasegebundene Form. Diese können bisher technisch nicht voneinander unterschieden werden, weshalb beide Formen als Ti-1 bezeichnet werden.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Teilschritte des Tat-abhängigen Proteintransports, welche durch den Einsatz des chimären 16/23-Proteins sichtbar gemacht werden können, genauer zu charakterisieren.

Der Fokus lag zunächst auf den ersten Schritten des Transports. Dabei sollte geklärt werden, ob sich die vermutete direkte Interaktion des Vorläuferproteins mit der Thylakoidmembran durch die Verwendung von z.B. proteinfreien Modellmembranen bestätigen lässt. Im zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht, inwiefern lösliche stromale Komponenten den eigentlichen Schritt der Translokation des reifen Teils des Vorläuferproteins über die Membran beeinflussen können. Bisher wurden im pflanzlichen *in vitro* System keine stromalen Komponenten gefunden, die Einfluss auf den Transport ausüben (Mould *et al.*, 1991). Im bakteriellen System wurden hingegen viele Chaperone gefunden, die an Vorläuferproteine binden bevor sie transportiert werden (Sargent, 2007). Daher erschien es sinnvoll, auch den Translokationsschritt und insbesondere dessen Abhängigkeit von stromalen Komponenten mit Hilfe des 16/23-Proteins im pflanzlichen System genauer zu untersuchen. Abschließend wurde der Frage nachgegangen, worin sich das chimäre 16/23-Protein von authentischen Vorläuferproteinen unterscheidet und weshalb es so langsam und ineffizient transportiert wird.

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Übersicht über Publikationen und Manuskripte

Hou, B., **Frielingsdorf, S.** & Klösger, R.B. (2006) Unassisted membrane insertion as the initial step in  $\Delta pH$ /Tat-dependent protein transport. *J Mol Biol*, 355, 957-967.

Eigenanteil: Planung, Durchführung und Auswertung der folgenden Experimente: Charakterisierung der Integrität verschiedener membrangebundener Translokationsintermediate durch Behandlung von Thylakoidvesikeln mit chaotropen Salzen bzw. alkalischen Lösungen nach erfolgtem Import des 16/23-Proteins in isolierte Thylakoide. Proteasestabilitätstest des 16/23 Proteins in Lösung. Etablierung der Präparation von Liposomen. Charakterisierung des Insertionsverhaltens des 16/23 Proteins unter Verwendung von Liposomen im direkten Vergleich zu Thylakoidvesikeln.

Bearbeitung der Abbildungen und des Manuskripts.

**Frielingsdorf, S.** & Klösger, R.B. (2007) Prerequisites for terminal processing of thylakoidal Tat substrates. *J Biol Chem*, 282, 24455-24462.

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

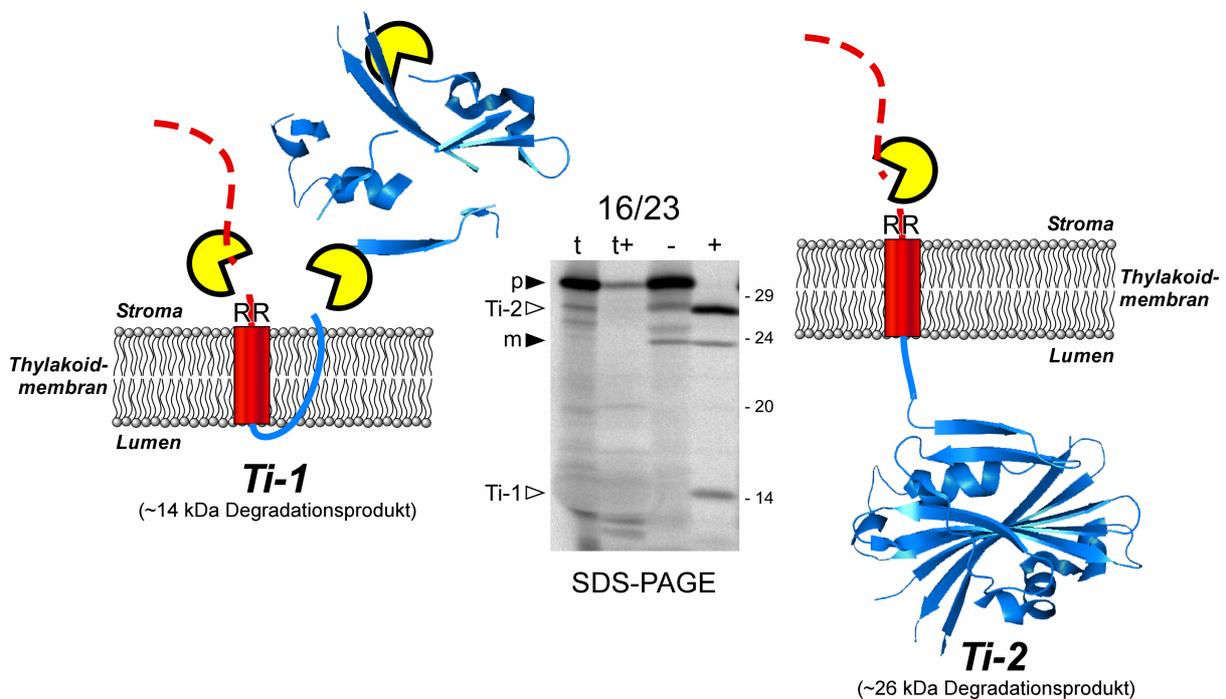
**Frielingsdorf, S.**, Jakob, M. & Klösger, R.B. (2008) Soluble stromal TatA promotes Tat-dependent protein transport across the thylakoid membrane. Manuskript eingereicht am 15.08.2008 bei *The Journal of Biological Chemistry*.

Eigenanteil: Planung, Durchführung und Auswertung aller Experimente ausgenommen der Gewinnung von Antikörpern sowie deren Affinitätsreinigung. Anfertigung des Manuskripts.

## 2.2 Spontane Membraninsertion als initialer Schritt des DpH/Tat-abhängigen Proteintransports

### 2.2.1 Zusammenfassung

Da das 16/23-Protein langsamer als authentische Vorläuferproteine transportiert wird, bietet es die Möglichkeit den Translokationsprozess in Teilschritte zu untergliedern. Technisch ist dies möglich, da nach Proteasebehandlung von Thylakoiden, zu denen das 16/23-Protein gegeben wurde, zwei Degradationsprodukte sichtbar werden, die wiederum spezifisch für die zwei Translokationsintermediate Ti-1 und Ti-2 sind (Abb. 8).



**Abb. 8: Entstehung der für Ti-1 und Ti-2 spezifischen Degradationsprodukte.**

In der Mitte ist das Ergebnis einer *in thylakoido* Transportreaktion nach erfolgter SDS-PAGE zu sehen. Dazu wurden isolierte Thylakoide mit radioaktiv markiertem 16/23-Protein für 15 min bei 25 °C im belichteten Wasserbad inkubiert, zweimal mit Puffer gewaschen und anschließend in zwei Fraktionen aufgeteilt. Davon blieb eine unbehandelt (-) und eine wurde mit der Protease Thermolysin (finale Konzentration: 200 µg/ml) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert (+). Stöchiometrische Mengen entsprechend 15 µg Chlorophyll wurden auf einem 10-17,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt und die radioaktiven Signale durch einen Phosphorimager sichtbar gemacht. In der Spur *t* wurde 1 µl des Translationsprodukts des 16/23-Proteins aufgetragen. Zusätzlich wurde proteasebehandeltes *in vitro* Translationsprodukt des 16/23-Proteins aufgetragen (*t+*). Die Positionen des Vorläuferproteins (*p*) und des reifen Proteins (*m*) sind durch schwarze Pfeile, die Translokationsintermediate (*Ti-1*, *Ti-2*) sind durch weiße Pfeile gekennzeichnet. Ein Molekulargewichts-Standard ist durch entsprechende Zahlen gekennzeichnet. Für weitere Details siehe (Hou *et al.*, 2006).

N- und C-Terminus des Vorläuferproteins können auf der stromalen Seite der Membran durch Proteasen auf der Stufe des ersten Translokationsintermediats (*Ti-1*) degradiert werden. Bei anschließender Auftrennung mittels SDS-PAGE ist ein ca. 14 kDa großes Degradationsprodukt zu detektieren. Im Fall des zweiten Translokationsintermediats (*Ti-2*) kann lediglich ein kleiner Teil des N-Terminus des Vorläuferproteins durch Proteasen auf der stromalen Seite der Membran degradiert werden. Daher ist dieses Translokationsintermediat als ca. 26 kDa großes Degradationsprodukt nach erfolgter SDS-PAGE zu detektieren.

Die Bestimmung der Topologie der beiden Intermediate ergab, dass sich im Fall von Ti-1 sowohl der N- als auch der C-Terminus auf der stromalen Seite der Thylakoidmembran befinden. Dagegen weist Ti-2 eine bitope Topologie auf, bei der sich der N-Terminus im Stroma, der C-Terminus aber bereits im Lumen befindet. Da es sich bei beiden Translokationsintermediaten um membrangebundene Proteine handelt wurde zusätzlich bestimmt wie stabil diese beiden Intermediate in der Membran verankert sind. Durch mehrfaches Waschen mit einfachem Puffer lässt sich keines der Intermediate entfernen. Ti-1 ließ sich insgesamt am leichtesten aus der Membran lösen, Ti-2 ist dagegen stärker in der Membran verankert. Unter aggressiven Bedingungen lassen sich allerdings beide Intermediate aus der Membran waschen. Solche Eigenschaften sind aber auch von anderen integralen Membranproteinen bekannt (Karnauchov *et al.*, 1997). Diese Ergebnisse unterstützen auch die bisherige Annahme, dass Ti-1 vermutlich in einer U-förmigen *loop*-Konformation in die Membran eingebunden ist und deshalb auch leichter aus dieser entfernt werden kann. Dagegen ist im Fall von Ti-2 der reife Teil des Proteins durch das transmembrane Signalpeptid in der Membran verankert und lässt sich somit auch schwerer aus der Membran entfernen.

Nachdem die beiden Translokationsintermediate genauer charakterisiert waren, galt es insbesondere die frühen Schritte die zur Bildung von Ti-1 führen detaillierter zu analysieren. Dabei war die zentrale Frage unter welchen Bedingungen die Entstehung von Ti-1 möglich ist. Zur Klärung dieser Frage wurden Thylakoide sowohl mit chaotropen Salzen bzw. alkalischer Lösung, mit spezifischen Antikörpern gegen die Untereinheiten der Translokase als auch mit Protease behandelt, bevor sie mit dem 16/23-Protein versetzt wurden. Es war davon auszugehen, dass durch die genannten Behandlungen bestimmte Teilschritte des Transportvorgangs unterbunden werden. In der Tat ist die Umsetzung von Ti-1 zu Ti-2 und reifem Protein nach jeder dieser Behandlungen nicht mehr möglich. Entgegen den Erwartungen ließ sich aber die Bildung von Ti-1 durch keine dieser Vorbehandlungen verhindern. Damit war klar, dass die Vorbehandlungen den Schritt der Translokation über die Membran verhindern, den ersten Schritt der initialen Bindung aber nicht. Selbst durch Mutation des Zwillingsarginin-Motivs zu zwei Lysinen, von der bekannt ist, dass sie die Tat-abhängige Translokation verhindert (Müller & Klösgen, 2005), lässt sich die Bildung des Ti-1 nicht verhindern. Die gesammelten Ergebnisse wiesen darauf hin, dass möglicherweise für die Bildung von Ti-1 keinerlei Interaktion des Vorläuferproteins mit Proteinkomponenten der Translokase nötig ist, sondern lediglich eine Membran vorhanden sein muss. Um dies zu testen, wurden proteinfreie Modellmembranen, sogenannte Liposomen eingesetzt. Werden

solche Liposomen mit dem 16/23-Protein versetzt und analog zu den bisher verwendeten Thylakoidvesikeln behandelt, so lässt sich tatsächlich die Bildung von Ti-1 nachweisen. Abschließend konnte auch für das authentische Vorläuferprotein der 23 kDa Untereinheit des Wasserspaltungsapparats die Bildung eines Ti-1 nachgewiesen werden. Allerdings nur sofern der Transport des Proteins durch entsprechende Vorbehandlungen der Thylakoidvesikel verhindert wird. Dies zeigt, dass die Entstehung von Translokationsintermediaten kein artifizielles Verhalten des 16/23-Proteins widerspiegelt.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass der initiale Schritt des Tat-abhängigen Proteintransports unabhängig von Proteinen stattfinden kann, es also zu einer spontanen Membraninsertion des Vorläuferproteins kommt, und erst anschließend die laterale Bindung an den TatBC-Rezeptorkomplex stattfindet. Allerdings kann eine direkte Interaktion des Vorläuferproteins mit dem TatBC-Rezeptorkomplex bislang nicht ausgeschlossen werden.

### **2.2.2 Artikel**

**JMB**Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®



## Unassisted Membrane Insertion as the Initial Step in $\Delta$ pH/Tat-dependent Protein Transport

Bo Hou, Stefan Frielingsdorf and Ralf Bernd Klösgen\*

*Institut für Pflanzenphysiologie  
Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg, Weinbergweg  
10, D-06120 Halle (Saale)  
Germany*

In the thylakoid membrane of chloroplasts as well as in the cytoplasmic membrane of bacteria, the  $\Delta$ pH/Tat-dependent protein transport pathway is responsible for the translocation of folded proteins. Using the chimeric 16/23 protein as model substrate in thylakoid transport experiments, we dissected the transport process into several distinct steps that are characterized by specific integral translocation intermediates. Formation of the early translocation intermediate Ti-1, which still exposes the N and the C terminus to the stroma, is observed with thylakoids pretreated with (i) solutions of chaotropic salts or alkaline pH, (ii) protease, or (iii) antibodies raised against TatA, TatB, or TatC. Membrane insertion takes place even into liposomes, demonstrating that proteinaceous components are not required. This suggests that Tat-dependent transport may be initiated by the unassisted insertion of the substrate into the lipid bilayer, and that interaction with the Tat translocase takes place only in later stages of the process.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** protein transport; Tat pathway; twin-arginine; thylakoid membrane; translocation intermediate

\*Corresponding author

### Introduction

Among the four protein transport pathways identified at the thylakoid membrane of chloroplasts, the  $\Delta$ pH-dependent twin arginine translocation (Tat) pathway shows a number of unique properties.<sup>1–3</sup> It is specifically engaged by proteins with signal peptides carrying a twin pair of arginine residues upstream of the hydrophobic core domain.<sup>4</sup> Furthermore, it operates independently of soluble factors and nucleoside triphosphates, and is energized exclusively by the proton gradient generated across the thylakoid membrane upon photosynthetic electron flow.<sup>5–8</sup> The latter gave rise to its initial name,  $\Delta$ pH-dependent pathway, although it should be mentioned that  $\Delta$ pH dependence of protein transport by the thylakoidal Tat pathway is controversially discussed.<sup>9,10</sup> However, the most remarkable

feature of the Tat pathway is its ability to accept folded proteins or protein domains as substrates,<sup>11–14</sup> which obviously has significant implications on the transport mechanism, as well as the structure and function of the translocase.

Three components of the thylakoidal  $\Delta$ pH/Tat transport machinery have been identified so far, called TatA (or Tha4), TatB (or Hcf106), and TatC (or cpTatC).<sup>15–17</sup> In pea thylakoids, these subunits form multimeric complexes of approximately 560 kDa and 620 kDa upon transport of a precursor protein.<sup>18</sup> More recently, the binding of transport substrates to an approximately 700 kDa TatB/C complex lacking TatA was reported.<sup>19</sup> TatA apparently joins this preformed TatB/C complex only transiently in the presence of both substrate and  $\Delta$ pH and is assumed to provide the transport pore.<sup>20</sup>

In bacteria, a closely related Tat pathway is operating in protein transport across the cytoplasmic membrane.<sup>3,21</sup> Like its counterpart in chloroplasts, it is engaged by transport signals carrying a twin-arginine motif,<sup>22</sup> it involves a translocase composed of the three subunits TatA, TatB, and TatC that are closely related to their plant counterparts, and it is capable of translocating folded proteins. In this case, folding of the substrate is even a prerequisite for transport,<sup>23</sup> whereas the thylakoidal Tat pathway seems to accept also

Present address: B. Hou, College of Medicine, 116 Reynolds Medical Building, Texas A&M University, College Station, TX 77843-1114, USA.

Abbreviations used: HiPIP, high potential iron–sulfur protein; GFP, green fluorescent protein; Tat, twin arginine translocation; Ti-1, translocation intermediate 1.

E-mail address of the corresponding author: [klosgen@pflanzenphys.uni-halle.de](mailto:klosgen@pflanzenphys.uni-halle.de)

unfolded polypeptides.<sup>12</sup> Such transport of both folded and unfolded substrates by the same translocase without dissipation of the transthylakoidal proton gradient that is generated during photosynthesis suggests that there is nothing like a preformed translocation channel or, if so, that its passage is gated and opened only on demand, i.e. in the presence of transport substrate. This implies that binding and translocation of the transport substrate might be independent processes that could be analyzed separately from each other.

Therefore, it was the goal of this work to characterize in detail the early steps in the Tat transport process, i.e. the initial association of the substrate protein with thylakoid membrane and Tat translocase. For this purpose, we made use of the chimeric 16/23 protein, which is composed of the transit peptide of the 16 kDa subunit and the mature part of the 23 kDa subunit, both of the oxygen-evolving system associated with photosystem II. This chimera is particularly well suited for the analysis performed, because it is translocated only slowly by the Tat machinery across the thylakoid membrane and thus allows us to dissect the transport process into several distinct steps that are characterized by distinct translocation intermediates.<sup>18</sup>

## Results

### Topology of the 16/23 translocation intermediates during thylakoid transport

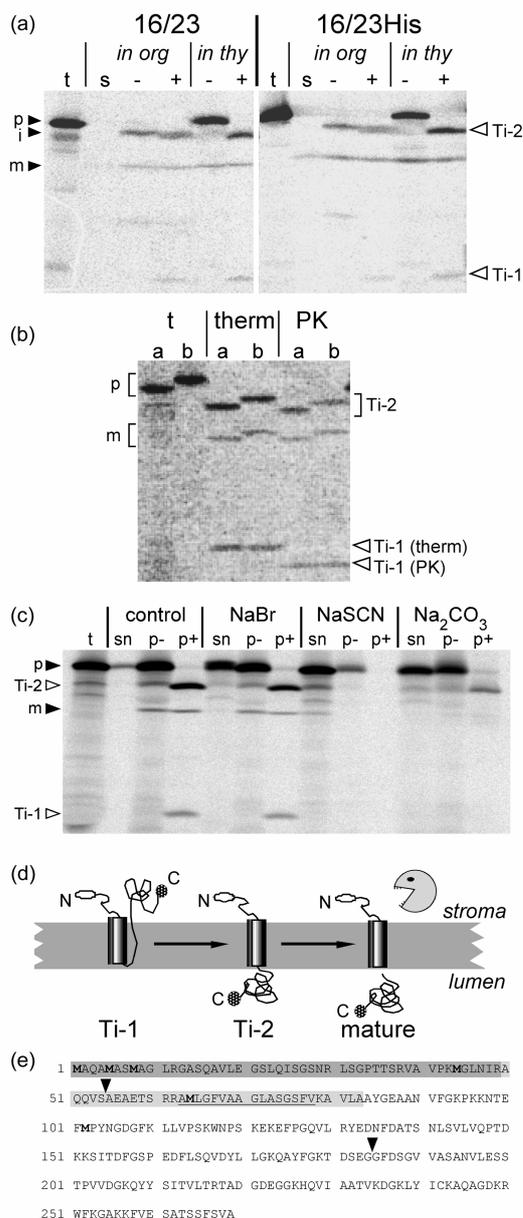
The chimeric 16/23 protein, which is composed of the transit peptide of the 16 kDa protein and the mature part of the 23 kDa protein, both from the oxygen-evolving system, is targeted by the  $\Delta pH/TAT$ -dependent pathway across the thylakoid membrane.<sup>18</sup> In contrast to the two corresponding authentic precursor proteins (pre-16kDa and pre-23kDa, respectively), which are likewise translocated by the Tat pathway, the 16/23 chimera is retarded significantly during membrane transport. Two consecutive translocation intermediates have been identified that are characterized by distinct degradation fragments protected against treatment of the thylakoid vesicles with protease.<sup>18</sup> While the early translocation intermediate-1 (Ti-1) corresponds to protease-protected fragments of approximately 12–4 kDa, depending on the protease applied, translocation intermediate-2 (Ti-2), which appears only later in the transport process, is represented by degradation fragments of approximately 25–26 kDa (Figure 1). Both translocation intermediates are found, irrespective of whether the import experiments are performed with intact chloroplasts (*in organello*) or thylakoid vesicles (*in thylakoido*).

In order to determine the topology of the two translocation intermediates within the membrane, a derivative of the 16/23 protein was generated carrying a carboxy-terminal tag of six histidine residues. Like the untagged protein, the 16/23His

polypeptide is retarded at two consecutive steps, which become apparent after treatment of the thylakoid vesicles with protease subsequent to the import reaction (Figure 1 and data not shown). According to their mobility upon SDS-PAGE, the degradation products of the 16/23 and 16/23His proteins characteristic for Ti-1 are identical in size, indicating that at this stage of the transport process the C termini of the polypeptides are still accessible to protease from the stromal side. In contrast, the protease-protected fragments indicative for Ti-2 as well as the terminal processing products accumulating in the thylakoid lumen show a difference in mobility on denaturing gels that corresponds well to the presence or the absence of the His<sub>6</sub>-tag (Figure 1(b)). The C termini of those polypeptides are thus no longer exposed on the stromal face of the membrane, demonstrating that during transition of Ti-1 to Ti-2, the C-terminal part of the 16/23 protein is transferred from the stromal side to the luminal side of the thylakoid membrane.

The N termini of the substrate proteins, on the other hand, were shown to remain on the stromal side of the membrane during Tat-dependent thylakoid transport.<sup>24</sup> In line with that, the size of corresponding translocation intermediates obtained after treatment of the thylakoids with protease in the *in thylakoido* and *in organello* assays is indistinguishable (Figure 1(a), lanes +), although the actual substrates for thylakoid transport in these two assays have different N termini. In *in thylakoido* experiments, it is the full precursor protein that binds to the thylakoid membrane, whereas in *in organello* assays the chloroplast import domain is removed in the stroma from the N terminus prior to thylakoid transport, yielding a polypeptide intermediate in size between precursor and mature protein (compare lanes – in Figure 1(a)).

Ti-1 and Ti-2 are anchored by electrostatic and hydrophobic interactions within the membrane. Extraction of the thylakoids after import of the 16/23 chimera by concentrated solutions of chaotropic salts like 2 M NaBr, which releases merely attached proteins from membranes, cannot remove the precursors that correspond to one of the two transport intermediates, as becomes apparent after treatment of the reisolated thylakoids with protease (Figure 1(c)). In contrast, treatment of the thylakoids with solutions of 2 M NaSCN extracts the membrane-embedded 16/23 precursor almost quantitatively and neither of the two intermediates is found after treatment with thermolysin. In this case though, extraction might have taken place also from the luminal side of the thylakoid membrane, since the integrity of the membrane vesicles is destroyed by the chaotropic salt and even the 23 kDa terminal processing product located in the thylakoid lumen is released. Treatment of the thylakoid vesicles after import of the 16/23 precursor with solutions of alkaline pH results in a differential behaviour of the two translocation intermediates. While Ti-1 is no longer found after membrane extraction with 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 11.4),



**Figure 1.** Topology of the integral Tat translocation intermediates. (a) The chimeric precursor proteins 16/23 and 16/23His were obtained by *in vitro* transcription/translation and incubated with either isolated pea chloroplasts (*in org*) or thylakoids (*in thy*) for 15 min at 25 °C in the light. After the import reaction, the chloroplasts were treated with thermolysin (100  $\mu$ g/ml) for 20 min on ice, reisolated by centrifugation through a Percoll cushion, and fractionated into stroma (lanes *s*) and thylakoids. These thylakoids, as well as those recovered from thylakoid import assays, were treated with either thermolysin (150  $\mu$ g/ml, 30 min on ice, lanes +), or mock-treated (lanes -). Stoichiometric amounts of each chloroplast fraction, corresponding to 12.5  $\mu$ g of chlorophyll, were separated on SDS/10–17.5% polyacrylamide gradient gels and visualized by phosphorimaging. In lanes *t*, 1  $\mu$ l of the *in vitro* translation assay was loaded. The positions of the precursor (*p*), stromal intermediate (*i*) and mature polypeptides (*m*) are indicated by filled arrowheads, while open arrowheads point to the positions of the two integral translocation intermediates,

demonstrating that the electrostatic interactions involved in anchoring are relatively weak in this case, at least some of the bitopic Ti-2 remains in the membrane fraction under these conditions (Figure 1(c)). It is extracted only if the pH of the solution is further raised, e.g. by addition of 0.1 M NaOH (pH 13.0) (data not shown), which results in more drastic alteration of the surface charge.

These results suggest a scenario (Figure 1(d)) in which the early transport intermediate (Ti-1) assumes an integral membrane conformation, with both termini of the protein being exposed to the chloroplast stroma, while most of the signal peptide as well as the N-terminal region of the passenger protein are protected by the thylakoid membrane against proteolysis (Figure 1(e)). In later stages of the transport process, the C-terminal part of the protein is translocated into the thylakoid lumen, giving rise to the bitopic topology of Ti-2 in which only the N-terminal segment of the signal peptide remains on the stromal side of the membrane. Finally, the signal peptide is removed by the activity of the thylakoidal processing peptidase, and the mature terminal processing product is released into the thylakoid lumen.

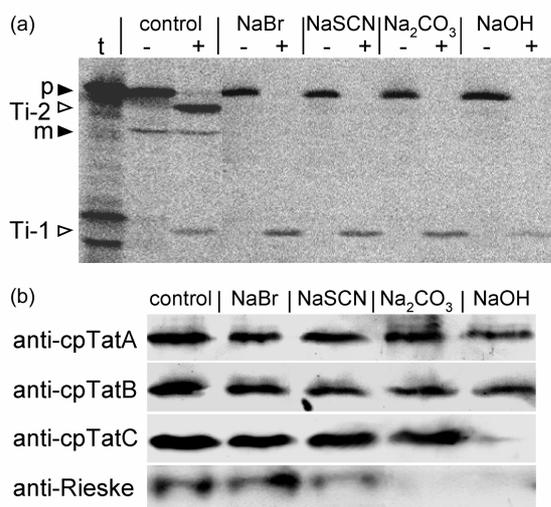
#### Formation of Ti-1 does not require functional Tat machinery

In order to analyze the early steps of the transport process leading to the formation of Ti-1 in more

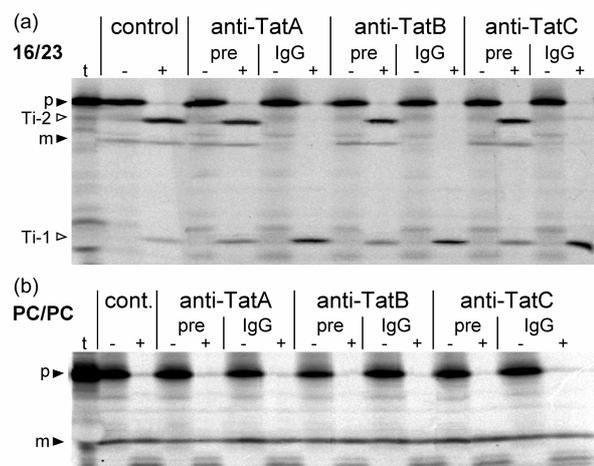
Ti-1 and Ti-2. (b) Thylakoid transport of the chimeras 16/23 (lanes a) and 16/23His (lanes b) was performed as in (a), except that post-import protease treatment was performed independently with either thermolysin (therm) or proteinase K (PK) at a concentration of 150  $\mu$ g/ml each. Brackets indicate the mobility of the respective precursor, mature and Ti-2 polypeptides. The position of Ti-1 obtained after thermolysin and proteinase K treatment is shown by open arrowheads. (c) Extraction of the 16/23 chimera by solutions of chaotropic salts or alkaline pH. Thylakoids recovered after import of the 16/23 chimera were resuspended in HMS buffer containing either 2 M NaBr, 2 M NaSCN, 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 11.4), or no additive (control). After incubation for 30 min on ice, the assays were separated into a supernatant (sn) and a membrane fraction that were subsequently treated with either thermolysin (p+), or mock-treated (p-). (d) A drawing of the presumed topology of the translocation intermediates Ti-1 and Ti-2 within the thylakoid membrane. The N-terminal stroma targeting domain of the transit peptide is depicted by an open ellipse, while the filled circle indicates the C-terminal hexahistidinyl-tag in the 16/23His chimera. (e) Amino acid sequence of the chimeric 16/23 protein. The stroma targeting and thylakoid targeting domains of the transit peptide are indicated by dark and light shading, respectively. The methionine residues used for radioactive labelling are typed in bold letters. The hydrophobic segment in the thylakoid targeting signal peptide is underlined. The arrowheads indicate potential thermolysin cleavage sites which are assumed to mark the boundaries of the protease protected fragment of Ti-1 according to its mobility upon SDS-PAGE.

detail, import experiments were performed with thylakoid vesicles treated with solutions of either chaotropic salts or alkaline pH prior to the import reaction. Each of these treatments destroys the ability of the thylakoids to import the 16/23 chimera, since neither Ti-2 nor the terminal processing product are found in either of these assays, while control thylakoids that were treated with HM buffer (see Materials and Methods) show no difference from untreated thylakoids in such experiments (Figure 2(a)). More remarkably, neither of these treatments prevents the formation of Ti-1. Instead, in assays analyzing thylakoids that were pretreated with either 2 M NaBr, 2 M NaSCN or 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, even an increase in the amount of Ti-1 is observed (Figure 2(a)). This indicates that, in such membrane vesicles, the transport process is frozen at the Ti-1 stage and transition from Ti-1 to Ti-2 is prevented. Furthermore, Ti-1 accumulates even in thylakoids that were pretreated with 0.1 M NaOH, which destroys the integrity of the thylakoid vesicles and releases TatC from the membrane (Figure 2(b)). Although the amount of Ti-1 accumulating in this instance is less than in thylakoids treated with 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> or solutions of chaotropic salts, it still reaches levels similar to those of the control assays (Figure 2(a)). This observation suggests that the formation of Ti-1, and thus the initiation of  $\Delta pH/Tat$ -dependent thylakoid transport, might not depend strictly on a fully functional Tat machinery.

This conclusion was confirmed by several independent experimental approaches. In the first



**Figure 2.** Import of the 16/23 chimera into salt-extracted or alkaline-extracted thylakoids. Isolated pea thylakoids were treated with solutions of chaotropic salts or alkaline pH as described in Figure 1(c), washed extensively in HM buffer and (a) used for transport experiments with the 16/23 chimera as shown in Figure 1, or (b) subjected to Western analysis using polyclonal antisera raised against TatA, TatB, TatC, or the Rieske Fe/S protein. For further details, see the legend to Figure 1.



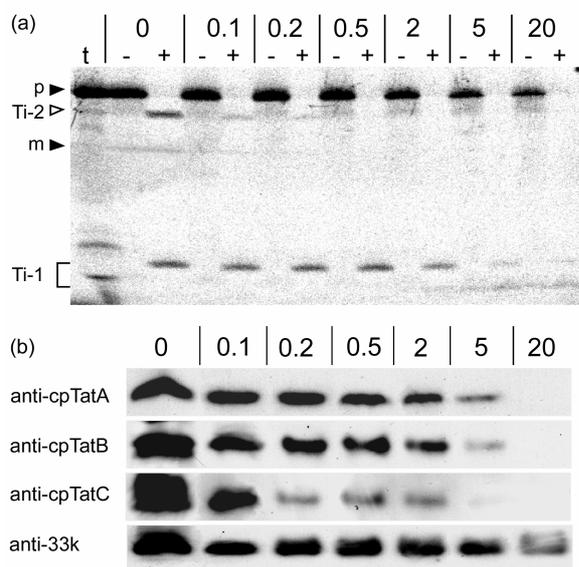
**Figure 3.** Protein transport into thylakoids with immunoblocked Tat machinery. Isolated pea thylakoids were incubated for 40 min at 4 °C with either pre-immune serum (pre), polyclonal antisera (IgG) raised against TatA (anti-TatA), TatB (anti-TatB), or TatC (anti-TatC), or mock treated (control), as indicated above the lanes. After washing with HM buffer, thylakoids were recovered and subjected to transport experiments with (a) the 16/23 chimera or (b) the authentic precursor protein PC/PC. For further details, see the legend to Figure 1.

approach, antibodies raised against the stroma-exposed hydrophilic domains of TatA, TatB and TatC were used to examine the involvement of the corresponding Tat components in the different steps of the membrane transport process. For this purpose, thylakoid vesicles were incubated separately with either of these antibodies and subsequently assayed in thylakoid import experiments. In order to avoid artificial import inhibition caused by unspecific cross-reactivity, only antibodies purified by immuno-affinity chromatography were used. As expected, protein transport of plastocyanin, a substrate of the thylakoidal Sec-pathway that was analyzed as control, is unaffected after immunoblocking of the Tat subunits (Figure 3(b)). In contrast, thylakoid translocation of the 16/23 chimera is abolished in each case. Neither Ti-2 nor the terminally processed mature 23 kDa protein are found accumulating in any of these assays, demonstrating that each of the three Tat components is essential for  $\Delta pH/Tat$ -dependent transport (Figure 3(a)). However, formation of Ti-1 is not affected. Instead, similar to the results described above for thylakoids extracted with salt solutions, the amount of this early translocation intermediate is even increased, in line with the assumption that inhibition of Tat translocase function freezes the transport process at the stage of Ti-1. Thus, there is no hint for the requirement of Tat subunits for insertion of the chimeric 16/23 substrate into the thylakoid membrane.

### The 16/23 chimera is capable of inserting into thylakoids treated with protease

The second approach is based on the assumption that receptor domains of proteinaceous membrane transport machineries, which are responsible for initiating the transport process by interaction with the substrate, are generally exposed on the *cis*-side of the target membrane and are therefore sensitive to proteolytic attack. In order to examine if protease-sensitive structures on the stromal face of thylakoids are essential for the formation of Ti-1, thylakoid vesicles pretreated with different amounts of protease were assayed in thylakoid import experiments. Three different proteases (thermolysin, trypsin, and proteinase K) were used for proteolysis to take into account potential resistance of thylakoid components against a specific proteolytic enzyme. Before the actual import analysis, residual proteolytic activity was removed by repeated washing steps followed by supplementing the assays with appropriate protease inhibitors (EDTA, trypsin inhibitor, and PMSF).

The efficiency of proteolysis was examined by Western analysis using the antisera against TatA, TatB, and TatC described above. It turned out that TatC is particularly sensitive to proteolytic attack from the stromal side and is degraded quantitatively at low concentrations of any of the enzymes used (Figure 4(b) and data not shown), which is in



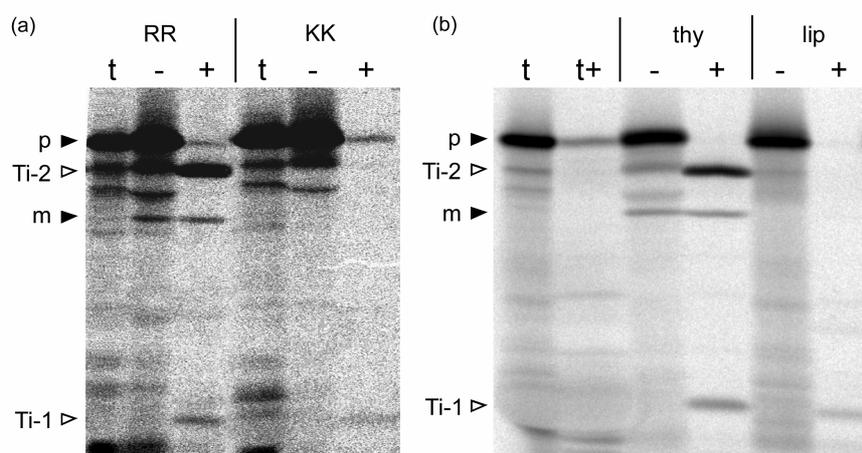
**Figure 4.** Import of the 16/23 chimera into protease-treated thylakoids. Pea thylakoids were incubated for 30 min on ice in HM buffer containing proteinase K at concentrations given above the lanes (in  $\mu$ g/ml). After extensive washing in HM buffer containing 2 mM PMSF, samples were divided and (a) used in transport experiments with the 16/23 chimera as described in Figure 1, or (b) subjected to Western analysis as described for Figure 2, except that antisera against the 33 kDa subunit of the oxygen-evolving complex were applied in the control assays.

line with the presumed role of TatC as the first receptor component of the thylakoidal Tat translocase.<sup>25</sup> In contrast, in contrast to results in the literature,<sup>26</sup> TatA is particularly resistant to proteolysis in our hands. Although all three proteases are able to reduce the amount of TatA in the thylakoid membrane significantly, only proteinase K at high concentration (20  $\mu$ g/ml) seems to destroy this subunit quantitatively (Figure 4 and data not shown). However, at this concentration of enzyme even the luminal 33 kDa subunit of the oxygen-evolving system is partially degraded (Figure 4b), indicating that the thylakoid vesicles begin to disintegrate under these conditions.

Formation of both Ti-2 and the terminal processing product is prevented when using proteinase K-treated thylakoids in import experiments with the chimeric 16/23 protein. Remarkably, this is true even for thylakoids that had been treated with only a low concentration of enzyme ( $\leq 0.2$   $\mu$ g/ml), which apparently leaves TatA and TatB largely unaffected (Figure 4(a)), demonstrating that the thylakoidal Tat machinery depends for its function on components that are very sensitive to proteolytic attack. In contrast, formation of Ti-1 is not affected significantly in either case (Figure 4(a)), not even with thylakoids lacking all three TAT proteins. The amount of the 14 kDa proteolytic fragment is reduced in thylakoids treated with a high concentration of proteinase K but in these instances an additional fragment of 12 kDa is observed. This 12 kDa proteolytic fragment is found irrespective of whether the thylakoids were treated after import with thermolysin (Figure 4(a)), demonstrating that it is the consequence of proteinase K activity that was not completely inactivated in the assays (see also Figure 1(b) for comparison). Essentially identical results were obtained with thylakoids pretreated with either trypsin or thermolysin, except that degradation of the Tat subunits, and thus inhibition of Tat-dependent protein transport, was not as efficient as with proteinase K (data not shown). These results are in line with the hypothesis that membrane insertion of the chimeric 16/23 protein can take place independently of functional Tat machinery.

### Formation of Ti-1 does not depend on the RR-motif in the signal peptide

It has been shown by several laboratories that protein transport by the Tat pathway depends strictly on the presence of the RR-motif in the thylakoid-targeting signal peptide, and that even conservative replacement of the two arginine residues leads to the complete block of membrane transport.<sup>3</sup> In order to examine whether this RR-motif is required also for the initial membrane insertion step, a derivative of the 16/23 chimera was generated in which the two arginine residues were replaced by lysine. Thylakoid import experiments showed that membrane transport of the resulting 16/23KK derivative is indeed abolished,



**Figure 5.** Insertion of the 16/23 chimera into membranes does not depend on the RR-motif in the signal peptide or on the Tat machinery. (a) Thylakoid transport experiments were performed as described for Figure 1 with both the original 16/23 chimera (RR) and the 16/23KK derivative (KK). (b) Membrane insertion properties of the 16/23 chimera were determined with artificial phospholipid vesicles (lip). For comparison, thylakoid transport assays analogous to those shown in (a) were loaded (thy). In lane t+, an aliquot of the *in vitro* translation assay treated with thermolysin was loaded. For further details, see the legend to Figure 1.

as expected. Neither the terminal processing product nor Ti-2 is detected in these assays (Figure 5(a)), confirming that the RR-motif is crucial for Tat-dependent transport. However, binding of the 16/23KK precursor to the membrane is not affected to any notable extent (Figure 5(a), lanes –). Furthermore, the protein is still capable of inserting into the thylakoid membrane, because the proteolytic fragment indicative for Ti-1 appears after treatment of the thylakoid vesicles with protease (Figure 5(a), lanes +). The amount of Ti-1 accumulating in this case is reduced compared to that observed after import of the original 16/23 chimera but this may not be the result of sequence-specific differences in the insertion process. Instead, it seems to reflect different degrees of stability of the inserted polypeptide within the membrane (data not shown).

#### The 16/23 chimera is capable of inserting into protein-free lipid vesicles

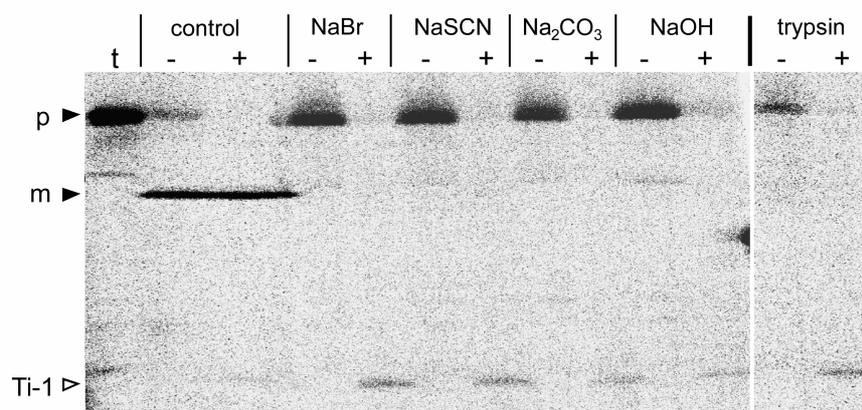
Final proof for our hypothesis, that membrane insertion of the 16/23 protein is an inherent property of this polypeptide and thus independent of any proteinaceous transport machinery, was obtained from experiments with liposomes. These liposomes were prepared from chemically pure membrane lipids like phosphatidyl choline, and thus did not contain any protein. Remarkably, incubation of these lipid vesicles with the 16/23 chimera under thylakoid import conditions results in strong binding of the polypeptide to the membranes, which cannot be released even by repeated washing with import buffer (Figure 5(b)). Even more strikingly, subsequent treatment of these liposomes with thermolysin leads to the formation of several distinct degradation products. The most

prominent of these proteolytic fragments has a size of approximately 14 kDa and shows mobility upon SDS-PAGE that is indistinguishable from that of Ti-1 generated during thylakoid import (Figure 5(b)). In our opinion, this result provides conclusive evidence that the 16/23 chimera is indeed capable of inserting into membranes independently from any proteinaceous import machinery.

#### Unassisted membrane insertion of authentic precursor proteins

In order to examine whether unassisted membrane insertion may be a general phenomenon during Tat-dependent membrane transport or whether it is a unique property of the 16/23 chimera only, several of the experiments described above were repeated with the authentic precursor of the 23 kDa subunit of the oxygen-evolving complex (23/23). Integral membrane translocation intermediates have not been reported for any authentic  $\Delta pH/Tat$  substrate protein, presumably because thylakoid transport of these proteins is generally too fast to allow detection of such structures. Indeed, if the 23/23 precursor polypeptide is analyzed in *in thylakoido* experiments, more than 90% of the protein is found processed to the mature form already after 5 min (Figure 6, control lanes). Remarkably, in rare cases a weak band of approximately 14 kDa can be detected after treatment of the thylakoids with thermolysin (Figure 6 and data not shown) which is strongly reminiscent of the degradation product of the 16/23 chimera indicative for Ti-1.

To study this phenomenon in more detail, transport of the authentic 23/23 precursor was analyzed with thylakoid vesicles that had been pretreated with either protease or concentrated



**Figure 6.** Import of the authentic 23/23 precursor protein into thylakoids extracted with chaotropic salts, alkaline pH, or protease. Thylakoid transport was performed as described for Figures 2 and 4, except that trypsin (80  $\mu$ g/ml) and trypsin inhibitor (50  $\mu$ g/ml) instead of proteinase K and PMSF were employed. For further details, see the legend to Figure 1.

solutions of chaotropic salts or alkaline pH. As expected, thylakoid transport of the protein is abolished completely in these assays, and neither the mature 23 kDa protein nor a proteolytic fragment corresponding to Ti-2 can be detected (Figure 6). However, in each case, a protease-protected fragment of approximately 14 kDa is found after treatment of the thylakoids with thermolysin (Figure 6). In line with the results obtained for the 16/23 chimera (Figure 2), this putative translocation intermediate accumulates in significantly greater amounts in such transport-incompetent thylakoid vesicles, suggesting that also in these instances the transport process was frozen at an early stage. Furthermore, these results demonstrate clearly that also authentic substrates of the thylakoidal  $\Delta$ pH/Tat machinery like the 23/23 precursor protein are capable of inserting into the thylakoid membrane independent of the presence of functional Tat machinery.

## Discussion

Here, we describe the unusual mechanism by which  $\Delta$ pH/Tat-dependent protein transport across the thylakoid membrane can be initiated. As demonstrated here, transport may not necessarily start with the interaction of the substrate protein with proteinaceous receptors exposed on the surface of the target membrane. Instead, it can be initiated by the unassisted insertion of the substrate protein into the lipid bilayer of the target membrane. Only in subsequent stages of the transport process, the substrate protein must interact with the Tat translocase in order to achieve complete translocation across the membrane.

### Transient insertion of the 16/23 chimera into the thylakoid membrane

The discovery of this mechanism was facilitated by the transport characteristics of the chimeric

16/23 polypeptide, which is translocated across the membrane in a retarded manner so that two distinct and consecutive translocation intermediates (Ti-1, Ti-2) can be identified.<sup>18</sup> While the late translocation intermediate (Ti-2) is of bitopic topology with the N terminus facing the stroma and the C terminus exposed in the thylakoid lumen (Figure 1(a)), the early translocation intermediate (Ti-1) is presumably inserted into the membrane in a kind of loop conformation, i.e. with both the N and C terminus located on the stromal (*cis*) side of the thylakoid membrane (Figure 1(a) and (b)). Such a topology demands the temporary development of two membrane segments within the 16/23 polypeptide. One of them is probably provided by the hydrophobic domain present in the signal peptide, whereas the other one must be supplied by the passenger polypeptide if the size of Ti-1 is considered (Figure 1(e)). Closer inspection of the 23 kDa protein shows that the region predicted to insert into the membrane in Ti-1 assumes an amphipathic  $\alpha$ -helical structure in the fully folded mature protein (data not shown).<sup>27</sup> Amphipathic  $\alpha$ -helices are known to interact spontaneously with lipid bilayers,<sup>28</sup> so the development of a temporary membrane segment appears possible. In contrast, there is no direct evidence that in Ti-1 the hydrophilic region between the two presumed membrane segments reaches the luminal (*trans*) side of the thylakoid membrane. Despite its remarkable resistance to proteases acting from the stromal side of the membrane (Figures 1–5), partial insertion of the 16/23 chimera into the membrane interfacial region leaving the hydrophilic segment on the *cis*-side of the membrane cannot be strictly ruled out.

Temporary loop conformation of proteins during membrane transport is typical for protein secretion processes.<sup>29</sup> However, in most instances, loop insertion of the substrate protein depends on the presence of a proteinaceous translocase, whereas in the case of the 16/23 chimera the Tat machinery is dispensable for the insertion process. Formation of

Ti-1 is observed with thylakoid vesicles that were pretreated with concentrated solutions of chaotropic salts or alkaline pH (Figure 2), or even with protease destroying the stroma-exposed domains of Tat translocase (Figure 4). Furthermore, membrane insertion of the 16/23 protein is not prevented by immunoblocking of either of the three Tat subunits (Figure 3) nor by mutation of the RR-motif within the signal peptide (Figure 5(a)), which is known to be of particular importance for Tat-dependent protein transport in bacteria and chloroplasts.<sup>4,30</sup> Finally, the protease-protected fragment indicative for Ti-1 is found even after incubation of the 16/23 chimera with lipid vesicles composed of chemically pure phospholipids (Figure 5(b)), which is in line also with the liposome association of the thylakoidal Tat substrate OE17,<sup>31</sup> and definitely rules out the possibility that proteinaceous components of the thylakoid membrane are required for membrane insertion.

#### “Spontaneous” membrane insertion of Tat substrates?

Membrane insertion of the 16/23 chimera is strongly reminiscent of the processes leading to the transient loop topology of “spontaneously” inserting proteins like CFo-II or PsbW, which are capable of integrating into lipid bilayers independent of proteinaceous transport machinery.<sup>32–34</sup> Like the substrates of the  $\Delta$ pH/Tat pathway, these proteins carry typical N-terminal signal peptides, though not of the Tat type, and might therefore use a similar mechanism of insertion, although it should be noted that in these instances only small, negatively charged hydrophilic segments are actually translocated across the membrane. Originally, this mechanism of unassisted membrane insertion *via* transient transmembrane loop structures was discovered for the procoat protein of filamentous phage M13.<sup>35</sup> Although it was shown recently that complete transport of M13 procoat depends on the function of YidC, an integral protein of the bacterial cytoplasmic membrane,<sup>36</sup> partitioning of procoat into the membrane leading to transmembrane loop topology does not require YidC function.<sup>37</sup> Furthermore, the thylakoidal YidC homolog, Alb3, is not essential for membrane insertion of proteins like CFo-II<sup>38</sup> nor for Tat-dependent protein transport (data not shown),<sup>39</sup> and it is therefore unlikely that it plays a role in Ti-1 formation upon transport of the 16/23 chimera.

#### Direct membrane insertion; an obligatory step during Tat transport?

Unassisted membrane insertion is not an artificial property of the 16/23 chimera. Instead, it is observed also with authentic  $\Delta$ pH/TAT substrates, like the precursor of the 23 kDa subunit of the oxygen-evolving system. In this case, however, it can usually be detected only if the activity of Tat translocase is impaired, e.g. by

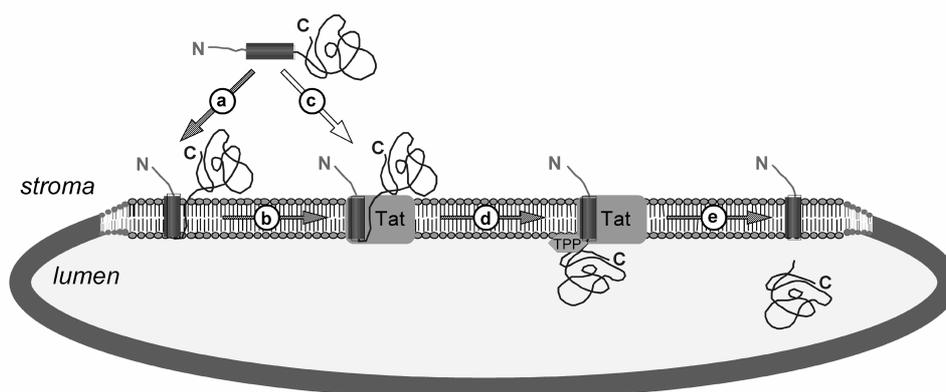
pretreatment of the thylakoids with chaotropic salts, alkaline pH, or protease (Figure 6 and data not shown), since transport is generally too rapid to allow accumulation of translocation intermediates. Remarkably, membrane insertion independent of Tat translocase was described recently for a bacterial Tat substrate, notably the high potential iron-sulfur protein (HiPIP) from *Allochrocatium vinosum*, when expressed in Tat deletion mutants of *Escherichia coli*.<sup>40</sup> However, the topology of the inserted protein was not determined in this case.

Translocase-independent formation of transport intermediates from authentic Tat substrates suggests that membrane insertion might be an obligatory step during Tat-dependent protein transport. Indeed, there are arguments in favor of this assumption. First, several amino acid residues of TatA, TatB, and TatC that were shown to be critical for membrane transport and thus might be involved in the interaction with the substrate protein are located either in the transmembrane domains or in the luminal loops of the Tat subunits.<sup>25,41,42</sup> Second, this scenario would explain why the distance between the RR-motif and the hydrophobic segment in the signal peptide is apparently so strictly conserved. Insertion of the substrate protein into the membrane might help to position the RR-motif at a certain distance to the lipid phase and, consequently, to the presumed RR-recognition site of the Tat translocase. It is conceivable that deviation from this pre-adjusted distance reduces the efficiency of receptor recognition and thus membrane transport.

However, if unassisted membrane insertion is an obligatory step during Tat transport, all Tat passenger proteins must have N-terminal regions that transiently can form membrane segments. Although many Tat substrates show accumulation of hydrophobic residues in their N-terminal regions, some are strictly hydrophilic (data not shown). Moreover, Tat transport takes place also with chimeric polypeptides consisting of Tat-specific signal peptides fused to either Sec-type passenger proteins (e.g. plastocyanin or the 33 kDa subunit of the oxygen-evolving complex),<sup>43</sup> or even heterologous reporter proteins like green fluorescent protein (GFP),<sup>13,14</sup> which cannot be assumed to all be hydrophobic at their N termini. On the other hand, not all passenger proteins are suitable to the same extent to serve as Tat substrates,<sup>44</sup> and it will be interesting to examine if this suitability for Tat-dependent transport is related to the degree of N-terminal hydrophobicity.

#### Working model for the initiation of $\Delta$ pH/Tat-dependent protein transport

Considering these results, we propose the following scenario for the early steps of  $\Delta$ pH/Tat-dependent protein transport across the thylakoid membrane, which, in fact, probably holds true also for Tat transport across the cytoplasmic membrane



**Figure 7.** Current working model of the early steps during  $\Delta$ pH/Tat-dependent protein transport (see the text for details).

of bacteria (Figure 7). The initial step (a) is the direct insertion of the  $\Delta$ pH/Tat-dependent precursor protein into the lipid bilayer leading to the membrane-embedded conformation of Ti-1 in which both the N terminus and the C terminus are located on the *cis*-side of the membrane. Membrane insertion is probably still reversible at this stage, and presumably driven by membrane-induced conformational changes.<sup>45</sup> (b) Lateral movement within the lipid bilayer of the membrane-inserted translocation intermediate to the TatB/C receptor complex, which probably corresponds to the 560 kDa to 700 kDa complexes described in the literature.<sup>3</sup> Interaction with the TatB/C complex presumably involves residues also in the membrane-located and lumen-located domains of TatB and TatC. (c) Precursor proteins that cannot insert into the membrane in an unassisted manner, e.g. due to inability to form a membrane span transiently, might instead initiate transport by the interaction with stroma-exposed proteinaceous receptor domains of Tat translocase. In this case, Ti-1 is achieved only in close contact with the translocase complex. (d) Irrespective of how the initial membrane insertion took place, the C-terminal domain of the Tat substrate is subsequently translocated across the membrane. This translocation step leads to the bitopic topology corresponding to Ti-2 and is probably facilitated by transient action of TatA.<sup>20</sup> (e) Finally, the Tat substrate is processed by the thylakoidal processing peptidase and the mature protein is released into the thylakoid lumen.

In the proposed model, folding of the passenger protein, except for the temporary N-terminal membrane anchor, could take place during each step of the transport process, i.e. in the stroma prior to membrane targeting and after membrane insertion, while the C-terminal domain of the passenger protein is still exposed on the stromal side of the membrane. In fact, the close vicinity of the passenger domain to the membrane after insertion might support the folding process in some cases. Even a chaperone-like function of the TatB/C

receptor complex appears possible in this scenario, although it should be noted that there is no evidence supporting this assumption.

## Materials and Methods

### Isolation of chloroplasts and thylakoids

Intact chloroplasts were isolated from pea seedlings (*Pisum sativum* var. Feltham First) grown for eight to ten days under a 16 h photoperiod essentially as described.<sup>46</sup> For the preparation of thylakoid vesicles, chloroplasts were lysed by osmotic shock for 10 min on ice at 0.75 mg chlorophyll/ml in HM buffer (10 mM Hepes (pH 8.0), 5 mM  $MgCl_2$ ). Thylakoids were collected by centrifugation for 5 min at 20,000g, washed twice in HM buffer, and finally resuspended at 0.75 mg chlorophyll/ml in either HM buffer or HMS buffer (10 mM Hepes-KOH (pH 8.0), 5 mM  $MgCl_2$ , 0.1 M sucrose), depending on the subsequent experiment.

### Site-directed mutagenesis

Mutagenesis of the RR-motif within the signal peptide of the 16/23 chimera to KK was carried out with the Stratagene QuikChange<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit and confirmed by DNA sequencing. Primer sequences: 5'gctgaggctgagactagcaagaagctatgtgggcttcgctgc3' and 5'gccacgaagccaacatagcttcttgctagtctcagcctcagc3' (mutated sites are underlined).

### Preparation of liposomes

The preparation of unilamellar liposomes was performed as described.<sup>47</sup> Phosphatidylcholine dissolved in chloroform was evaporated under a stream of nitrogen and subsequently dried under reduced pressure for at least 1 h. The dried lipids were dissolved in ethanol and injected slowly using a Hamilton syringe into HM buffer under continuous bubbling with nitrogen. The final concentration of ethanol did not exceed 2% (v/v) and the total lipid concentration was 1 mM.

### Protein transport experiments

Protein transport experiments with radiolabelled precursor proteins were as described.<sup>13</sup> In the liposome

insertion experiments, 200  $\mu$ l of liposome suspension was mixed with 5  $\mu$ l of *in vitro* translation assay and then treated like thylakoid transport experiments, except that the liposomes were pelleted for 30 min at 50,000g.

### Miscellaneous

Gel electrophoresis of proteins under denaturing conditions was carried out according to Laemmli.<sup>48</sup> The gels were exposed to phosphorimager screens and analysed with Fujifilm FLA-3000 (Fujifilm, Düsseldorf, Germany) using the software packages BASReader (version 3.14) and AIDA (version 3.25; Raytest, Straubenhardt, Germany). Polypeptide extraction as well as protease treatment of thylakoids resuspended in HMS buffer was performed as described.<sup>49</sup> Western blot analysis was carried out as described.<sup>50</sup> All of the other methods followed published protocols.<sup>51</sup>

### Acknowledgements

We thank Astrid Vieler and Professor Christian Wilhelm (Institute of Botany, University Leipzig) for advice with the preparation of liposomes. This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Sonderforschungsbereich 363) and the state Sachsen-Anhalt (Exzellenzcluster Biowissenschaften).

### References

- Mori, H. & Cline, K. (2001). Post-translational protein translocation into thylakoids by the Sec and  $\Delta$ pH-dependent pathways. *Biochim. Biophys. Acta*, **1541**, 80–90.
- Robinson, C. & Bolhuis, A. (2004). Tat-dependent protein targeting in prokaryotes and chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, **1694**, 135–147.
- Müller, M. & Klösgen, R. B. (2005). The Tat pathway in bacteria and chloroplasts. *Mol. Membr. Biol.* **22**, 113–121.
- Chaddock, A. M., Mant, A., Karnauchov, 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**, 2715–2722.
- Mould, R. M., Shackleton, J. B. & Robinson, C. (1991). Transport of proteins into chloroplasts. Requirements for the efficient import of two luminal oxygen-evolving complex proteins into isolated thylakoids. *J. Biol. Chem.* **266**, 17286–17289.
- 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**, 2688–2696.
- Klösgen, R. B., Brock, I. A., 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**, 1031–1034.
- Alder, N. N. & Theg, S. M. (2003). Energetics of protein transport across biological membranes. A study of the thylakoid  $\Delta$ pH-dependent/cpTat pathway. *Cell*, **112**, 231–242.
- 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**, 807–815.
- 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**, 153–154.
- Clark, S. A. & Theg, S. M. (1997). A folded protein can be transported across the chloroplast envelope and thylakoid membranes. *Mol. Biol. Cell*, **8**, 923–934.
- Hynds, P. J., Robinson, D. & Robinson, C. (1998). The sec-independent twin-arginine translocation system can transport both tightly folded and malformed proteins across the thylakoid membrane. *J. Biol. Chem.* **273**, 34868–34874.
- Marques, J. P., Dudeck, I. & Klösgen, R. B. (2003). Targeting of EGFP chimeras within chloroplasts. *Mol. Genet. Genomics.* **269**, 381–387.
- Marques, J. P., Schattat, M. H., Hause, G., Dudeck, I. & Klösgen, R. B. (2004). *In vivo* transport of folded EGFP by the  $\Delta$ pH/TAT-dependent pathway in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *J. Expt. Bot.* **55**, 1697–1706.
- 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**, 1467–1470.
- 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**, 267–276.
- Motohashi, R., Nagata, N., Ito, T., Takahashi, S., Hobo, T., Yoshida, S. & Shinozaki, K. (2001). An essential role of a TatC homologue of a Delta pH-dependent protein transporter in thylakoid membrane formation during chloroplast development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 10499–10504.
- Berghöfer, J. & Klösgen, R. B. (1999). Two distinct translocation intermediates can be distinguished during protein transport by the TAT ( $\Delta$ pH)-pathway across the thylakoid membrane. *FEBS Letters*, **460**, 328–332.
- 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**, 719–729.
- 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**, 205–210.
- Berks, B. C., Palmer, T. & Sargent, F. (2005). Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 174–181.
- Berks, B. C. (1996). A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol. Microbiol.* **22**, 393–404.
- Palmer, T. & Berks, B. C. (2003). Moving folded proteins across the bacterial cell membrane. *Microbiology*, **149**, 547–556.
- Fincher, V., McCaffery, M. & Cline, K. (1998). Evidence for a loop mechanism of protein transport by the thylakoid Delta pH pathway. *FEBS Letters*, **423**, 66–70.
- Alami, M., Luke, I., Deitermann, S., Eisner, G., Koch, H. G., Brunner, J. & Müller, M. (2003). Differential

- interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in *Escherichia coli*. *Mol. Cell*, **12**, 937–946.
26. 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**, 45–56.
  27. Ifuku, K., Nakatsu, T., Kato, H. & Sato, F. (2004). Crystal structure of the PsbP protein of photosystem II from *Nicotiana tabacum*. *EMBO Rep.* **5**, 362–367.
  28. Roise, D., Theiler, F., Horvath, S. J., Tomich, J. M., Richards, J. H., Allison, D. S. & Schatz, G. (1988). Amphiphilicity is essential for mitochondrial presequence function. *EMBO J.* **7**, 649–653.
  29. Pugsley, A. P. (1993). The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**, 50–108.
  30. Stanley, N. R., Palmer, T. & Berks, B. C. (2000). The twin arginine consensus motif of Tat signal peptides is involved in Sec-independent protein targeting in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**, 11591–11596.
  31. Musser, S. M. & Theg, S. M. (2000). Characterization of the early steps of OE17 precursor transport by the thylakoid  $\Delta$ pH/Tat machinery. *Eur. J. Biochem.* **267**, 2588–2598.
  32. 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**, 1310–1317.
  33. Robinson, D., Karnachov, I., Herrmann, R. G., Klösgen, R. B. & Robinson, C. (1996). Protease-sensitive thylakoidal import machinery for the Sec- $\Delta$ pH- and signal recognition particle-dependent protein targeting pathways, but not for CFo-II integration. *Plant J.* **10**, 149–155.
  34. Kim, S. J., Robinson, C. & Mant, A. (1998). Sec/SRP-independent insertion of two thylakoid membrane proteins bearing cleavable signal peptides. *FEBS Letters*, **424**, 105–108.
  35. Kuhn, A., Kreil, G. & Wickner, W. (1986). Both hydrophobic domains of M13 procoat are required to initiate membrane insertion. *EMBO J.* **5**, 3681–3685.
  36. Samuelson, J. C., Chen, M., Jiang, F., Möller, I., Wiedmann, M., Kuhn, A. *et al.* (2000). YidC mediates membrane protein insertion in bacteria. *Nature*, **406**, 637–641.
  37. Samuelson, J. C., Jiang, F., Yi, L., Chen, M., de Gier, J. W., Kuhn, A. & Dalbey, R. E. (2001). Function of YidC for the insertion of M13 procoat protein in *Escherichia coli*: translocation of mutants that show differences in their membrane potential dependence and Sec requirement. *J. Biol. Chem.* **276**, 34847–34852.
  38. Woolhead, C. A., Thompson, S. J., Moore, M., Tissier, C., Mant, A., Rodger, A. *et al.* (2001). Distinct Albino3-dependent and -independent pathways for thylakoid membrane protein insertion. *J. Biol. Chem.* **276**, 40841–40846.
  39. 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**, 1529–1532.
  40. Brüser, T., Yano, T., Brune, D. C. & Daldal, F. (2003). Membrane targeting of a folded and cofactor-containing protein. *Eur. J. Biochem.* **270**, 1211–1221.
  41. Buchanan, G., De Leeuw, E., Stanley, N. R., Wexler, M., Berks, B. C., Sargent, F. & Palmer, T. (2002). Functional complexity of the twin-arginine translocase TatC component revealed by site-directed mutagenesis. *Mol. Microbiol.* **43**, 1457–1470.
  42. Barrett, C. M. L. & Robinson, C. (2005). Evidence for interactions between domains of TatA and TatB from mutagenesis of the TatABC subunits of the twin-arginine translocase. *FEBS J.* **272**, 2261–2275.
  43. Robinson, C., Cai, D., Hulford, A., Brock, I. A., Michl, D., Hazell, L. *et al.* (1994). The presequence of a chimeric construct dictates which of two mechanisms are utilised for translocation across the thylakoid membrane: evidence for the existence of two distinct translocation systems. *EMBO J.* **13**, 279–285.
  44. Stanley, N. R., Sargent, F., Buchanan, G., Shi, J., Stewart, V., Palmer, T. & Berks, B. C. (2002). Behaviour of topological marker proteins targeted to the Tat protein transport pathway. *Mol. Microbiol.* **43**, 1005–1021.
  45. Seelig, J. (2004). Thermodynamics of lipid-peptide interactions. *Biochim. Biophys. Acta*, **1666**, 40–50.
  46. Brock, I. W., Hazell, L., Michl, D., Nielsen, V. S., Möller, B. L., Herrmann, R. G. *et al.* (1993). Precursors of one integral and five luminal thylakoid proteins are imported by isolated pea and barley thylakoids: optimisation of *in vitro* assays. *Plant Mol. Biol.* **23**, 717–725.
  47. Latowski, D., Kostecka, A. & Strzalka, K. (2000). Effect of monogalactosyldiacylglycerol and other thylakoid lipids on violaxanthin de-epoxidation in liposomes. *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 810–812.
  48. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.
  49. Karnachov, I., Herrmann, R. G. & Klösgen, R. B. (1997). Transmembrane topology of the Rieske Fe/S protein of the cytochrome  $b_6/f$  complex from spinach chloroplasts. *FEBS Letters*, **408**, 206–210.
  50. Vachereau, A. (1989). Luminescent immunodetection of western-blotted proteins from coomassie-stained polyacrylamide gel. *Anal. Biochem.* **179**, 206–208.
  51. Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Edited by G. von Heijne

(Received 4 October 2005; received in revised form 4 November 2005; accepted 7 November 2005)

Available online 28 November 2005

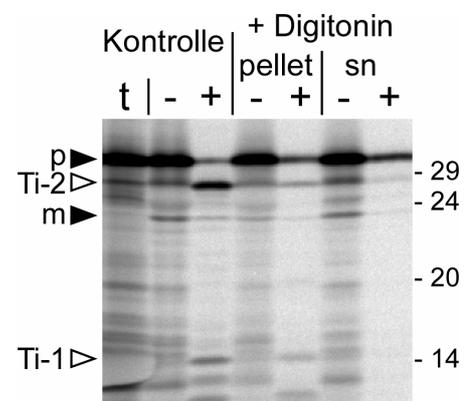
## 2.2.3 Ergänzende Ergebnisse

### 2.2.3.1 Die Proteasestabilität der Translokationsintermediate wird nicht unspezifisch durch hydrophobe Agenzien induziert oder stabilisiert

Die Hypothese der spontanen Membraninsertion des 16/23-Proteins stützt sich auf die Annahme, dass das Vorläuferprotein partiell in eine angebotene Membran inseriert und somit ein bestimmter Teil des Proteins vor Degradation durch Proteasen geschützt ist. Dass es sich bei den Degradationsprodukten nicht *per se* um proteaseresistente Domänen des 16/23-Proteins handelt, wurde bereits gezeigt (Hou *et al.*, 2006). Nicht auszuschließen ist allerdings die Möglichkeit, dass das Protein in Gegenwart hydrophober Agenzien unspezifisch proteaseresistente Strukturen ausbildet. Sollten die Strukturen aber spezifisch für eine Membraninteraktion sein, so dürften die für Ti-1 und Ti-2 spezifischen Degradationsprodukte nach Solubilisierung der Membran durch Detergentien nicht mehr proteaseresistent sein. Um dies zu testen, wurde radioaktiv markiertes 16/23-Protein zu isolierten Thylakoiden gegeben, unter Standardbedingungen inkubiert und mehrfach gewaschen, um nicht gebundenes Vorläuferprotein zu entfernen (analog zu den Ansätzen in (Hou *et al.*, 2006)). So konnte sich sowohl Ti-1 als auch Ti-2 bilden und anschließend wurde der Ansatz in zwei Hälften geteilt, wobei eine Hälfte als Kontrollansatz diente. Die zweite Hälfte wurde mit einem milden Detergens versetzt, um die Thylakoidvesikel zu solubilisieren. Anschließend wurden nicht solubilisierete Thylakoide durch Zentrifugation vom Überstand abgetrennt. Schließlich wurden alle Fraktionen (Kontrolle, Pellet und Überstand) wiederum in zwei Hälften geteilt von denen jeweils eine unbehandelt blieb und die andere mit einer Protease versetzt wurde. Stöchiometrische Mengen aller Proben wurden mittels SDS-PAGE getrennt und die radioaktiven Signale mittels Phosphorimaging detektiert (Abb. 9).

#### Abb. 9: Keine Stabilisierung der Strukturen von Translokationsintermediaten durch ein Detergens.

Isolierte Thylakoide wurden mit radioaktiv markiertem 16/23-Protein für 15 min bei 25 °C im belichteten Wasserbad inkubiert, zweimal mit Puffer gewaschen und anschließend in zwei Fraktionen aufgeteilt, wovon eine unbehandelt blieb (*Kontrolle*) und die andere mit dem Detergens Digitonin (finale Konzentration: 1,7 %) versetzt und 30 min bei 4 °C rotierend inkubiert wurde (+*Digitonin*). Nicht solubilisierete Thylakoide (*pellet*) wurden durch Zentrifugation (40.000 x g für 1 h) vom Überstand (*sn*) abgetrennt. Alle Fraktionen wurden in zwei Hälften geteilt, wovon ein Teil unbehandelt blieb (-) und der Andere mit Thermolysin (finale Konzentration: 200 µg/ml) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert wurde (+). Stöchiometrische Mengen entsprechend 15 µg Chlorophyll wurden auf einem 10-17,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt und die radioaktiven Signale durch einen Phosphorimager sichtbar gemacht, wobei die Summe der Mengen der Fraktionen *pellet* und *sn* den Mengen der Kontrollreaktion entsprechen. Für weitere Details siehe Abb. 8.



Wenn man die Signale der Fraktionen betrachtet, die nicht mit Protease behandelt wurden, ist anhand der Signale des Vorläuferproteins wie auch des reifen Proteins zu erkennen, dass ausreichende Mengen der Thylakoide durch das zugegebene Detergens solubilisiert wurden. Das verhältnismäßig starke Signal des reifen Proteins im Überstand ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass ein großer Teil der nicht solubilisierten Thylakoide dennoch durch das Detergens geöffnet wurde und somit die löslichen Komponenten des Lumens im Überstand zu finden sind. Nach Proteasebehandlung der Fraktionen sind die Translokationsintermediate in der Kontrollreaktion wie auch in den nicht solubilisierten Thylakoiden zu detektieren. Die entsprechenden Signale sind im Überstand der Solubilisierung dagegen kaum zu beobachten. Dies spricht dafür, dass die Strukturen der proteaseresistenten Degradationsprodukte von Ti-1 und Ti-2 nicht unspezifisch durch die Hydrophobizität des Detergens erzeugt bzw. aufrecht erhalten werden können.

Weiterhin fällt auf, dass das Vorläuferprotein in den detergensbehandelten Fraktionen nicht vollständig abgebaut wurde. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Effizienz der Protease durch das milde Detergens leicht gestört wird. Interessant ist auch, dass sich die Intensitäten von Ti-1 bzw. Ti-2 der Kontrollreaktion verglichen mit der Pelletfraktion der Solubilisierung deutlich unterscheiden. Insgesamt sind die Intensitäten der Solubilisierung natürlich schwächer, da nur die Summe von Pellet und Überstand der Solubilisierung die Menge der Kontrolle ergeben hätten. Dennoch ist im Pellet die Intensität von Ti-2 im Vergleich zu Ti-1 sehr schwach. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Thylakoide im Pellet dennoch wie bereits oben erwähnt durch das Detergens geöffnet wurden und somit die Protease Zugang zum reifen Teil von Ti-2 hatte und dessen Intensität daher stark abnimmt. Im Umkehrschluss wäre dann Ti-1 nicht von der luminalen Seite der Membran aus in gleichem Maße durch die Protease angreifbar, da ansonsten das Verhältnis von Ti-1 zu Ti-2 wie in der Kontrollreaktion zu erwarten wäre. Dies ist allerdings lediglich ein Hinweis, der genauer untersucht werden müsste.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde auch versucht diese Fragestellung, ob Ti-1 die Thylakoidmembran vollständig durchspannt und von der luminalen Seite der Membran für Proteasen zugänglich ist, zu beantworten. Dazu wurde einerseits versucht die luminalen Seite der Thylakoidmembran nach Inkubation mit dem 16/23-Protein durch Ultraschallbehandlung der Thylakoide für Proteasen zugänglich zu machen. Andererseits wurden artifizielle Membransysteme (Liposomen) verwendet (Hou *et al.*, 2006). Hier wurde versucht das Lumen dieser Vesikel bei der Präparation mit Protease zu beladen und anschließend das 16/23-Protein zuzugeben. Es ließen sich aber mit beiden Ansätzen keine eindeutigen Resultate

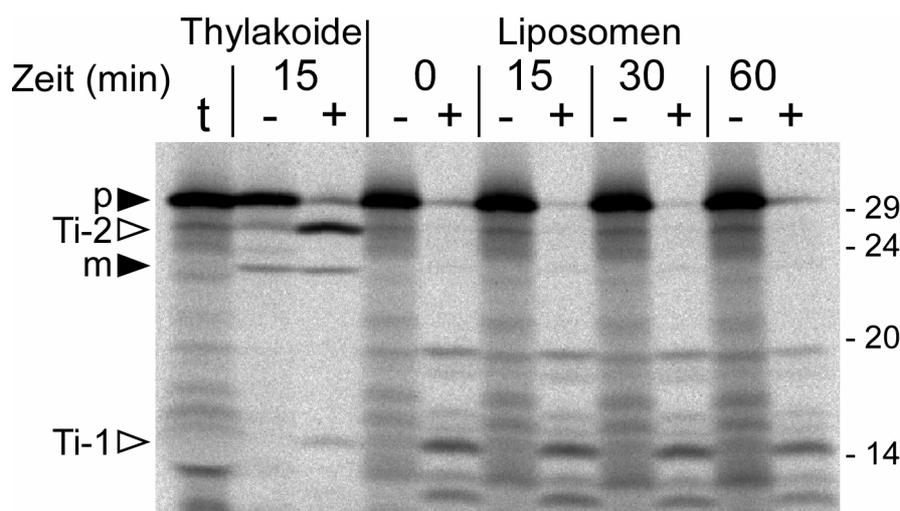
erzielen (Daten nicht gezeigt), eine Aussage, ob Ti-1 die Membran vollständig durchspannt, kann daher an dieser Stelle nicht getroffen werden.

Ein weiterer ungeklärter Punkt ist, welcher Bereich des Proteins auf der Stufe des Ti-1 in die Membran inseriert. Da der hydrophobe Teil des Signalpeptids des 16/23-Proteins die größte Hydrophobizität des Proteins besitzt, wurde bislang davon ausgegangen, dass dieser Bereich einen Teil des für Ti-1 spezifischen Degradationsprodukts ausmacht. Anhand des Molekulargewichts dieses Degradationsprodukts von ca. 14 kDa und unter Einbeziehung der möglichen Spaltstellen der Protease Thermolysin innerhalb des 16/23-Proteins wurde ein mögliches Fragment vorhergesagt, welches höchstwahrscheinlich dem spezifischen Degradationsprodukt von Ti-1 entspricht (Hou *et al.*, 2006). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Ansätze durchgeführt, die dazu dienten die Identität bzw. die Sequenz des für Ti-1 spezifischen Degradationsprodukts experimentell zu bestimmen (Daten nicht gezeigt). Diese Bestimmung wäre durch massenspektrometrische Analysen oder N-terminale Sequenzierung möglich, wofür aber große Mengen des zu bestimmenden Proteinfragments nötig sind. Da solche Mengen nicht durch die bisher verwendete *in vitro* Translation zu erreichen sind, wurde das 16/23-Protein mit einem C-terminalen His-Tag in *E. coli* heterolog überexprimiert. Da das Protein in *inclusion bodies* akkumulierte, wurde nach Präparation der Aggregate und deren Solubilisierung das Protein durch pH- und Verdünnungssprung rückgefaltet. Anschließend erfolgte eine Reinigung des Proteins über eine Nickel-Affinitätschromatographie. Nach diesem Schritt tendiert das Protein allerdings aufgrund des hydrophoben Signalpeptids stark zur Aggregation in wässrigen Puffern. Durch entsprechende Testreihen konnte bestimmt werden, dass das Protein in PBS-Puffer (Sambrook & Russell, 2000) welcher zusätzlich 500 mM NaCl enthält einige Tage stabil bleibt und nicht aggregiert. Derart präpariertes 16/23-Protein wurde mit Liposomen inkubiert (Hou *et al.*, 2006), damit sich Ti-1 ausbilden kann und anschließend mit Protease versetzt, um das zu analysierende Degradationsprodukt zu generieren. Bei der anschließenden Analyse dieser Ansätze traten allerdings nicht zu beherrschende Probleme auf. Maßgeblich ist hier zu nennen, dass um ausreichende Mengen des Degradationsprodukts zu erhalten auch hohe Konzentrationen an Liposomen eingesetzt werden müssen. Große Lipidmengen stören aber die Gelelektrophorese (Wessel & Flügge, 1984) insbesondere im niedermolekularen Bereich. Beim Versuch die Lipide durch eine entsprechend spezielle Fällung der Proteine zu entfernen (Wessel & Flügge, 1984) ging allerdings auch ein großer Teil des Proteins verloren. Das zweite maßgebliche Problem der Analyse bestand darin, dass die Protease Thermolysin dazu neigt auch Thermolysin-Moleküle selbst zu spalten. Dies führt dazu, dass im Reaktionsansatz

Degradationsprodukte verschiedener Molekulargewichtsbereiche zu finden sind die vom Thermolysin selbst stammen. Daher war die Detektion des für Ti-1 spezifischen Degradationsprodukts nicht eindeutig möglich, weshalb auch die anschließende Massenspektrometrische Analyse dieses Proteinfragments nicht möglich war. Allerdings konnte durch einen anderen Ansatz der innerhalb der Arbeitsgruppe durchgeführt wurde bestätigt werden, dass die bisherige Vorhersage des membrangeschützten Bereichs von Ti-1 im Wesentlichen richtig ist (persönliche Mitteilung, René Schlesier). Lediglich die exakten Spaltstellen von Thermolysin an N- und C-Terminus des Degradationsprodukts wurden nicht korrekt vorhergesagt.

### 2.2.3.2 Die Membraninsertion des 16/23-Proteins erfolgt zeitunabhängig

Es wurde oben bereits beschrieben, dass künstliche proteinfreie Membranen ausreichende Bedingungen für das 16/23-Protein darstellen, um Ti-1 auszubilden (Hou *et al.*, 2006). Im Thylakoidsystem kann die Ti-1 Bande schon direkt nach Zugabe des 16/23-Proteins zu den Thylakoiden auf Eis ohne weitere Inkubation bei 25 °C detektiert werden. Um zu untersuchen, ob die Entstehung von Ti-1 mit Liposomen eventuell langsamer verläuft, wurde eine entsprechende Zeitreihe durchgeführt. Dazu wurden Liposomen mit 16/23-Protein versetzt und für 0, 15, 30 und 60 min bei 25 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Ansatz mit Thylakoiden mitgeführt (Abb. 10).



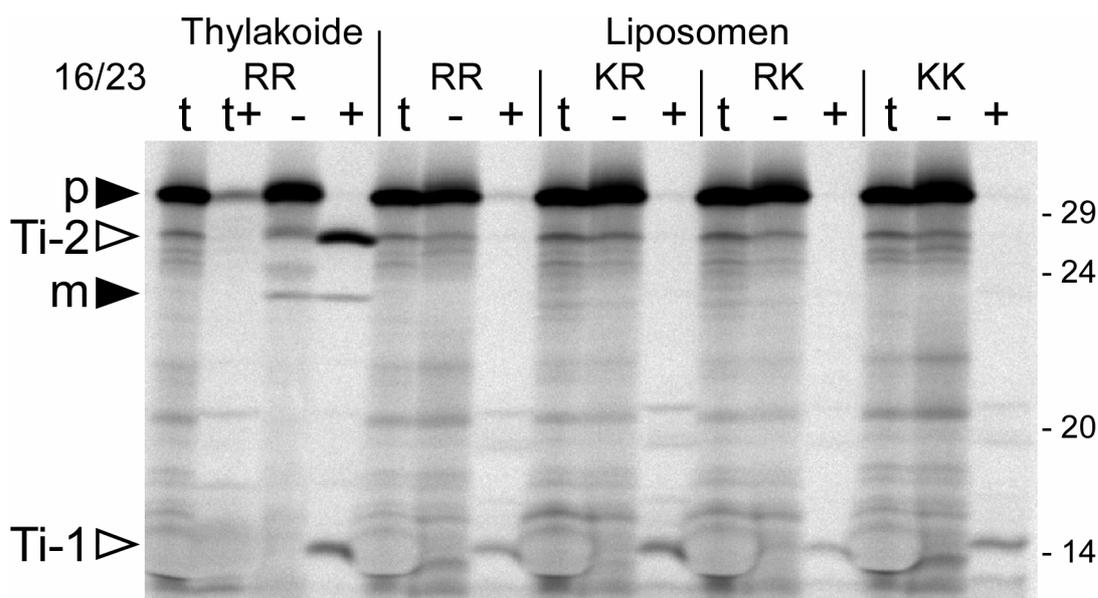
**Abb. 10: Die Bildung von Ti-1 ist zeitunabhängig.**

Liposomen (1 mM Phosphatidylcholin) wurden durch Extrusion (Extruder Liposofast Basic, Avestin, 100 nm Polycarbonat-Membran) in HM-Puffer hergestellt. Die Thylakoide sowie Liposomen wurden über die angegebenen Zeitspannen bei 25 °C im belichteten Wasserbad inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden wie zuvor beschrieben ausgeführt (Hou *et al.*, 2006). Für weitere Details siehe Legende zu Abb. 8.

Anhand der proteaseunbehandelten Fraktionen ist zu erkennen, dass zu allen Zeitpunkten vergleichbare Mengen des Vorläuferproteins mit den Liposomen sedimentiert wurden. Dementsprechend ist auch nach Proteasebehandlung in allen Fraktionen das für Ti-1 spezifische Degradationsprodukt zu detektieren, wobei dessen Menge lediglich nach 60 min leicht abnimmt. Das Experiment zeigt, dass auch bei der Verwendung von Liposomen die Bildung von Ti-1 sehr schnell sowie auch auf Eis vonstatten geht. Zusätzlich ist Ti-1 auch über einen längeren Zeitraum von mindestens einer Stunde stabil.

### 2.2.3.3 Die Membraninsertion des 16/23-Proteins erfolgt unabhängig vom RR-Motiv

Es wurde bereits getestet, ob das Zwillingsarginin-Motiv des 16/23-Proteins die Bildung von Ti-1 in Thylakoiden beeinflusst (Frielingsdorf, 2003; Hou *et al.*, 2006). Dabei wurde festgestellt, dass eine Mutation des RR-Motivs zu zwei Lysinen (KK) die Assoziation an die Membran nicht verändert, die Akkumulation von Ti-1 aber vermindert ist. Dies ist vermutlich auf Degradationsprozesse durch Proteasen innerhalb der Thylakoidmembran zurückzuführen (Daten nicht gezeigt). Um das Problem einer unspezifischen Degradation des Vorläuferproteins durch Proteasen der Thylakoidmembran zu umgehen, wurden Liposomen eingesetzt (Abb. 11). Außerdem wurden neben der bereits bekannten Mutation (KK) auch die Varianten KR und RK des 16/23-Proteins verwendet bei denen jeweils nur ein Arginin des RR-Motivs zu Lysin ausgetauscht wurde.



**Abb. 11: Die Bildung von Ti-1 ist unabhängig vom Zwillingsarginin-Motiv.**

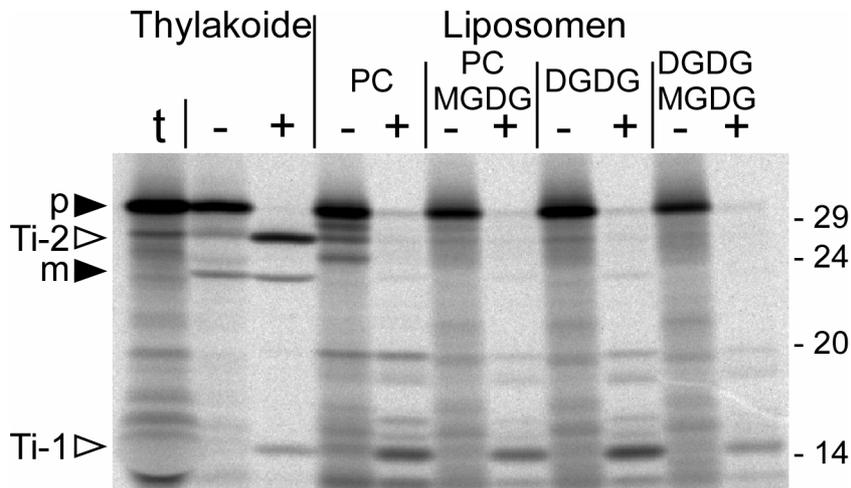
RR, KR, RK und KK bezeichnet die verschiedenen Varianten des 16/23-Proteins. Für weitere Details siehe Legenden zu Abb. 8 und 10.

Vergleicht man die einzelnen Varianten des 16/23-Proteins miteinander, so fällt auf, dass jeweils große Mengen an Vorläuferprotein in den proteaseunbehandelten Fraktionen zusammen mit den Liposomen sedimentieren. Nach Proteasebehandlung ist in allen Fällen das für Ti-1 spezifische Degradationsprodukt zu detektieren. Dessen Mengen weichen zwar voneinander ab, was aber vermutlich auf die unterschiedliche Effizienz der Translation der einzelnen Varianten des 16/23-Proteins und evtl. auch auf Abweichungen beim Waschen der Liposomen zurückzuführen ist. Außerdem lässt sich von den unterschiedlichen Intensitäten von Ti-1 keine eindeutig logische Tendenz ableiten welches der beiden Arginine des Zwillingsarginin-Motivs wichtiger für die Membraninsertion sein könnte. Dementsprechend ist die Bildung von Ti-1 in Gegenwart von proteinfreien Membranen unabhängig vom Zwillingsarginin-Motiv möglich.

#### 2.2.3.4 Die Membraninsertion des 16/23-Proteins erfolgt unabhängig von den Lipiden der Membran

Bislang wurde für die Herstellung der proteinfreien Modellmembranen das Lipid Phosphatidylcholin (PC) aus Hühnerei verwendet. Dieses Lipid ist bei der Herstellung von künstlichen Membransystemen weit verbreitet und die damit hergestellten Liposomen sind gut charakterisiert (Sessa & Weissmann, 1968), weshalb es auch in dieser Arbeit zum Einsatz kam. Phosphatidylcholin ist aber in der Thylakoidmembran nur zu einem sehr geringen Anteil vorhanden. Stattdessen werden hauptsächlich zwei Lipide gefunden, die Galaktoseeinheiten als Kopfgruppe tragen. Die Thylakoidmembranen von 10 Tage alten Erbsenkeimlingen enthalten 50,7 % Monogalactosyldiacylglycerin (MGDG), 32,6 % Digalactosyldiacylglycerin (DGDG), 8,6 % Sulfoquinovosyldiacylglycerin (SQDG), 5,4 % Phosphatidylglycerin (PG), 1,7 % Phosphatidylcholin (PC) und <0,5 % Phosphatidylinositol (PI) (Angaben in mol%) (Andersson *et al.*, 2001). Um auszuschließen, dass die spontane Insertion des 16/23-Proteins in künstliche Membransysteme durch das bislang verwendete Standardlipid PC begünstigt ist, wurde im folgenden Experiment der Einfluss von Lipiden der Thylakoidmembran auf das Insertionsverhalten des 16/23-Proteins getestet. Da aber MGDG eine sehr kleine Kopfgruppe und somit eine konische Molekülgeometrie besitzt, neigt es dazu sogenannte hexagonale Strukturen anstatt einer Doppellipidschicht auszubilden (Webb & Green, 1991; Bruce, 1998). Daher ist es nicht möglich Liposomen herzustellen deren Lipidzusammensetzung der in Thylakoiden gefundenen Zusammensetzung entspricht (Musser & Theg, 2000). Es ist aber möglich MGDG bis zu einem Anteil von 30 mol% des Gesamtlipids einzusetzen (Latowski *et al.*, 2002). Um zumindest im technisch möglichen Rahmen den Einfluss der zwei

meistvertretenen Lipide der Thylakoidmembran (MGDG und DGDG) zu testen, wurden Liposomen aus 100 % PC bzw. DGDG hergestellt sowie Liposomen aus PC bzw. DGDG, die zu 30 mol% MGDG enthielten. Die verschiedenen Liposomen wurden wie bei den vorangegangenen Experimenten mit dem 16/23-Protein versetzt und analog analysiert (Abb. 12).



**Abb. 12: Die Bildung von Ti-1 ist unabhängig von den Lipiden der angebotenen Membran.**

Liposomen (1 mM Gesamtlipid) wurden aus Phosphatidylcholin (PC), Digalactosyldiacylglycerin (DGDG) sowie Mischungen dieser Lipide mit 30 mol% Monogalactosyldiacylglycerin (MGDG) hergestellt. Für weitere Details siehe Legend zu Abb. 8 und 10.

Das Experiment zeigt, dass das 16/23-Protein mit vergleichbarer Effizienz an Liposomen bindet, die zu 100 % aus PC bzw. DGDG hergestellt wurden. Dies zeigt sich einerseits daran, dass sich das Vorläuferprotein zusammen mit den Liposomen sedimentieren lässt (proteaseunbehandelte Fraktionen). Andererseits ist auch nach Proteasebehandlung in beiden Fällen das für Ti-1 spezifische Degradationsprodukt zu detektieren. Ein ähnliches Bild ergibt sich, wenn die Liposomen mit MGDG ergänzt wurden. Allerdings sinkt die Effizienz der Insertion ab, was an der verringerten Signalintensität des gebundenen Vorläuferproteins wie auch des für Ti-1 spezifischen Degradationsprodukts zu sehen ist. Die verringerte Bildung von Ti-1 ist möglicherweise die Folge einer geringeren Stabilität der Liposomen die große Mengen an MGDG enthalten. Andererseits könnte es sich dabei auch um einen spezifischen Effekt der Lipide auf die Insertion des Vorläuferproteins in die Membran handeln. Generell ist aber das 16/23-Protein offensichtlich in der Lage auch in Membranen zu inserieren, welche ausschließlich Galactolipide enthalten sowie zu 30 mol% aus MGDG bestehen.

## 2.3 Lösliches stromales TatA fördert den Tat-abhängigen Proteintransport über die Thylakoidmembran

### 2.3.1 Zusammenfassung

Da *in vitro* die Tat-abhängige Proteintransportmaschinerie von isolierten Thylakoidvesikeln in Abwesenheit von Stroma aktiv ist, wurde bislang davon ausgegangen, dass der Tat-abhängige Proteintransport an der Thylakoidmembran unabhängig von löslichen stromalen Komponenten operiert (z.B. (Mould *et al.*, 1991)). Allerdings wurden im bakteriellen System diverse cytoplasmatische Chaperone gefunden, die sowohl mit dem reifen Teil, als auch mit Signalpeptiden von Vorläuferproteinen interagieren (Sargent, 2007). In Gram-positiven Bakterien wurden sogar lösliche Formen von TatA und TatB, also Komponenten der eigentlich membranständigen Tat-Translokase gefunden, die auch mit Vorläuferproteinen interagieren (Pop *et al.*, 2003; De Keersmaeker *et al.*, 2005). Dies weist darauf hin, dass möglicherweise auch am pflanzlichen Tat-System lösliche stromale Komponenten beteiligt sind. Erste Hinweise wurden dafür bereits im Rahmen einer vorangegangenen Diplomarbeit gefunden (Frielingsdorf, 2003). Dass sich der Tat-abhängige Proteintransport durch Vorbehandlung der Thylakoide mit chaotropen Salzen oder alkalischen Lösungen unterbinden lässt, wurde bereits gezeigt (Hou *et al.*, 2006). Interessanterweise ist diese Blockierung des Tat-Transportwegs aber reversibel. Nach Zugabe von stromalem Extrakt zu Thylakoiden, die mit dem chaotropen Salz Natriumbromid (NaBr) vorbehandelt wurden, kann die Transportaktivität der Thylakoide zu einem gewissen Anteil wiederhergestellt werden. Dieser Effekt lies sich sowohl für authentische Vorläuferproteine wie auch für das chimäre 16/23-Protein nachweisen. Durch Zugabe von stromalem Extrakt lässt sich sogar die Transportrate von isolierten Thylakoiden, die nicht mit NaBr vorbehandelt wurden, noch steigern. Diese Ergebnisse weisen deutlich darauf hin, dass im Stroma Komponenten enthalten sein müssen, die sowohl für die Steigerung der Transportrate, als auch für die Wiederherstellung des Transports nach NaBr-Behandlung verantwortlich sind.

Zur weiteren Untersuchung des Effekts von Stroma auf den Tat-abhängigen Proteintransport wurde als Transportsubstrat wieder das 16/23-Protein eingesetzt, damit jederzeit nachvollzogen werden konnte, welcher Teilschritt des Transportprozesses durch Veränderungen des Testsystems beeinflusst werden. Zusätzlich wurde die Vorbehandlung der Thylakoide mit NaBr optimiert, wobei aber darauf hinzuweisen ist, dass die Effizienz der Blockierung des Transports durch die NaBr-Behandlung bei jeder Thylakoidpräparation

gewissen Schwankungen unterliegt, was aber die Anwendbarkeit des Testsystems kaum beeinträchtigt.

Durch den Einsatz dieses Testsystems konnte zunächst festgestellt werden, dass die Wiederherstellung der Transportaktivität von NaBr-behandelten Thylakoiden direkt von der Konzentration des verwendeten stromalen Extrakts abhängt. Weiterhin stellte sich die Frage, ob der stromale Extrakt während des Transportprozesses im Reaktionsansatz vorhanden sein muss. Werden NaBr-behandelte Thylakoide dementsprechend mit Stroma inkubiert und anschließend gewaschen, bevor die Reaktion gestartet wird, so kann trotzdem die Transportaktivität eingeschränkt wiederhergestellt werden. Daraus kann geschlossen werden, dass mindestens eine stromale Komponente zum Teil wieder an vorbehandelte Thylakoide binden kann. Dies zeigt, dass nicht der vollständige stromale Extrakt während des Transports vorhanden sein muss und dass die verantwortliche Komponente offensichtlich eine gewisse Tendenz aufweist an Membranen mindestens zu assoziieren, wenn nicht sogar sich in diese zu integrieren. Daraus ergab sich auch die Frage, ob die stromale Komponente zwangsläufig vor der Bindung des Vorläuferproteins an die Thylakoide vorhanden sein muss. Dazu wurde das 16/23-Protein an NaBr-behandelte Thylakoide gebunden und erst anschließend mit Stroma versetzt. Da auch dieses vorher gebundene Vorläuferprotein transportiert wird, ist davon auszugehen, dass die stromale Komponente nicht für die Bindung des Proteins an die Thylakoide benötigt wird, sondern lediglich den Schritt der Translokation über die Membran beeinflusst.

Da nun die Eigenschaften des stromalen Extrakts charakterisiert waren, galt es die verantwortliche Komponente zu identifizieren. Als mögliche Kandidaten wurden zunächst die oben genannten Chaperone in Betracht gezogen. Chaperone benötigen, abgesehen von den PPIasen (Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen), im Allgemeinen Energie in Form von Nukleosidtriphosphaten (Netzer & Hartl, 1998). Eine solche Abhängigkeit des Effekts von Stroma auf vorbehandelte Thylakoide konnte aber nicht nachgewiesen werden. Es ist daher nicht anzunehmen, dass es sich bei der gesuchten Komponente um ein Chaperon handelt. Als weitere mögliche Kandidaten wurden die Komponenten der Tat-Translokase betrachtet, da wie bei den Chaperonen aus dem bakteriellen System Interaktionen mit Vorläuferproteinen im Cytoplasma bekannt sind. Dazu wurde untersucht, ob sich die einzelnen Komponenten durch die NaBr-Vorbehandlung aus den Thylakoiden entfernen lassen und ob sie im stromalen Extrakt vorkommen. TatB und TatC ließen sich aber kaum aus Thylakoiden entfernen und sind auch nicht im Stroma vorhanden. Des Weiteren ist der TatBC-Rezeptorkomplex auch nach NaBr-Vorbehandlung in der Lage Vorläuferproteine zu binden. Interessanterweise lässt

sich aber TatA im Gegensatz zu TatB und TatC größtenteils aus der Thylakoidmembran entfernen und kommt auch in deutlich detektierbaren Mengen im stromalen Extrakt vor, was nahe legt, dass es sich bei TatA um die gesuchte stromale Komponente handeln könnte.

Um zu testen ob TatA für die Wiederherstellung der Transportaktivität verantwortlich ist, wurde es *in vitro* synthetisiert und zu vorbehandelten Thylakoiden gegeben. Dabei zeigte sich der gleiche Effekt wie bei Zugabe von stromalem Extrakt. Lediglich die Intensität des Effekts war verringert, was aber von einer inhibierenden Wirkung des verwendeten *in vitro* Translationssystems herrührt. Zur Absicherung dieses Experiments wurde ein reziproker Ansatz gewählt. Wird vorhandenes TatA aus stromalem Extrakt durch Immunpräzipitation entfernt und wird dieser Extrakt für eine Transportreaktion mit vorbehandelten Thylakoiden eingesetzt, so ist keine Wiederherstellung der Transportaktivität mehr festzustellen. Aus den genannten Experimenten ist zu schließen, dass es sich bei TatA um die gesuchte stromale Komponente handelt. Abschließend zeigte sich, dass TatA im Stroma nicht als Monomer vorliegt, sondern in hochmolekularen Komplexen vorhanden ist.

### **2.3.2 Artikel**

## Soluble stromal TatA promotes Tat-dependent protein transport across the thylakoid membrane\*

Stefan Frielingsdorf, Mario Jakob, and Ralf Bernd Klösgen

From the Institute of Biology – Plant Physiology, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Weinbergweg 10, 06120 Halle (Saale), Germany

Running title: Soluble TatA promotes Tat-dependent transport

Address correspondence to: Ralf Bernd Klösgen, Institut für Biologie – Pflanzenphysiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Weinbergweg 10, 06120 Halle (Saale), Germany, Tel. ++49 - 345 - 55 26 200; Fax. ++49 - 345 - 55 27 285; E-mail: klosgen@pflanzenphys.uni-halle.de

**In chloroplasts and bacteria, the Tat<sup>1</sup> (twin-arginine translocation) system is engaged in transporting folded passenger proteins across the thylakoid and cytoplasmic membranes, respectively. To date, three membrane proteins (TatA, TatB, and TatC) have been identified to be essential for Tat-dependent protein translocation in the plant system, while soluble factors seem not to be required. In contrast, in the bacterial system several cytosolic chaperones were described to be involved in Tat transport processes. Therefore, we have examined whether stromal or peripherally associated membrane proteins play a role also in Tat transport across the thylakoid membrane. Analysing both, authentic precursors as well as the chimeric 16/23 protein which allows to study each step of the translocation process individually, we demonstrate that a soluble form of TatA is present in the chloroplast stroma which significantly improves the efficiency of Tat-dependent protein transport. Furthermore, this soluble TatA is able to reconstitute the Tat transport properties of thylakoid membranes that are transport incompetent due to extraction with solutions of chaotropic salts.**

translocate proteins in a fully folded conformation across an energised membrane (3-8). However, it accepts also unfolded proteins as substrates (4), unless they expose extended hydrophobic stretches at their surface (9). The energy source of the Tat transport pathway is still a matter of debate. Recent data showed that at the thylakoid membrane transport can be driven by either  $\Delta\text{pH}$  or  $\Delta\Psi$ , while in the bacterial system it seems to be strictly dependent on the  $\Delta\Psi$  across the membrane (10,11).

Three membrane proteins, namely TatA, TatB, and TatC (in the thylakoid system also called Tha4, Hcf106, and cpTatC, respectively) are essential for Tat-dependent protein translocation (12-16). Mechanistically, protein transport by the Tat pathway is initiated by the direct insertion of the transport substrate into the target membrane (17,18) followed by association to the TatBC receptor complex (19,20) which in plants has an apparent size of 560-700 kDa (19,21). The actual translocation step depends on TatA which joins the TatBC/substrate complex (19,22). Finally, the Tat substrate is presumably released into the membrane for proteolytic removal of the signal peptide (23).

The thylakoidal Tat pathway is generally assumed to act independently from soluble factors or nucleoside triphosphates (24). Only in the case of the Rieske protein a requirement for stromal chaperones has been described which are presumably involved in the assembly of the iron-sulphur cluster (25). In contrast, in bacterial Tat systems several chaperones were found to bind the precursor proteins prior to translocation (26-29). Even cytosolic forms of either TatA or TatA and TatB were reported for *Bacillus subtilis*, *Streptomyces lividans*, and *Escherichia coli*, respectively (30-33), which suggests that soluble components might play a bigger role in the Tat translocation process than originally assumed. Therefore, it was the goal of this study to examine in detail the potential involvement of stromal and peripherally associated thylakoid membrane proteins on the individual steps of Tat-dependent protein transport.

The twin arginine translocation (Tat) pathway translocates proteins across the thylakoid membrane of chloroplasts and the plasma membranes of bacteria and archaea (1). It is specifically engaged by proteins carrying signal peptides with a characteristic twin pair of arginine residues within their N-region (2). Maybe the most remarkable feature of the Tat pathway is its ability to

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

<sup>1</sup> The abbreviations used are: Tat, twin-arginine translocation; Ti-1/Ti-2, translocation intermediate 1/2; TPP, thylakoidal processing peptidase

<sup>2</sup> Jakob M., Kaiser S., Gutensohn M., Hanner P., and Klösgen R.B.; submitted

## Experimental Procedures

### *Protein transport experiments*

Isolation of chloroplasts and thylakoids was carried out according to (17). Protein transport experiments with radiolabelled precursor proteins followed published protocols (5). Protein extraction of thylakoids with solutions of chaotropic salts prior to transport experiments was performed as described (34).

### *Preparation of stromal extract*

For the preparation of stromal extract, chloroplasts were lysed by osmotic shock for 10 min on ice at 0.75 mg chlorophyll/ml in HM buffer (10 mM HEPES/KOH, pH 8.0; 5 mM MgCl<sub>2</sub>). Thylakoids were sedimented by centrifugation for 5 min at 20,000 x g at 4 °C. To completely remove chloroplast envelope membranes and residual thylakoid membranes from the soluble fraction, the supernatant was subjected to ultracentrifugation for 1 h at 100,000 x g at 4 °C. Stromal extract was concentrated using Vivaspin 5.000 MWCO PES ultrafiltration columns (Sartorius AG, Göttingen, Germany), frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C until use.

### *TatA depletion of stromal extract*

50 µl 10-fold concentrated stromal extract were supplemented with NaCl (180 mM final concentration) and 4 µg affinity purified TatA antibodies and incubated for 1 h at 4 °C on a slowly rotating wheel. 100 µl Protein A Sepharose CL-4B (10 % (w/v) (GE Healthcare, München, Germany) in HM-NaCl buffer (10 mM HEPES/KOH, pH 8.0; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 180 mM NaCl) were added and incubated for 1 h at 4 °C on the rotating wheel. Protein A Sepharose was sedimented by centrifugation for 10 min at 3000 rpm in a microfuge. The supernatant was removed and the pellet was washed twice with HM-NaCl buffer. All supernatants were pooled and concentrated to a volume of 50 µl using Vivaspin 5.000 MWCO PES ultrafiltration columns (Sartorius AG, Göttingen, Germany) to yield TatA-depleted 10-fold concentrated stromal extract. The Protein A Sepharose pellet was finally resuspended in SDS-PAGE sample buffer for further analysis.

### *In vitro synthesis of TatA*

TatA synthesis was carried out with the "RTS Wheat Germ Linear Template Generation Set" and the "RTS 100 Wheat Germ CECF Kit" according to the manufacturer's instructions (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) using the following primers: 5'-ctttaagaaggagatataccatggccttctcgtctagc-3' and 5'-tgatgatgagaacccccctatcatacattatccttgtg-3'. The translation start was set to the predicted SPP

cleavage site at amino acid position 56 of the precursor protein according to (35). It should be noted that the TatA cDNA used here deviates at one nucleotide position from the published sequence (Accession: AAD33943) leading to a conservative amino acid exchange from glutamate to aspartate at position 127 of the precursor protein.

### *Miscellaneous*

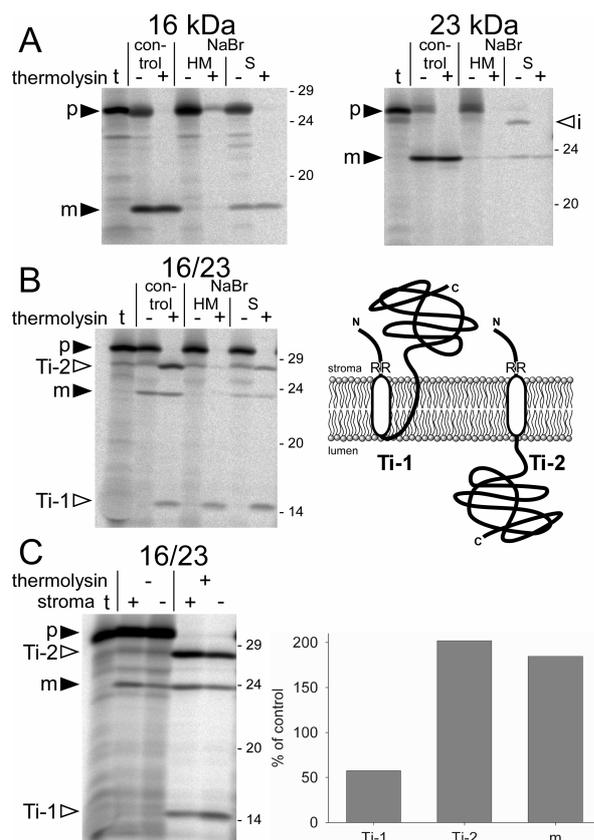
Gel electrophoresis of proteins under denaturing conditions was carried out according to (36). Blue Native gel electrophoresis (37) was carried out according to (21). The gels were exposed to phosphorimaging screens and analysed with the Fujifilm FLA-3000 (Fujifilm, Düsseldorf, Germany) using the software packages BASReader (version 3.14) and AIDA (version 3.25) (Raytest, Straubenhardt, Germany). Tris-Glycine Native (TGN) gel electrophoresis (38) was modified by addition of ε-aminocaproic acid according to other native gel systems (37). For 2D analysis of proteins combining TGN-PAGE and SDS-PAGE, TGN lanes were incubated after electrophoresis for 10 min at 40 °C in 1xSDS running buffer supplemented with 1 % SDS and 0.1 % β-mercaptoethanol, and fixed with 1 % agarose onto the SDS gel. Molecular weights of non-denatured protein complexes were determined according to the "HMW Native Marker Kit" (GE Healthcare, München, Germany). Western analysis of Tat proteins was carried out as described (39). All other methods followed published protocols (40).

## Results

### *NaBr treatment of thylakoid vesicles abolishes Tat-dependent protein translocation*

It is generally assumed that Tat-dependent protein transport across the thylakoid membrane operates independently from soluble factors, because it is observed also in isolated thylakoid vesicles resuspended in buffer, e.g. (24). However, such assays are not completely devoid of stromal factors, since several stromal proteins tend to associate peripherally with thylakoid membranes from the stromal side and are thus co-isolated to a certain extent together with the thylakoids upon organelle fractionation. In order to examine whether such membrane attached stroma proteins play a role in the transport process, thylakoids were additionally treated with NaBr solutions to remove all peripherally associated proteins and subsequently subjected to protein transport experiments analysing the authentic precursor proteins of the 16 kDa and 23 kDa subunits of the oxygen evolving system associated with photosystem II. In neither case, significant amounts of the respective mature proteins which are

indicative of membrane transport and terminal



**Fig. 1.** Influence of stromal extract on Tat-dependent protein transport across the thylakoid membrane

The precursor proteins 16 kDa, 23 kDa, and 16/23 were obtained by *in vitro* transcription/translation and incubated with isolated pea thylakoids for 15 min in the light at 25 °C. After the import reaction, the thylakoids were washed with HM buffer (10 mM Hepes/KOH, pH 8.0; 5 mM MgCl<sub>2</sub>) and either treated with thermolysin (200 µg/ml, 30 min on ice, lanes +), or mock treated (lanes -). Stoichiometric amounts of each fraction, corresponding to 15 µg of chlorophyll, were separated on 10-17.5 % SDS-polyacrylamide gradient gels and visualised by phosphorimaging. In lanes *t*, 1 µl of the respective *in vitro* translation assay was loaded. The positions of the precursor (*p*) and mature protein (*m*) are indicated by filled arrowheads, while open arrowheads point to the positions of the stromal intermediate of the 23 kDa precursor (*i*), or to the two integral translocation intermediates, Ti-1 and Ti-2 observed with 16/23. **(A)** In thylakoido transport experiments performed with the authentic 16 kDa (left panel) and 23 kDa (right panel) precursor proteins, respectively. Prior to the import reaction, thylakoids were washed with either HM buffer (control) or 1 M NaBr (NaBr) as described (34) and subsequently resuspended in either HM buffer (HM) or stromal extract (S). **(B)** In thylakoido import experiment analysing the chimeric 16/23 precursor protein as detailed in (A). In the right panel, a schematic representation of the topology of the early (Ti-1) and late (Ti-2) translocation intermediates observed during thylakoid membrane transport of the chimeric 16/23 protein is depicted. The open ellipsoid indicates the hydrophobic central core within the thylakoid targeting signal peptide and RR points to the position of the twin-arginine motif. **(C)** In thylakoido transport experiment analysing the 16/23 precursor in the presence and absence of stromal extract. Thylakoids were resuspended in either HM buffer or stromal extract prior to the transport reaction as shown on top of the lanes (-/+). The signal intensities of Ti-1, Ti-2, and mature protein, respectively, were quantified for each assay and are given as relative amounts found in the presence of stromal extract (in terms of percentage of that found in the absence of stromal extract) in the right panel.

processing are found with such thylakoids (Fig. 1A), in line with previously described results (17). This result confirms that treatment with solutions of chaotropic salts interferes with Tat-dependent protein translocation, presumably due to the extraction of an essential component of the transport machinery.

#### Thylakoid transport can be recovered by stromal extracts

Such transport inhibition is reversible though. If fractions of the NaBr-treated thylakoids are resuspended in stromal extract prior to the addition of the precursor proteins, mature 16 kDa and 23 kDa proteins accumulate to considerable amounts (Fig. 1A) suggesting that translocation activity had been restored. Although translocation efficiency is not fully recovered, most likely a consequence of destruction of some thylakoids upon extraction, it is certainly high enough to demonstrate the activity of a stromal component capable of reconstituting Tat-dependent protein transport that was impaired by extraction with chaotropic salts. The stromal extract is enzymatically active, as indicated by cleavage of the precursor of the 23 kDa protein by the stromal processing peptidase (SPP) to the stromal intermediate (Fig. 1A). Furthermore, it is devoid of residual envelope and thylakoid membranes, since it was subjected to ultracentrifugation for 1 h at 100,000 x g prior to addition to the assays. This indicates that the component capable of reconstituting Tat-dependent protein transport is soluble in aqueous solution.

In order to determine which step of the translocation process is impaired by NaBr treatment, the chimeric 16/23 protein which consists of the transit peptide of the 16 kDa subunit and the mature part of the 23 kDa subunit, both from the oxygen-evolving system, was analysed with an analogous approach. Tat-dependent thylakoid transport of this chimeric protein is known to be significantly retarded (17) so that distinct translocation intermediates indicative of individual steps in the translocation process can be identified (Fig. 1B, right panel). The early translocation intermediate (Ti-1) adopts a loop conformation within the membrane prior to the actual translocation step, while translocation intermediate-2 (Ti-2) is characterised by a bitopic transmembrane conformation representing the membrane bound stage after translocation of the passenger protein across the membrane. Upon protease treatment, two indicative degradation products of 14 kDa and 26 kDa, respectively, permit detection of these two intermediates (Fig. 1B, left panel) (17). Thylakoid transport experiments analysing the 16/23 chimera with NaBr-treated thylakoids show that Ti-1 still

accumulates which demonstrates that binding of the precursor protein to the membrane is not affected. Formation of Ti-1 under these conditions was actually expected, because the first step in the translocation process can take place independently from proteinaceous components by direct interaction of the precursor protein with the lipid phase (17). In contrast, Ti-2 formation and subsequent maturation of the protein are prevented with NaBr-treated thylakoids demonstrating that in such vesicles the actual translocation step is blocked (Fig. 1B). Like with the authentic precursors described above, translocation is recovered to a considerable degree if the NaBr-treated thylakoids were resuspended in stroma rather than in buffer. In this instance, both Ti-2 and the terminal processing product can again be detected proving that stromal extract is capable of compensating for the translocation arrest between Ti-1 and Ti-2 that is observed with NaBr-treated thylakoids.

#### ***Stromal extract improves the efficiency of Tat-dependent protein translocation***

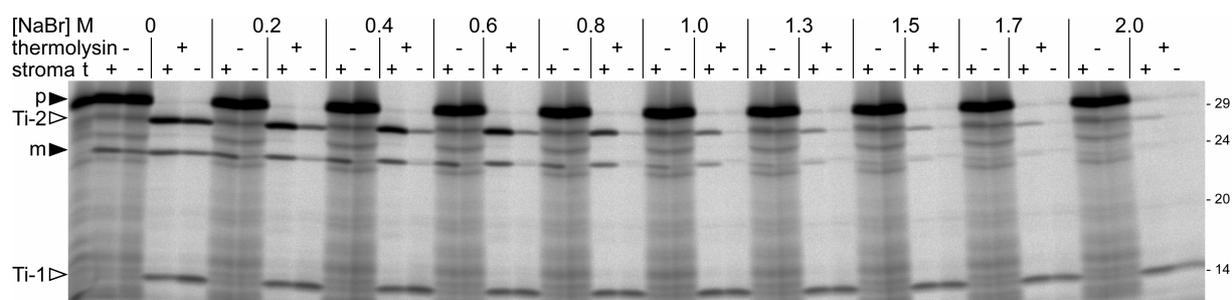
To test whether stroma has an effect on the transport activity also of untreated thylakoid vesicles, thylakoids were resuspended in either buffer or stromal extract after lysis of the chloroplasts and assayed in protein transport experiments analysing the 16/23 chimera. Quantification of the signals obtained from the two experimental approaches showed that both, Ti-2 and the mature 23 kDa protein, accumulate in approximately 2-fold higher amounts in those thylakoids that had been resuspended in stroma rather than in HM buffer (Fig. 1C). In line with that, the amount of Ti-1 is accordingly reduced to approximately 50 % in such assays. This apparent reduction is presumably not a result of reduced membrane binding of the protein but instead caused by an enhanced membrane translocation activity of the respective thylakoid vesicles. Thus, stromal components apparently promote the process of Tat-dependent protein transport even of untreated

thylakoids by improving the efficiency of the actual membrane translocation step from Ti-1 to Ti-2.

In order to determine the optimal NaBr concentration for membrane extraction, thylakoids were treated with NaBr solutions ranging from 0.2-2 M, resuspended in either buffer or stromal extract, and subjected to protein transport assays analysing the 16/23 chimera. It turned out that even pretreatment of thylakoids with NaBr solutions of low concentration (0.2-0.4 M) has a remarkable inhibitory effect on the transport process. The accumulation of Ti-2 and the mature 23 kDa protein is significantly reduced in these assays and protein translocation is to a large extent, though not entirely, arrested at the stage of Ti-1 (Fig. 2). In line with the results described above, this transport block is almost completely overridden in the presence of stroma. However, pretreatment of the thylakoids with solutions of 1.7 M NaBr or even higher concentration leads to virtually irreversible loss of transport activity, even in the presence of stromal extract (Fig. 2). For our experiments aspiring to characterise the promoting effect of stroma on Tat-dependent protein transport, thylakoids treated with solutions of approximately 0.8-1.0 M NaBr turned out to be most suitable, because they show only minimal residual transport activity when resuspended in buffer but still allow for significant recovery of translocation activity in the presence of stromal extracts.

#### ***Transport recovery depends on stromal concentration and is observed also with prebound precursor protein***

Next, we wanted to find out if the extent to which Tat-dependent transport of NaBr-treated thylakoids can be recovered depends on the concentration of the stromal extract present in the assay. This made sense, because upon preparation of stromal extract by chloroplast lysis the stromal components are inevitably diluted at least 10-fold. To compensate for this effect, the stromal extracts were concentrated by ultrafiltration 5-fold and 10-fold, respectively, prior to their analysis in



**Fig. 2. Optimisation of the NaBr extraction conditions**

*In thylakoido* import experiment analysing the 16/23 precursor protein. Thylakoids were extracted with NaBr solutions of different concentrations and resuspended in either buffer or stromal extract as detailed on top of the lanes. For further details see the legend to Fig. 1.

thylakoid transport experiments. It turned out that the stimulating effect of stromal extract is indeed significantly stronger if the thylakoids were resuspended in stromal extracts of higher concentration (Fig. 3A) suggesting that recovery of transport efficiency is a concentration-dependent process. Although the degree of transport recovery varies to some extent between individual experiments, presumably dependent on the residual

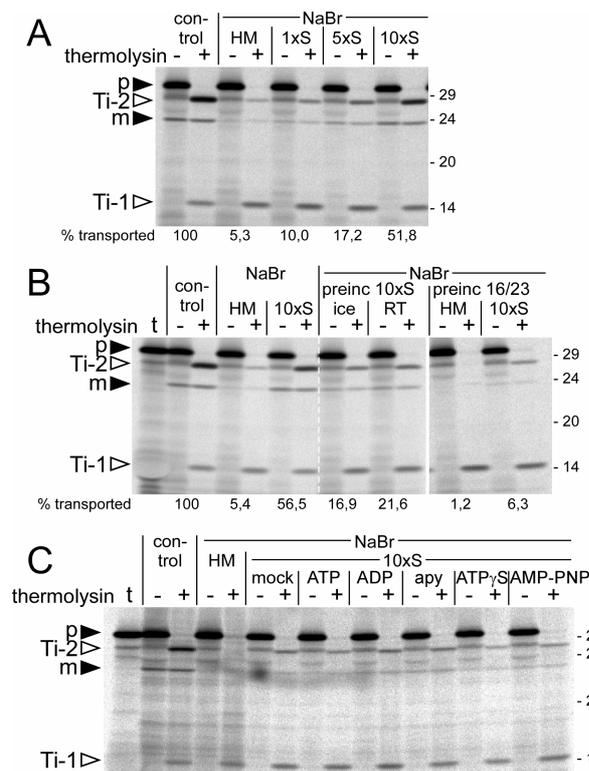
transport activity of the thylakoids after NaBr treatment (between 3 % and 10 % of untreated thylakoids; data not shown), with 10-fold concentrated stroma it usually achieves approximately 50 % of the control reaction analysing untreated thylakoids (Fig. 3A, B).

Remarkably, the transport promoting stromal component needs not to be present in the soluble fraction during transport but can even be attached to the thylakoids prior to the actual transport experiment. If NaBr-treated thylakoids are incubated for 10 minutes with 10-fold concentrated stroma, washed extensively with HM-buffer to remove loosely attached stromal components and subsequently analysed in thylakoid transport experiments with the 16/23 chimera, these "preloaded" thylakoids show approximately 20 % of the transport activity found with untreated control thylakoids (Fig. 3B), a rate which is similar to the transport recovery obtained in the presence of 5-fold concentrated stromal extract (Fig. 3A). This "preloading" effect is apparently not temperature-dependent, since it is observed irrespective of whether the incubation of the thylakoids with stromal extract is performed on ice or at room temperature (Fig. 3B).

In a kind of reciprocal approach, we have examined if a precursor protein arrested in the Ti-1 conformation can still be recognised as substrate if transport competence of the thylakoids is reconstituted by the addition of stroma. For this purpose, NaBr-treated thylakoids were incubated with the 16/23 precursor protein on ice for 2 min to allow binding and Ti-1 formation. The thylakoids were extensively washed with HM buffer to remove loosely attached precursor proteins and subsequently resuspended in either 10-fold concentrated stroma or HM buffer. As expected, the 16/23 chimera remains arrested in its Ti-1 conformation in the absence of stromal components. However, if the assays are supplemented with stromal extract significant amounts of Ti-2 accumulate which is indicative for membrane transport of the passenger protein (Fig. 3B). Even processing to the mature 23 kDa protein can be observed, though to a minor extent only.

### ***The transport promoting stromal component operates independently from nucleoside triphosphates***

The data obtained so far strongly suggest that the stromal component responsible for the transport recovery of NaBr-treated thylakoids is a soluble factor that has the capacity to interact with the thylakoid membrane. The most obvious candidates for such factors are chaperones, in particular, since several chaperones were found in bacterial systems to be involved in binding of Tat substrates (41). The



**Fig. 3.** Effect of stromal concentration on the transport properties of NaBr-extracted thylakoids

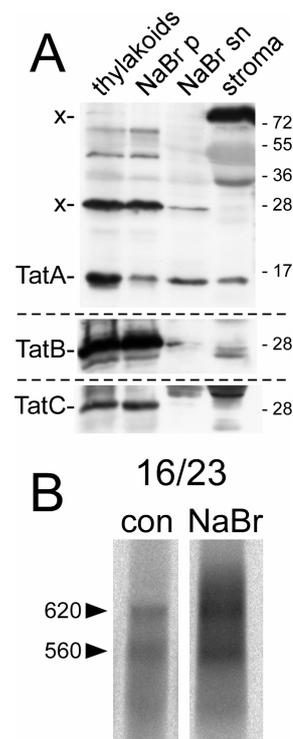
(A) Thylakoids were extracted with 1 M NaBr, resuspended in either HM buffer (HM) or stromal extract of different concentration (1xS, 5xS, 10xS) and subjected to thylakoid transport experiments analysing the 16/23 precursor. The relative amounts of translocated protein (i.e., Ti-2 plus mature protein, taking into account the respective number of [<sup>35</sup>S]methionine residues) were quantified (in terms of percentage of the control reaction) and are given below the corresponding lanes. (B) Thylakoids extracted with 1 M NaBr were preincubated for 10 min with 10-fold concentrated stromal extract (preinc 10xS) on either ice or at room temperature (RT) and washed once with HM buffer prior to the import reaction (middle panel). Alternatively, thylakoids extracted with 1 M NaBr were preincubated for 2 min on ice with the 16/23 precursor protein and subsequently washed once with HM buffer to remove excess precursor (preinc 16/23, right panel). Thylakoids were then resuspended in either HM buffer (HM) or 10-fold concentrated stroma (10xS) upon starting the import reaction. In the left panel, import experiments analogous to that shown in (A) were performed in parallel for comparison. Quantification of the signal intensities was carried out as in (A). (C) Thylakoids extracted with 1 M NaBr were resuspended in either HM buffer (HM) or 10-fold concentrated stromal extract (10xS) that was furthermore supplemented with either buffer (mock), 5 mM ATP, 5 mM ADP, 2 U apyrase (apy), 5 mM ATP<sub>γ</sub>S, or 5 mM AMP-PNP and subjected to thylakoid transport assays using the 16/23 precursor protein. For further details see the legend to Fig. 1.

activity of the majority of chaperones depends on nucleoside triphosphates (42) and we have therefore examined if the transport stimulating effect of stroma is modified by apyrase-mediated degradation of nucleoside triphosphates or by supplementing the stromal extracts with additional ATP, ADP, or the non-hydrolysable ATP analogs ATP $\gamma$ S and AMP-PNP. In spite of some variability in the individual assays, it is apparent that neither of these substances has a significant effect on the transport recovery of NaBr-treated thylakoids by stromal extract, since in all fractions similar amounts of Ti-2 and mature protein could be detected (Fig. 3C). This demonstrates that the "stromal effect" is not directly dependent on the presence of hydrolysable nucleoside triphosphates which makes it unlikely that chaperones are responsible for it.

#### ***The TatBC receptor complex is resistant to NaBr extraction***

In order to examine to which extent the subunits of the Tat translocase are sensitive to extraction by solutions of chaotropic salts, thylakoids were treated with NaBr solution, recovered by centrifugation and subjected to Western analyses using polyclonal antisera raised against *TatA*, *TatB*, and *TatC*, respectively. The supernatant of the centrifugation step which should contain all extracted membrane components was analysed in parallel, together with untreated thylakoids and stromal extracts (Fig. 4A). To allow for direct comparison of the distribution of the corresponding proteins in the different fractions, stoichiometric amounts of each fraction (equivalent to 15  $\mu$ g chlorophyll) were examined.

It turned out that neither *TatB* nor *TatC* are extracted to a significant extent from the thylakoids by NaBr treatment. In line with that, neither of the two proteins can be detected in the stromal fraction, demonstrating that they cannot be responsible for the transport promoting effect of stromal extract. Still, NaBr treatment might disturb the functional properties of the thylakoidal *TatBC* receptor complex, e.g. its affinity to Tat substrates like the 16/23 precursor protein (21,23). In order to examine such substrate binding properties, both, NaBr-treated thylakoids and untreated thylakoids were incubated with radiolabelled 16/23 protein and subjected to Blue Native-PAGE and phosphorimaging. Remarkably, it turned out that NaBr pretreatment leads even to increased amounts of receptor-associated 16/23 protein (Fig. 4B), most probably due to prevention of the subsequent translocation step which results in increased precursor accumulation at the *TatBC* receptor complex. This demonstrates that NaBr extraction does not affect the receptor function of *TatB* and *TatC*.



**Fig. 4. BN-PAGE and Western analysis of NaBr-extracted thylakoids**

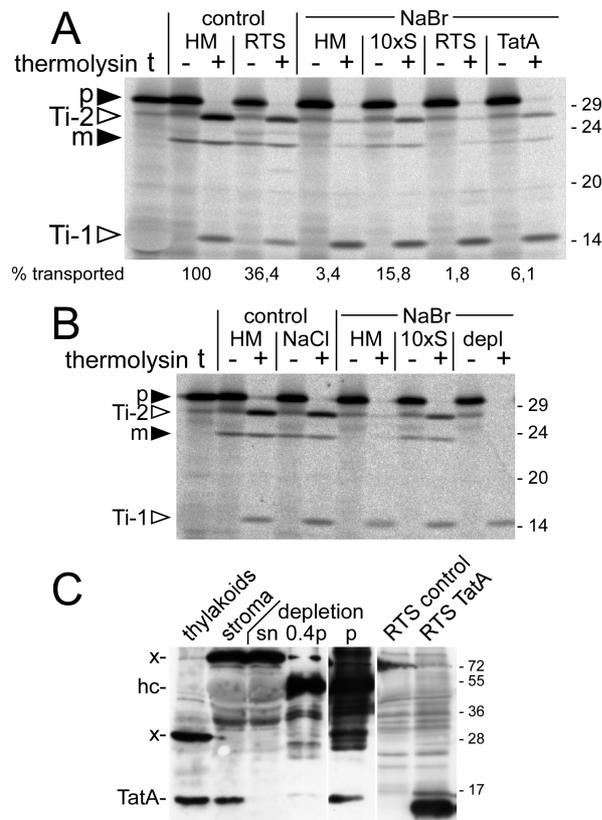
(A) Thylakoids were extracted with 1 M NaBr and sedimented by centrifugation. Stoichiometric amounts equivalent to 15  $\mu$ g chlorophyll of both, the thylakoid pellet (*NaBr p*) and the supernatant (*NaBr sn*), were separated on 15 % SDS-polyacrylamide gels and subjected to Western analyses with polyclonal antisera raised against *TatA*, *TatB*, and *TatC*. For comparison, stoichiometric amounts of untreated *thylakoids* as well as of stromal extract (*stroma*) were analysed in parallel. x points to the positions of proteins cross reacting with the *TatA* antibody. (B) In *thylakoido* transport experiment analysing the 16/23 precursor with untreated (*con*) or NaBr-extracted thylakoids (*NaBr*). Thylakoids were washed twice with HM buffer, solubilised with digitonin, separated on a 5-13.5 % Blue Native polyacrylamide gradient gel, and visualised by phosphorimaging.

#### ***Stromal TatA restores transport activity of NaBr-extracted thylakoids***

In contrast, the majority of *TatA* is removed from thylakoid membranes upon NaBr treatment (Fig. 4A) which could explain the block in protein translocation observed. Unexpectedly, significant amounts of *TatA* are even detected in the stromal fraction (Fig. 4A) which is a first hint that *TatA* might be the stromal component that is capable of restoring the transport properties of NaBr-treated thylakoids.

In order to examine this possibility in more detail, mature *TatA* was generated by *in vitro* translation in the wheat germ Rapid Translation System (RTS). The resulting *TatA* protein shows a slightly higher mobility upon SDS-PAGE when compared to *TatA* isolated from pea chloroplasts (Fig. 5C). This might either be a consequence of the translation initiating methionine residue added to

the N-terminus of the protein or indicate a mistake in the prediction of the cleavage site for the stromal processing peptidase. However, since an identical



**Fig. 5.** *TatA is responsible for the functional complementation of NaBr-treated thylakoids*

(A) Thylakoids were extracted with 1 M NaBr and resuspended in either HM buffer (*HM*), 10-fold concentrated stromal extract (*10xS*), HM buffer supplemented with 25  $\mu$ l wheat germ rapid translation system (*RTS*) or HM buffer supplemented with *TatA* protein generated in 25  $\mu$ l wheat germ rapid translation system (*TatA*). For the *control* reactions, untreated thylakoids were resuspended in either HM buffer (*HM*) or in HM buffer supplemented with 25  $\mu$ l wheat germ rapid translation system (*RTS*). All thylakoid fractions were subsequently assayed for protein transport of the chimeric 16/23 precursor protein as detailed in the legend to Fig. 1. (B) Thylakoids were extracted with 1 M NaBr and resuspended in either HM buffer (*HM*), 10-fold concentrated stromal extract (*10xS*) or 10-fold concentrated stromal extract depleted from *TatA* (*depl*). For the *control* reactions, untreated thylakoids were resuspended in either HM buffer (*HM*) or HM-NaCl buffer (10 mM Hepes/KOH, pH 8.0; 5 mM  $MgCl_2$ ; 180 mM NaCl) (*NaCl*). All thylakoid fractions were subsequently assayed as in (A). (C) 10-fold concentrated stromal extract was depleted from *TatA* as described in Materials and Methods. Stoichiometric amounts of *TatA*-depleted stromal extract (*depletion sn*) and of the depleted *TatA* protein (*depletion p*) as well as a lower amount (40%) of depleted *TatA* (*depletion 0.4p*) were separated on a 15% SDS-polyacrylamide gel and subjected to Western analysis with polyclonal antibodies raised against *TatA*. For comparison, stoichiometric amounts of untreated thylakoids and stromal fraction (*stroma*) were analysed in parallel. Likewise, 2  $\mu$ l of the wheat germ rapid translation system (*RTS control*) as well as of *TatA* protein generated in this system (*RTS TatA*) were analysed. *x* points to the positions of proteins cross reacting with the *TatA* antibody, whereas *hc* indicates the position of the heavy chain of *TatA* antibodies from the depletion assays. For further details, see the legends to Figs. 1, 3, and 4.

*TatA* protein has previously been shown to be active in translocation (35), in neither case the function of the protein is apparently affected.

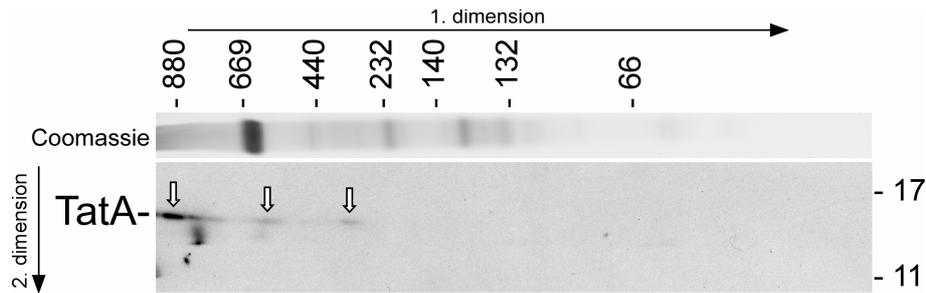
Indeed, supplementation of NaBr-treated thylakoids with such *in vitro* generated *TatA* protein leads to a significant increase in protein transport activity (Fig. 5A). This increase is particularly remarkable considering the fact that wheat germ *RTS* not expressing *TatA* even inhibits *Tat*-dependent protein transport to some extent (36% of the control reaction, Fig. 5A). This inhibition is probably due to reduced binding of the precursor protein to the thylakoids in the presence of *RTS*, because formation of *Ti-1* is likewise reduced to approximately 40% (Fig. 5A).

To examine the presumed function of *TatA* as the stromal transport recovery factor for NaBr-treated thylakoids in an independent approach, *TatA* was depleted from stromal extracts by immunoprecipitation with affinity purified *TatA* antibodies. Analysis of NaBr-treated thylakoids that were resuspended in such *TatA*-depleted stromal extracts showed that they are not capable of translocating the 16/23 chimera, i.e. transport of this protein remains arrested at the stage of *Ti-1* (Fig. 5B). Thus, stromal *TatA* is indeed the factor that is responsible for the recovery of protein transport activity of NaBr-treated thylakoids by stromal extract.

Of course, these experiments were complemented by the essential controls: First, NaCl which had to be added to the stromal extracts upon *TatA* depletion to prevent unspecific binding of proteins to the affinity matrix does not show any inhibitory effect if added to thylakoid transport assays analysing the 16/23 chimera (Fig. 5B). Second, it was important to examine the efficiency of both, the depletion reaction and the subsequent removal of the *TatA* antibodies. Since neither residual *TatA* nor antibody heavy chains can be detected in the supernatant of the stroma depletion assays (Fig. 5C), both reactions have apparently taken place in a quantitative manner. Furthermore, the fact that a cross reacting stromal protein with a molecular weight of approximately 80 kDa, which is recognised by *TatA* antibodies only under denaturing conditions, is detected in comparable amounts in untreated and *TatA*-depleted stromal extracts confirms that these stromal extracts contain equal amounts of proteins, except for *TatA*.

#### *TatA is found in high molecular weight complexes*

Finally, we wanted to examine whether *TatA* is present in monomeric form in the stroma or if it forms complexes of higher molecular weight. Unfortunately, the *TatA* antibody is not strictly monospecific under non-denaturing conditions which prevents specific *TatA* detection upon native gel electrophoresis. In order to circumvent this



**Fig. 6.** 2D analysis of stromal extract from pea

100 µg stromal proteins from pea chloroplasts (equivalent to 15 µg chlorophyll) were separated on a 5-13.5 % Native Tris-Glycine polyacrylamide gradient gel and either stained with Coomassie (*upper panel*) or subjected to electrophoresis on a 10-17.5 % SDS-polyacrylamide gradient gel in the second dimension. The resulting 2D gel was transferred to a PVDF membrane, immunodecorated with polyclonal antibodies raised against TatA and developed with ECL. The positions of proteins from molecular weight standards are indicated on *top* and on the *right side*, respectively. The positions of *TatA* are indicated by *open arrows*.

problem, 2D gel electrophoresis combining Tris-Glycine Native-PAGE in the first dimension (38) with standard SDS-PAGE in the second dimension was performed. Subsequent Western analysis of the resulting 2D gel demonstrates that *TatA*, though present only in minor amounts in the stroma, is found in several distinct complexes of approximately 300, 500 and 880 kDa, respectively (Fig. 6). In contrast, signals in the lower molecular weight ranges cannot be detected. Thus, it appears that *TatA* accumulates in the stroma predominantly in complexes of high molecular weight but is presumably not present in monomeric or oligomeric form.

## Discussion

In the present study, we have examined the involvement of stromal components on *Tat*-dependent protein transport across the thylakoid membrane. We could show that stromal extract improves the thylakoidal transport efficiency (Fig. 1C) and can even reconstitute *Tat*-dependent protein transport of thylakoids that were rendered transport inactive by extraction with NaBr solutions (Figs. 1-3). Our data demonstrate that the component responsible for this effect is soluble *TatA* which is capable of triggering the actual membrane translocation step during *Tat*-dependent protein transport (Fig. 5). Although *TatA* is described as an integral thylakoid membrane component, e.g. (13), it is easily extracted from thylakoid membranes by weak chaotropic salts such as NaBr (Fig. 4). Furthermore, it is present also in the chloroplast stroma, in line with previous reports describing soluble cytoplasmic forms of *TatA* in *Bacillus subtilis*, *Streptomyces lividans*, and *Escherichia coli* (30-33). The fact that also the topology of *TatA* within the membrane is a matter of debate (43,44) suggests that the localisation and/or topology of *TatA* might change during the transport process, possibly depending on its activity status. Loosely anchored *TatA* might thus represent

an interstage between stromal and tightly anchored membrane forms of the protein. Taken together, the presumed role of *TatA* as an obligatory membrane component of the thylakoidal *Tat* machinery is to be scrutinised and the role of stromal factors during *Tat*-dependent transport has to be reconsidered.

### *Stromal TatA is not required for precursor targeting to the thylakoid membrane*

In bacterial systems, soluble forms of *TatA* were proposed to function in targeting of precursor proteins to the membrane bound *Tat* transport machinery (31,33). In chloroplasts, however, a similar targeting function of stromal *TatA* appears unlikely. The early steps of thylakoidal *Tat* transport, i.e. targeting and binding of the precursor protein to the *TatBC* receptor complex, can efficiently take place also in the absence of stromal extract even with NaBr-treated thylakoids which are significantly depleted even of membrane bound *TatA* (Figs. 1B and 4B). Furthermore, an interaction of *Tat* substrate and *TatA* in stromal extract could not be detected upon co-immunoprecipitation experiments (data not shown). Thus, it seems that membrane targeting of precursor proteins by soluble *TatA* is restricted to bacterial *Tat* systems, possibly even to those from Gram-positive bacteria.

### *The potential role of stromal TatA complexes in the translocation process*

Instead, stromal *TatA* is apparently involved in the actual membrane transport step, notably the transition of *Tat* substrates from Ti-1 to Ti-2. If soluble *TatA* is added to thylakoids having precursor protein in Ti-1 conformation bound to the *TatBC* receptor complex, membrane translocation of the mature part is initiated and both, Ti-2 and mature protein, can be detected (Figs. 1B and 4B). It is widely assumed that a hydrophilic pore (or channel) composed predominantly or exclusively of *TatA* is required for this transport step (41) and it was even suggested that pore complexes of

different sizes exist as preformed units within the membrane (45). Considering the various TatA complexes of high molecular weight present in the stroma (Fig. 6), one could therefore speculate that those might represent such pore complexes, in analogy to the detergent-solubilised TatA complexes described for bacteria (45). However, the following considerations argue against such a scenario: in contrast to detergent-solubilised TatA complexes which can expose their membrane anchors to the hydrophobic parts of the detergent molecules, the N-terminal hydrophobic regions of stromal TatA must somehow be shielded against the hydrophilic stroma to prevent precipitation of the protein. It appears likely that such shielding is facilitated by orienting the hydrophobic regions of several TatA molecules to each other resulting in TatA complexes of high molecular weight which expose only their hydrophilic domains to the aqueous solution, in line with the soluble micelle-like TatA complexes that were described for TatA in *B. subtilis* (32). Alternatively, the stromal TatA complexes might also be related to the polymeric tubular TatA structures that were recently found in the cytoplasm of *E. coli* (30), although such structures appear less likely in the stroma considering the distinct sizes of the stromal TatA complexes (Fig. 6). Anyhow, in both scenarios the stromal TatA complexes would have to be significantly restructured upon integration into the thylakoid membrane, in order to provide the hydrophilic environment of a gated pore for the protein to be translocated, which strongly argues against their function as preformed pore complexes. Instead, a kind of reservoir or storage function of yet unused TatA molecules appears more likely.

However, there is even a more plausible explanation for the function of the stromal TatA complexes. Assuming that TatA indeed accumulates in the stroma similar to detergent molecules in micelle-like structures, these TatA micelles presumably share also the membrane interacting properties of detergents, i.e. they should be able to reversibly insert and de-insert into lipid bilayers. Such spontaneous insertion of thylakoidal TatA into lipid bilayers has previously been described (35). Together with the remarkable stoichiometric variability of the Tat subunits in different systems which can vary from excess to substoichiometric amounts of TatA vs. TatB and TatC<sup>2</sup>, these findings rather favour a model in which TatA mediates Tat-dependent protein translocation by a not yet further defined "membrane weakening" mechanism (46)

## References

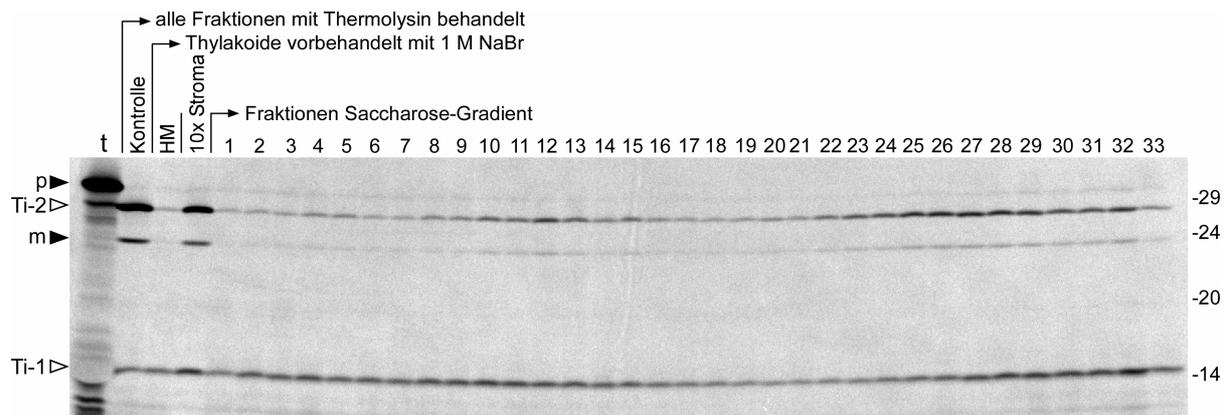
- Müller, M., and Klösgen, R. B. (2005) *Mol Membr Biol* **22**(1-2), 113-121
- Chaddock, A. M., Mant, A., Karnauchov, I., Brink, S., Herrmann, R. G., Klösgen, R. B., and Robinson, C. (1995) *Embo J* **14**(12), 2715-2722
- Clark, S. A., and Theg, S. M. (1997) *Mol Biol Cell* **8**(5), 923-934
- Hynds, P. J., Robinson, D., and Robinson, C. (1998) *J Biol Chem* **273**(52), 34868-34874
- Marques, J. P., Dudeck, I., and Klösgen, R. B. (2003) *Mol Genet Genomics* **269**(3), 381-387
- Marques, J. P., Schattat, M. H., Hause, G., Dudeck, I., and Klösgen, R. B. (2004) *J Exp Bot* **55**(403), 1697-1706
- Santini, C. L., Ize, B., Chanal, A., Müller, M., Giordano, G., and Wu, L. F. (1998) *Embo J* **17**(1), 101-112
- Sargent, F., Bogsch, E. G., Stanley, N. R., Wexler, M., Robinson, C., Berks, B. C., and Palmer, T. (1998) *Embo J* **17**(13), 3640-3650
- Richter, S., Lindenstrauss, U., Lücke, C., Bayliss, R., and Brüser, T. (2007) *J Biol Chem* **282**(46), 33257-33264
- Bageshwar, U. K., and Musser, S. M. (2007) *J Cell Biol* **179**(1), 87-99
- Braun, N. A., Davis, A. W., and Theg, S. M. (2007) *Biophys J* **93**(6), 1993-1998
- Mori, H., Summer, E. J., and Cline, K. (2001) *FEBS Lett* **501**(1), 65-68
- Mori, H., Summer, E. J., Ma, X., and Cline, K. (1999) *J Cell Biol* **146**(1), 45-56
- Motohashi, R., Nagata, N., Ito, T., Takahashi, S., Hobo, T., Yoshida, S., and Shinozaki, K. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(18), 10499-10504
- Settles, A. M., Yonetani, A., Baron, A., Bush, D. R., Cline, K., and Martienssen, R. (1997) *Science* **278**(5342), 1467-1470
- Walker, M. B., Roy, L. M., Coleman, E., Voelker, R., and Barkan, A. (1999) *J Cell Biol* **147**(2), 267-276
- Hou, B., Frielingsdorf, S., and Klösgen, R. B. (2006) *J Mol Biol* **355**(5), 957-967
- Shanmugham, A., Wong Fong Sang, H. W., Bollen, Y. J., and Lill, H. (2006) *Biochemistry* **45**(7), 2243-2249
- Mori, H., and Cline, K. (2002) *J Cell Biol* **157**(2), 205-210
- Richter, S., and Brüser, T. (2005) *J Biol Chem* **280**(52), 42723-42730
- Berghöfer, J., and Klösgen, R. B. (1999) *FEBS Lett* **460**(2), 328-332
- Alami, M., Lüke, I., Deitermann, S., Eisner, G., Koch, H. G., Brunner, J., and Müller, M. (2003) *Mol Cell* **12**(4), 937-946
- Frielingsdorf, S., and Klösgen, R. B. (2007) *J Biol Chem* **282**(33), 24455-24462
- Mould, R. M., Shackleton, J. B., and Robinson, C. (1991) *J Biol Chem* **266**(26), 17286-17289

25. Molik, S., Karnauchov, I., Weidlich, C., Herrmann, R. G., and Klösgen, R. B. (2001) *J Biol Chem* **276**(46), 42761-42766
26. Graubner, W., Schierhorn, A., and Brüser, T. (2007) *J Biol Chem* **282**(10), 7116-7124
27. Maillard, J., Spronk, C. A., Buchanan, G., Lyall, V., Richardson, D. J., Palmer, T., Vuister, G. W., and Sargent, F. (2007) *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(40), 15641-15646
28. Pérez-Rodríguez, R., Fisher, A. C., Perlmutter, J. D., Hicks, M. G., Chanal, A., Santini, C. L., Wu, L. F., Palmer, T., and DeLisa, M. P. (2007) *J Mol Biol* **367**(3), 715-730
29. Schubert, T., Lenz, O., Krause, E., Volkmer, R., and Friedrich, B. (2007) *Mol Microbiol* **66**(2), 453-467
30. Berthelmann, F., Mehner, D., Richter, S., Lindenstrauß, U., Lünsdorf, H., Hause, G., and Brüser, T. (2008) *J Biol Chem* **doi:10.1074/jbc.M707757200**
31. Pop, O. I., Westermann, M., Volkmer-Engert, R., Schulz, D., Lemke, C., Schreiber, S., Gerlach, R., Wetzker, R., and Müller, J. P. (2003) *J Biol Chem* **278**(40), 38428-38436
32. Westermann, M., Pop, O. I., Gerlach, R., Appel, T. R., Schlörmann, W., Schreiber, S., and Müller, J. P. (2006) *Biochim Biophys Acta* **1758**(4), 443-451
33. De Keersmaecker, S., Van Mellaert, L., Schaerlaekens, K., Van Dessel, W., Vrancken, K., Lammertyn, E., Anné, J., and Geukens, N. (2005) *FEBS Lett* **579**(3), 797-802
34. Karnauchov, I., Herrmann, R. G., and Klösgen, R. B. (1997) *FEBS Lett* **408**(2), 206-210
35. Fincher, V., Dabney-Smith, C., and Cline, K. (2003) *Eur J Biochem* **270**(24), 4930-4941
36. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**(5259), 680-685
37. Schägger, H., and von Jagow, G. (1991) *Anal Biochem* **199**(2), 223-231
38. Davis, B. J. (1964) *Ann N Y Acad Sci* **121**, 404-427
39. Vachereau, A. (1989) *Anal Biochem* **179**(1), 206-208
40. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2 Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
41. Sargent, F. (2007) *Biochem Soc Trans* **35**(Pt 5), 835-847
42. Netzer, W. J., and Hartl, F. U. (1998) *Trends Biochem Sci* **23**(2), 68-73
43. Chan, C. S., Zlomislic, M. R., Tieleman, D. P., and Turner, R. J. (2007) *Biochemistry* **46**(25), 7396-7404
44. Gouffi, K., Gérard, F., Santini, C. L., and Wu, L. F. (2004) *J Biol Chem* **279**(12), 11608-11615
45. Gohlke, U., Pullan, L., McDevitt, C. A., Porcelli, I., de Leeuw, E., Palmer, T., Saibil, H. R., and Berks, B. C. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(30), 10482-10486
46. Natale, P., Brüser, T., and Driessen, A. J. (2007) *Biochim Biophys Acta* **doi:10.1016/j.bbamem.2007.07.015**

### 2.3.3 Ergänzende Ergebnisse

#### 2.3.3.1 Fraktionierung des stromalen Extrakts über Dichtegradientenzentrifugation

Zur genaueren Untersuchung der Zusammensetzung und der Eigenschaften der beschriebenen hochmolekularen TatA-Komplexe wäre es nötig diese von den zahlreichen anderen im Stroma vorliegenden Proteinkomplexen abzutrennen. Um im Anschluss einer solchen Trennung noch funktionelle Analysen der Proteinkomplexe durchführen zu können, muss die Fraktionierung unter nativen Bedingungen durchgeführt werden und die Trennmethode muss kompatibel zu hohen Proteinkonzentrationen und -mengen sein. Diese Bedingungen erfüllt z.B. die Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation, die Proteine und Proteinkomplexe anhand ihres Molekulargewichts trennt. 10-fach konzentrierter stromaler Extrakt wurde daher auf einen 0,5-20 % Saccharose-Gradienten in HM-Puffer geschichtet und für 14 h bei 96500 x g (27000 rpm, Rotor SW 28 Beckman) und 4 °C zentrifugiert. Es ist anzumerken, dass die Anfangskonzentration von 0,5 % Saccharose des Gradienten nicht optimal gewählt wurde, da durch die hohe Konzentration des stromalen Extrakts dieser beim Schichten auf den Gradienten in diesen einsinkt. Für weitere Experimente wäre eine Anfangskonzentration von ca. 2 % Saccharose zu empfehlen, um ein verwirbelungsfreies Schichten auf den Gradienten zu ermöglichen. Anschließend wurde der Gradient in 33 Fraktionen aufgeteilt, wobei die erste Fraktion der größten und die letzte Fraktion der geringsten Dichte entspricht. Die gewonnenen Fraktionen wurden mittels Vivaspin 500 Ultrafiltrationseinheiten einerseits von der Saccharose befreit und andererseits auf die ungefähre Ausgangskonzentration (10-fach) aufkonzentriert. Anschließend wurde getestet ob die einzelnen Fraktionen in der Lage sind die Transportaktivität von NaBr-behandelten Thylakoiden wiederherzustellen (Abb. 13).



**Abb. 13: Aktivitätstest von Stroma-Fraktionen.**

Thylakoide wurden mit 1 M NaBr vorbehandelt (Karnauchov *et al.*, 1997), anschließend in HM-Puffer (HM), 10-fach konzentriertem stromalem Extrakt (10x Stroma) oder in Fraktionen von stromalem Extrakt, der über einen Saccharose-Gradienten aufgetrennt wurde (1-33) resuspendiert und zu *in thylakoido* Transportexperimenten eingesetzt. Als *Kontrolle* wurden unbehandelte Thylakoide eingesetzt. Aufgrund der großen Anzahl an Fraktionen wurden nur mit Thermolysin behandelte Proben geladen. Für weitere Details siehe Legende zu Abb. 8.

Anhand der Signalintensitäten von Ti-2 und reifem Protein ist zu erkennen, dass die einzelnen Fraktionen die Transportaktivität der NaBr-vorbehandelten Thylakoide mit unterschiedlicher Effizienz wiederherstellen. Dabei sind drei Maxima in den Bereichen der Fraktionen 4-5, 10-15 und 24-32 zu erkennen, wobei das erste Maximum eine sehr geringe Intensität aufweist. In den genannten Fraktionen befinden sich demnach die gesuchten TatA-Komplexe, die offensichtlich in aktiver Form aufgereinigt werden können. Es handelt sich bei diesem Experiment allerdings um einen vorläufigen Versuch, dessen Ergebnis noch weiter verifiziert werden müsste. Des Weiteren wurde hier auch kein Molekulargewichts-Standard mitgeführt, weshalb auch keine Zuordnung zu den TatA-Komplexen, die über die 2D-Gelelektrophorese detektiert wurden, möglich ist. Interessanterweise ändern sich aber nicht nur die Intensitäten von Ti-2 und reifem Protein sondern auch die von Ti-1. Im Bereich der Fraktionen 18-21 sinkt die Menge an Ti-1 deutlich ab was darauf hinweist, dass in diesen Fraktionen offensichtlich eine Komponente enthalten ist, die die Bindung des Vorläuferproteins an die Thylakoidmembran verhindert. Dafür kämen beispielsweise Chaperone in Frage, die an das Signalpeptid des Vorläuferproteins binden (Sargent, 2007) und somit dessen spontane Insertion in die Membran verhindern. Auch diesem Phänomen könnte in zukünftigen Arbeiten nachgegangen werden.

## 2.4 Voraussetzungen für die finale Prozessierung von thylakoidären Tat-Substraten

### 2.4.1 Zusammenfassung

Im letzten Teil der Arbeit ging es zunächst darum herauszufinden, warum das 16/23-Protein im Vergleich zu den authentischen Vorläuferproteinen, aus denen es zusammengesetzt ist, so langsam transportiert wird. Dabei fiel zunächst auf, dass bei niedriger Reaktionstemperatur authentische Vorläuferproteine zwar mit verringerter Effizienz transportiert werden, prinzipiell der Transportprozess aber vollständig abläuft, ohne dass zusätzlich Translokationsintermediate oder Ähnliches auftreten. Dagegen bleibt das 16/23-Protein unter diesen Bedingungen auf der Stufe des Ti-2 stehen was darauf hindeutet, dass insbesondere die finale Prozessierung bei diesem Protein gestört sein könnte. Zusätzlich stellt der Bereich der TPP-Prozessierungsstelle die Region dar, an der das 16/23-Protein fusioniert wurde, weshalb es sich hier maßgeblich von den authentischen Vorläuferproteinen unterscheidet. Die TPP-Prozessierungsstelle des 16/23-Proteins wurde daher zunächst genauer analysiert. Es stellte sich heraus, dass die Hydrophobizität dieser Region im 16/23-Protein erhöht ist. Dies ist darauf zurückzuführen, dass geladene Aminosäuren, die sich in den Bereichen der Prozessierungsstellen der authentischen Vorläufer befinden, durch die neue Kombination im 16/23-Protein eliminiert wurden. Ein Vergleich der Regionen der TPP-Prozessierungsstelle von weiteren bekannten Tat-Substraten ergab, dass auch hier in den meisten Fällen geladene oder zumindest polare Aminosäurereste zu finden sind.

Daraufhin wurden Punktmutationen in das authentische 16 kDa sowie das 23 kDa Vorläuferprotein eingeführt, welche die Hydrophobizität in Analogie zum 16/23-Protein erhöhen. Wurden die veränderten Proteine im direkten Vergleich zu ihren unveränderten Ausgangsproteinen in Transportexperimenten eingesetzt, zeigte sich, dass sie langsamer transportiert werden. Zudem traten nach Proteasebehandlung zusätzliche Banden auf, die dem für Ti-2 spezifischen Degradationsprodukt entsprechen. Die Prozessierung der authentischen Vorläuferproteine kann also durch Einbringen gezielter Mutationen im Bereich der TPP-Prozessierungsstelle derart verlangsamt werden, dass auch hier ein Translokationsintermediat zu detektieren ist.

Die gewonnenen Daten deuteten darauf hin, dass Ladungen oder zumindest polare Aminosäurereste im Bereich der TPP-Prozessierungsstelle vorhanden sein müssen, damit eine effiziente Prozessierung gewährleistet ist. Um dies weiter zu untersuchen, wurde ein zu den vorherigen Experimenten reziproker Ansatz gewählt. Das Ziel dabei war die Prozessierung

des 16/23-Proteins, durch einführen einer geladenen Aminosäure in den Bereich der TPP-Prozessierungsstelle, wieder schneller zu machen. Die veränderte Variante des 16/23-Proteins wurde wie zuvor im direkten Vergleich zum Ausgangsprotein in Transportexperimenten eingesetzt. Diese zeigten, dass die eingeführte Ladung tatsächlich die Prozessierung zum reifen Protein beschleunigt, das für Ti-2 spezifische Degradationsprodukt ist aber noch immer zu detektieren. Dessen Menge ist allerdings insgesamt geringer und nimmt auch zu früheren Zeitpunkten wieder ab, was auch für eine beschleunigte Prozessierung spricht. Andererseits bedeutet dies, dass im Fall des 16/23-Proteins neben der fehlenden Ladung offensichtlich noch ein weiteres Merkmal eine effiziente Prozessierung verhindert. Interessant ist aber auch, dass die eingeführte Ladung dazu führt, dass das Vorläuferprotein kaum noch im Ti-1 Stadium akkumuliert. Das weist darauf hin, dass Ti-1 nur dann akkumuliert, wenn Ti-2 nicht schnell genug zum reifen Protein umgesetzt werden kann. Die Einführung der Mutation in das 16/23-Protein weist also auch darauf hin, dass die finale Prozessierung von Vorläuferproteinen durch die TPP auf polare oder geladene Aminosäurereste in der Region der TPP-Prozessierungsstelle angewiesen ist.

Aufgrund der Beobachtung, dass das Fehlen von Ladungen im Bereich der TPP-Prozessierungsstelle zur Akkumulation von Ti-2 führt, stellte sich abschließend die Frage, ob diese bitopen Translokationsintermediate frei in der Membran vorliegen oder ob sie an Komplexe gebunden sind. Im Fall des 16/23-Proteins ist sowohl Ti-1 als auch Ti-2 in Assoziation mit dem TatBC-Rezeptorkomplex zu finden (Hou, 2004). Die oben genannten veränderten Proteine wurden dementsprechend auf eine mögliche Bindung an den TatBC-Komplex getestet. Dabei fiel auf, dass die authentischen Vorläuferproteine nach Erhöhung der Hydrophobizität im Bereich der TPP-Prozessierungsstelle auch wie das 16/23-Protein eine Assoziation an den TatBC-Komplex zeigen. Interessanterweise ist dagegen das 16/23-Protein nachdem eine Ladung in den Bereich der TPP-Prozessierungsstelle eingeführt wurde nicht mehr in Assoziation mit dem TatBC-Komplex zu finden, obwohl es noch Ti-2 ausbildet. Daraus ist zu schließen, dass die Erhöhung der Hydrophobizität im Bereich der TPP-Prozessierungsstelle dazu führt, dass das Vorläuferprotein länger am TatBC-Rezeptorkomplex assoziiert bleibt. Vermutlich führt diese verlängerte Assoziation dazu, dass die Prozessierung durch die TPP verhindert wird. Das würde bedeuten, dass ein Vorläuferprotein nicht durch die TPP prozessiert werden kann, solange es am TatBC-Komplex gebunden ist. Unterstützt wird diese Schlussfolgerung durch das veränderte 16/23-Protein. Dieses akkumuliert auf der Stufe des Ti-2, wobei es aber nicht am TatBC-Komplex gebunden ist. Ti-2 liegt also in diesem Fall frei in der Membran vor und wird auch prozessiert. Daraus wurde geschlossen, dass

vermutlich die Entlassung des Vorläuferproteins auf der Stufe des Ti-2 vom TatBC-Komplex in die Membran eine Voraussetzung für die finale Prozessierung durch die TPP darstellt.

#### **2.4.2 Artikel**

# Prerequisites for Terminal Processing of Thylakoidal Tat Substrates\*

Received for publication, March 27, 2007, and in revised form, June 19, 2007. Published, JBC Papers in Press, June 19, 2007, DOI 10.1074/jbc.M702630200

Stefan Frielingsdorf and Ralf Bernd Klösigen<sup>1</sup>

From the Institute of Biology-Plant Physiology, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Weinbergweg 10, 06120 Halle (Saale), Germany

In bacteria and chloroplasts, the Tat (twin arginine translocation) system is capable of translocating folded passenger proteins across the cytoplasmic and thylakoidal membranes, respectively. Transport depends on signal peptides that are characterized by a twin pair of arginine residues. The signal peptides are generally removed after transport by specific processing peptidases, namely the leader peptidase and the thylakoidal processing peptidase. To gain insight into the prerequisites for such signal peptide removal, we mutagenized the vicinity of thylakoidal processing peptidase cleavage sites in several thylakoidal Tat substrates. Analysis of these mutants in thylakoid transport experiments showed that the amino acid composition of both the C-terminal segment of the signal peptide and the N-terminal part of the mature protein plays an important role in the maturation process. Efficient removal of the signal peptide requires the presence of charged or polar residues within at least one of those regions, whereas increased hydrophobicity impairs the process. The relative extent of this effect varies to some degree depending on the nature of the precursor protein. Unprocessed transport intermediates with fully translocated passenger proteins are found in membrane complexes of high molecular mass, which presumably represent Tat complexes, as well as free in the lipid bilayer. This seems to indicate that the Tat substrates can be laterally released from the complexes prior to processing and that membrane transport and terminal processing of Tat substrates are independent processes.

The biogenesis of many proteins involves their transport across membranes. Such transport is mediated by specific targeting signals present in the primary translation products that are generally removed after transport by specific processing peptidases. Targeting signals operating at the cytoplasmic membrane of bacteria and at the thylakoid membrane of chloroplasts mostly belong to a group of structurally conserved signal peptides that are characterized by an N-terminal basic region, a hydrophobic central core, and a polar C-terminal region ending with the consensus Ala-X-Ala motif at the terminal processing site (1). These signal peptides are removed after

transport by membrane-bound peptidases termed leader peptidase or thylakoidal processing peptidase (TPP),<sup>2</sup> respectively (2, 3).

In both bacteria and chloroplasts, one class of signal peptides that is characterized by a twin pair of arginine residues in the N-terminal region (4, 5) specifically mediates protein transport by the so-called Tat (twin arginine translocation) pathway (6). The most remarkable feature of this protein transport pathway is its property to translocate folded passenger proteins across the membrane (7–11), and it is even a matter of debate whether folding of the passenger protein is a prerequisite for Tat-dependent transport (8, 12, 13). Mechanistically, protein transport by the Tat pathway is initiated by the direct insertion of the transport substrate into the target membrane (14, 15), followed by its interaction with the oligomeric Tat B/C receptor complex (13, 16), which in thylakoids has an apparent size of ~560–700 kDa (16–18). Subsequent membrane translocation of the passenger protein depends on the TatA component of the Tat transport apparatus (18, 19). The final step in the translocation process is the removal of the signal peptide. In thylakoids, such processing is performed by the thylakoidal processing peptidase TPP (20). The analysis of a chimeric substrate showing both slower transport kinetics and delayed processing by TPP suggested an influence of this processing step on the kinetics of membrane transport (17). On the other hand, removal of the signal is not obligatory for Tat-dependent thylakoid transport, as indicated by the Rieske Fe/S protein, which carries an uncleaved Tat-specific membrane anchor signal at the N terminus of the mature polypeptide chain (21).

To examine the processing step following Tat-dependent protein transport in more detail, we have analyzed mutant derivatives of both authentic and chimeric Tat substrates with thylakoid transport experiments. It was our goal to identify structural features within precursor proteins that are responsible for the efficiency and velocity of the maturation of thylakoidal Tat substrates.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

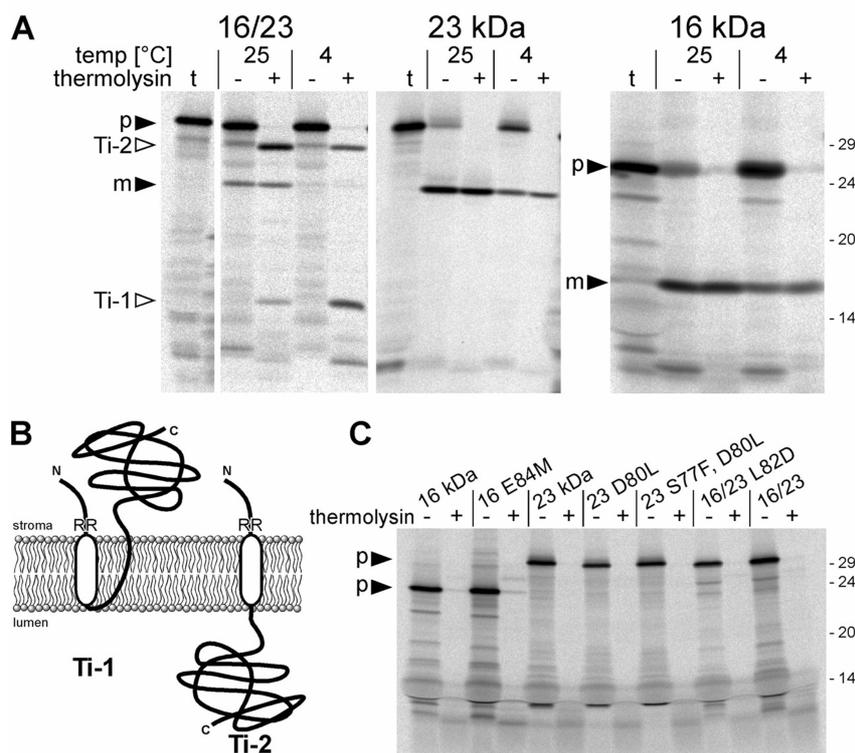
**Site-directed Mutagenesis**—Mutageneses were carried out using the Stratagene QuikChange® site-directed mutagenesis kit and confirmed by DNA sequencing. The following primers were used: (a) 16 V137M, 5'-gcagcccaagagcaaaatgtccgctctgaaatcc-3' and 5'-ggattcagaggcggacattttgctcttgggctgc-3'; (b) 16 E84M, 5'-ggctgttctgctatggccagcccatcggtg-3' and

\* This work was supported by grants from the state Sachsen-Anhalt (Exzellenzcluster Biowissenschaften) and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Sonderforschungsbereich 648). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed. Tel.: 49-345-55-26-200; Fax: 49-345-55-27-285; E-mail: klosigen@pflanzenphys.uni-halle.de.

<sup>2</sup> The abbreviations used are: TPP, thylakoidal processing peptidase; Tat, twin arginine translocation; Ti-1/Ti-2, translocation intermediate 1/2.

## Terminal Processing of Tat Substrates



**FIGURE 1. Temperature dependence of Tat-dependent protein transport.** *A*, the precursor proteins 16 kDa, 23 kDa, and 16/23 were obtained by *in vitro* transcription/translation and incubated with isolated pea thylakoids for 15 min in the light at either 25 or 4 °C. After the import reaction, the thylakoids were washed with HM (10 mM HEPES/KOH, pH 8.0, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) buffer and either treated with thermolysin (200 μg/ml, 30 min on ice, lanes +), or mock-treated (lanes -). Stoichiometric amounts of each fraction corresponding to 15 μg of chlorophyll were separated on 10–17.5% SDS-polyacrylamide gradient gels and visualized by phosphorimaging. In lanes *t*, 1 μl of the *in vitro* translation assay was loaded. The positions of the precursor (*p*) and mature protein (*m*) are indicated by filled arrowheads; open arrowheads point to the positions of the two integral translocation intermediates, Ti-1 and Ti-2. *B*, schematic representation of the topology of Ti-1 and Ti-2 during the transport process. The open ellipsoid indicates the hydrophobic central core within the thylakoid-targeting signal peptide, and RR points to the position of the twin arginine motif. Ti-1 and Ti-2 represent the early and late translocation intermediates, respectively, that are observed during thylakoid membrane transport of the chimeric 16/23 protein. *C*, authentic and mutant precursors obtained by *in vitro* transcription/translation were subjected to thermolysin treatment or mock-treated, as described in panel *A* but in the absence of thylakoid vesicles.

5'-caacgatggcctggccatgcaagaacagcc-3'; (c) 23 D80L, 5'-ggttcccctgacttgagcctatggagaagc-3' and 5'-gcttctccataggctgcaagtgaggggaaacc-3'; (d) 23 S77F, D80L, 5'-gttgctctaaggtttccctgcaacttgagcctatggag-3' and 5'-ctccataggtgcaagtgaggggaaacctagagccaac-3'; (e) 16/23 L82D, 5'-cgtttgttaaggctgttgatgccgcatatggagaagc-3' and 5'-gcttctccatgctggcatcaacagccttaacaaacg-3'.

The 16 kDa precursor was furthermore modified by replacing a poorly conserved valine residue in the mature part of the 16 kDa protein (Val<sup>137</sup>) by methionine in order to permit labeling of the protein with [<sup>35</sup>S]methionine. This mutation did not show any influence on the entire transport process.

**Sequence Analysis**—Analysis of the TPP cleavage regions was performed with the following thylakoidal Tat substrates (22–24): OEC 16 kDa subunit (P12301), OEC 23 kDa subunit (P16059), PSI-N (P49107), HCF136 (O82660), polyphenol oxidase A (Q08303), PSII-T (Q39195), thylakoid lumenal 16.5 kDa protein (O22773), FtsH-like protein Pftf (AAD17230), protein of unknown function (AU070407), protease Do-like 8 (Q9LU10),

FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 3 (Q9SCY2), protease Do-like 5 (Q9SEL7), hypothetical protein (Q9LXX5), unknown thylakoid lumen protein (Q9S720), probable FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 2 (O22870), protein similar to ascorbate peroxidase (AI490846), predicted protein of unknown function (AAC78263), unknown protein (AW201127), putative L-ascorbate peroxidase 4 (P82281), peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (Q9LYR5), peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (Q9M222), probable FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 1 (Q9LM71).

**Protein Transport Experiments**—Isolation of chloroplasts and thylakoids was carried out as described (14). Protein transport experiments with radiolabeled precursor proteins followed published protocols (25).

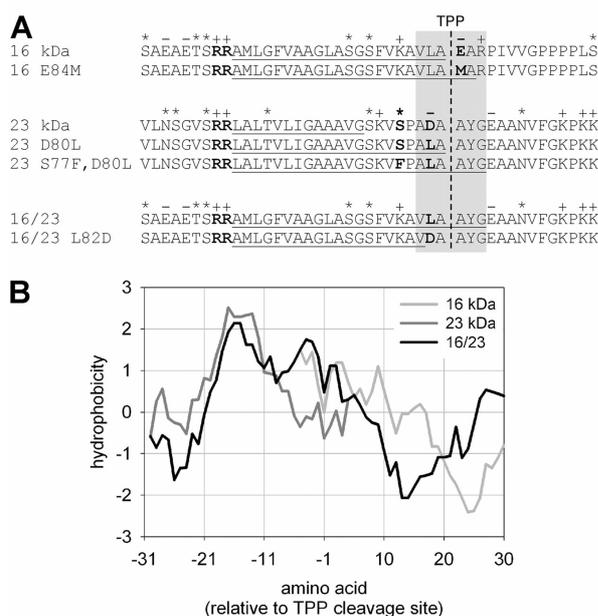
**Miscellaneous**—Gel electrophoresis of proteins under denaturing conditions was carried out according to Ref. 26. Blue Native gel electrophoresis (27) was carried out according to Ref. 17. The gels were exposed to phosphorimaging screens and analyzed with the Fujifilm FLA-3000 (Fujifilm, Düsseldorf, Germany) using the software packages BASReader (version 3.14) and AIDA (version 3.25) (Raytest, Straubenhardt, Germany). Hydrophobicity plots were generated according to Ref. 28. All

of the other methods followed published protocols (29).

## RESULTS

**Terminal Processing of the 16/23 Precursor Is Inhibited at Low Temperature**—The analysis of the transit peptide of the 16 kDa subunit and the mature part of the 23 kDa subunit, both of the oxygen-evolving system associated with Photosystem II, has led to the identification of distinct transport steps during Tat-dependent protein transport across the thylakoid membrane (14, 17). This was facilitated by the retarded translocation of the chimeric precursor protein that led to the detection of two consecutive translocation intermediates that were termed Ti-1 and Ti-2, respectively (Fig. 1, *A* and *B*). The degradation products indicative for Ti-1 and Ti-2 cannot be detected upon protease treatment in the absence of thylakoid vesicles, demonstrating that they indeed represent translocation intermediates and not merely protease-resistant domains of the precursor protein (Fig. 1*C*). The accumulation of Ti-2 that assumes a bitopic

## Terminal Processing of Tat Substrates



**FIGURE 2. Amino acid sequence of TPP cleavage sites.** *A*, the amino acid sequences flanking the TPP cleavage sites of the proteins used in this study are shown. The RR motif as well as the residues that were mutagenized are typed in **bold**. Charged residues (-/+ ) and polar amino acids (\*) are labeled on top, hydrophobic regions are underlined, and the TPP cleavage sites are denoted by a dashed line. The region from -3 to +3 is shaded. *B*, hydrophobicity plots of the 16/23 protein and authentic precursors generated according to Ref. 28.

transmembrane topology with fully translocated passenger protein (Fig. 1*B*) indicates that for the 16/23 protein not only the actual membrane translocation process but also the terminal maturation step, *i.e.* the removal of the signal peptide, is affected. This finding was unexpected, because the amino acid sequences of both the signal peptide and the mature part of the chimera match perfectly to their counterparts in the respective authentic Tat substrates, notably the precursors of the 16 and 23 kDa subunits of the oxygen-evolving system of spinach (Fig. 2) that are quantitatively processed to the mature proteins in the course of thylakoid transport experiments (Fig. 1*A*).

Processing of the 16/23 protein by TPP is not abolished but only impaired, because significant amounts of mature 23 kDa protein accumulate with time in standard transport experiments performed at 25 °C (Fig. 1*A* and Ref. 17). However, if thylakoid transport is carried out at 4 °C, only minute amounts of mature 23 kDa protein can be detected (Fig. 1*A*). One reason is that the membrane translocation process is affected at such temperatures, leading to reduced amounts of Ti-2 and higher levels of Ti-1 in these assays. Yet the decrease in Ti-2 accumulation is not sufficiently pronounced that it alone could fully account for the almost complete lack of mature protein, demonstrating that also the terminal processing step is significantly inhibited under these conditions.

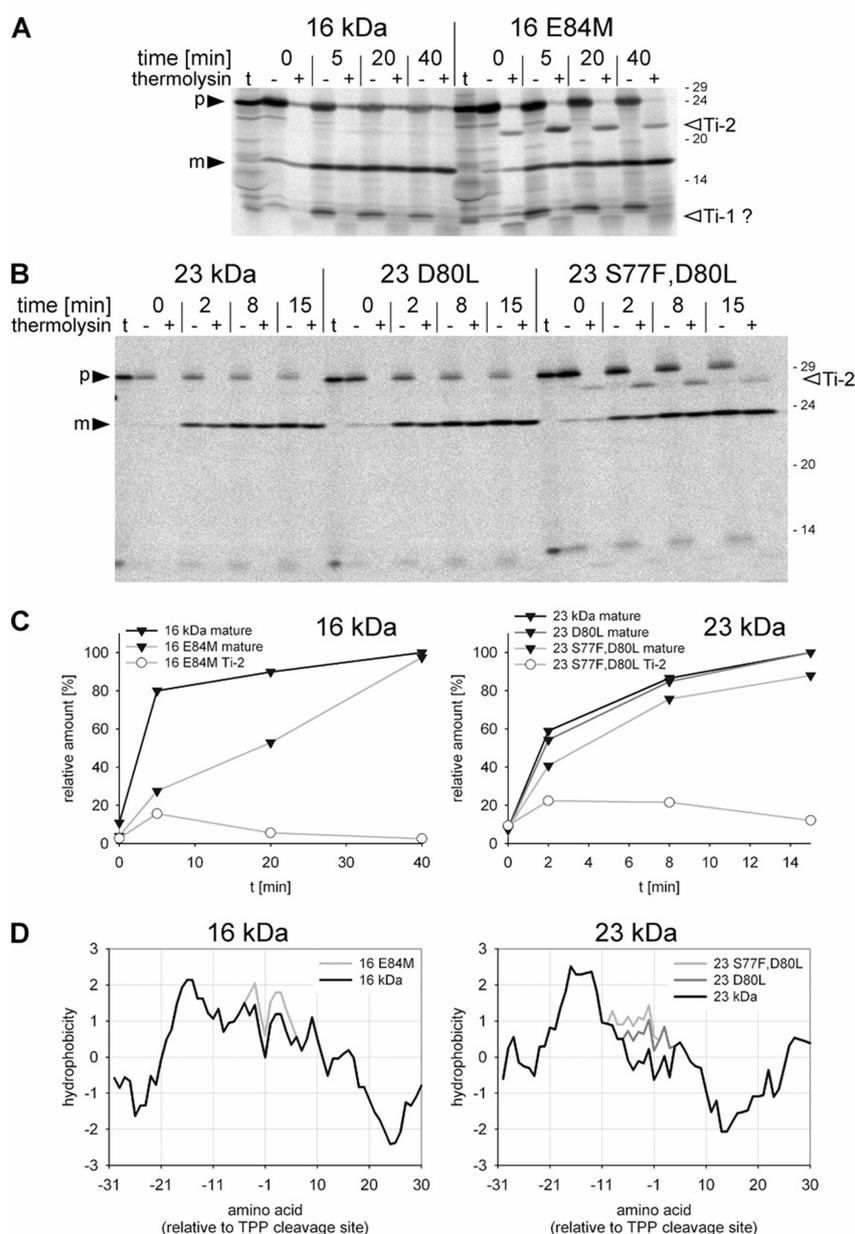
To distinguish whether the observed inhibition of processing at 4 °C is due to reduced TPP activity at low temperature or is instead a consequence of altered substrate properties caused by the chimeric cleavage site in the 16/23 precursor, the authentic

precursors of the 16 and 23 kDa subunits of the oxygen-evolving system were analogously analyzed. As expected, membrane translocation of the two proteins is significantly affected at 4 °C, leading to reduced levels of mature protein in both instances (Fig. 1*A*). This demonstrates reduced translocase activity at low temperature that might be due to a specific demand for lipid fluidity of protein transport by the Tat pathway, in line with recent results concerning protein transport across thylakoid membranes with reduced levels of unsaturated lipids (30). Yet, terminal processing of the two authentic precursor proteins is not impaired at low temperatures, because bitopic translocation intermediates corresponding to Ti-2 cannot be detected for either of them. Instead, both proteins are quantitatively cleaved by the processing enzyme even if thylakoid transport is performed at 4 °C, which strongly suggests that TPP activity is not rate-limiting at such temperatures. The delayed maturation of the 16/23 chimera is hence presumably a consequence of the chimeric processing site.

*The 16/23 Precursor Lacks Polar Residues in the Vicinity of the TPP Cleavage Site*—To get a first hint on the possible reason for the impaired maturation of the 16/23 chimera, the amino acid sequences in the vicinity of the TPP cleavage sites of known thylakoidal Tat substrates were compared. Remarkably, from 22 independent thylakoidal Tat substrates analyzed, 21 possess either charged (15) or at least polar (6) residues within the region from -3 to +3 of the terminal processing site (data not shown), suggesting that the level of polarity in this region plays a role in the cleavage process. The charged or polar residues can be provided either by the C-terminal region of the signal peptide, as in the precursor of the 23 kDa protein, or by the N-terminal segment of the mature polypeptide, as found for example in the 16 kDa protein (Fig. 2*A*). In contrast, the corresponding segment of the 16/23 chimera lacks any such residue due to the combination of the 16 kDa signal peptide comprising a non-polar C terminus and the mature 23 kDa protein, which possesses an uncharged N terminus (Fig. 2*A*). Consequently, the TPP cleavage site of the 16/23 chimera is more hydrophobic than those of the corresponding authentic precursor proteins (Fig. 2*B*).

*Removal of Polar Residues from the Terminal Processing Sites Affects Maturation of Authentic Tat Substrates*—To examine whether a polar cleavage region is required for the terminal processing step, the charged residues flanking the TPP cleavage sites of the authentic 16 and 23 kDa precursor proteins were removed by site-directed mutagenesis. Analysis of the resulting polypeptides (16 E84M and 23 D80L, respectively, Fig. 2) in time course experiments showed that indeed one of them, notably 16 E84M, exhibits transport characteristics resembling those of the 16/23 chimera. It binds efficiently as the precursor protein to the thylakoid vesicles but it is only slowly converted to the mature 16 kDa protein, as indicated by the transient accumulation of a proteolytic fragment of ~22 kDa upon thermolysin treatment of the thylakoid vesicles after import (Fig. 3, *A* and *C*). Both the size and the kinetic features of this proteolytic fragment suggest that it corresponds to the bitopic translocation intermediate Ti-2 described for the 16/23 chimera (Fig. 1 and Ref. 17). Furthermore, a second degradation product of ~8 kDa

## Terminal Processing of Tat Substrates



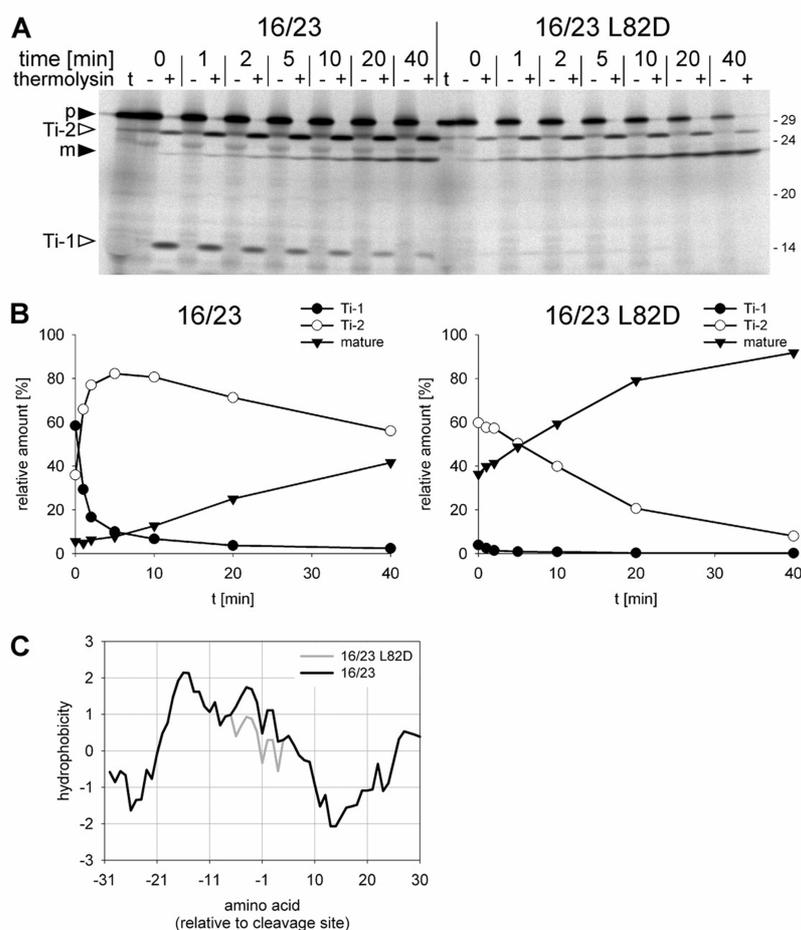
**FIGURE 3. Increased hydrophobicity in the TPP cleavage region leads to delayed processing.** *A*, in *thylakoido* time course experiments performed with the authentic 16-kDa precursor and its mutant derivative 16 E84M. The incubation time at 25 °C in the light is given on top of the lanes. *B*, in *thylakoido* time course experiments performed with the authentic 23-kDa precursor protein and its mutant derivatives 23 D80L and 23 S77F,D80L. *C*, quantification of the amounts of Ti-2 and mature protein, respectively, from the import reactions shown in panels *A* and *B*. For each time point, the relative amounts of Ti-2 and mature protein (in terms of percentage of the sum of these products at the final time point) were calculated taking into account the number of [<sup>35</sup>S]methionine residues in each protein species. *D*, hydrophobicity plots of the authentic and mutant precursors, generated according to Ref. 28. For further details, see the legend to Fig. 1.

can be detected in protease-treated thylakoids at early time points of the transport process (Fig. 3*A*). It might represent a translocation intermediate corresponding to Ti-1 that is inserted into the membrane in a loop conformation but not yet translocated (Fig. 1*B*). As with the 16/23 chimera, these

degradation products are not observed in the absence of thylakoid membranes (Fig. 1*C*).

In the case of the 23 kDa precursor protein, the negative charge in the vicinity of the TPP cleavage site is apparently not of similar importance for maturation. The mutant derivative 23 D80L in which the negatively charged aspartic acid residue within the Ala-X-Ala motif of the signal peptide was replaced by leucine (Fig. 2*A*) shows no significant differences from the authentic precursor protein when analyzed in time course thylakoid transport experiments (Fig. 3, *B* and *C*). Binding of the mutant protein to the thylakoid vesicles appears slightly stronger at early time points, but there is no indication for the accumulation of translocation intermediates like Ti-1 or Ti-2. Remarkably though, the vicinity of the TPP cleavage site within the 23 D80L mutant is still significantly more hydrophilic than the corresponding regions of the 16/23 or 16 E84M proteins (Figs. 2*B* and 3*D*). Considering the possible impact of polarity in this region on the maturation process, this degree of polarity might well be sufficient to facilitate efficient processing by TPP. Therefore, polarity in this region was further reduced by an additional mutagenesis in which a polar serine residue at position -5 from the processing site was replaced by phenylalanine. When analyzed with time course thylakoid transport experiments, the resulting precursor protein (Fig. 2*A*, 23 S77F,D80L) shows membrane transport and processing characteristics similar to those observed for 16 E84M (Fig. 3, *B* and *C*). It binds significantly better to the thylakoid membrane than the corresponding authentic precursor protein, but it is converted to the mature polypeptide only slowly. This leads to the transient accumulation of a proteolytic fragment of ~28 kDa upon thermolysin treatment of the thylakoid vesicles after import (Fig. 3*B*) that presumably represents the bitopic translocation intermediate Ti-2. However, when compared with the results with the 16/23 and 16 E84M proteins, the level of Ti-2 accumulation is relatively low, indicating that maturation

## Terminal Processing of Tat Substrates



**FIGURE 4. A negative charge in the TPP cleavage region of the chimeric 16/23 protein leads to accelerated processing.** *A*, in *thylakoido* time course experiments performed with the 16/23 chimera and its mutant derivative 16/23 L82D. *B*, quantification of the amounts of Ti-1, Ti-2, and mature protein from the import reactions shown in *panel A*. For each time point, the relative amounts of Ti-1, Ti-2, and mature protein (in terms of percentage of the sum of these products) were calculated taking into account the number of [<sup>35</sup>S]methionine residues in each protein species. *C*, hydrophobicity plots of the 16/23 and 16/23 L82D proteins, generated according to Ref. 28. For further details, see the legends to Figs. 1 and 3.

tion is still only mildly affected in the double mutant, and a degradation product corresponding to Ti-1 is not detected at all.

**Charged Residues in the Vicinity of the Processing Site Improve Maturation of the Chimeric 16/23 Protein**—Thus far, the results obtained with the mutants are in close agreement with the assumption that a polar TPP cleavage region is required for efficient processing. To examine this further with a reciprocal approach, a negatively charged aspartic acid residue was introduced into the Ala-X-Ala motif of the chimeric 16/23 protein, in analogy to the situation found in the authentic 23 kDa precursor protein (Fig. 2*A*). According to our assumption, the resulting increase in polarity within this region (Fig. 4*C*) should lead to more efficient processing of the chimeric precursor and, possibly, even to higher translocation rates.

Analysis of the mutant derivative 16/23 L82D in time course thylakoid transport experiments shows that the precursor is

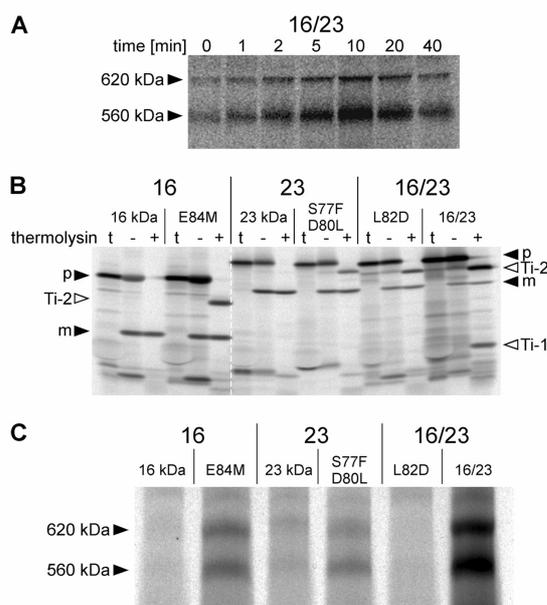
indeed converted to the mature 23 kDa protein with significantly higher efficiency than the original 16/23 chimera. Consequently, the transient accumulation of Ti-2 is shifted toward earlier time points of the transport experiment (Fig. 4, *A* and *B*), yet the mutant derivative 16/23 L82D is still not as efficiently processed as either of the two corresponding authentic precursor proteins, because the accumulation of Ti-2 is diminished but not prevented. The insertion of an additional charged residue at the N terminus of the mature part of the 16/23 chimera could not further improve maturation (data not shown), indicating that besides polarity of the cleavage region other features of the substrate, e.g. secondary structure (31), may additionally influence this process.

In contrast to precursor processing, the membrane translocation step is apparently not affected by the polarity of the TPP cleavage region. The 16/23 and 16/23 L82D precursors show largely similar membrane transport rates if both Ti-2 and mature polypeptide are considered as the protein fraction that was translocated across the thylakoid membrane (Fig. 4*A* and data not shown). Instead, the two proteins show significantly different thylakoid insertion properties, because accumulation of Ti-1 is hardly detectable for the 16/23 L82D chimera.

**Translocation Intermediates Can Occur Free in the Lipid Bilayer**—The observation that removal of polar or charged residues from the TPP cleavage site of authentic precursor proteins leads to a delay of the terminal processing step and thus to the accumulation of bitopic translocation intermediates raises the question whether these proteins are still associated with the protein translocase in the membrane or whether they have been released into the lipid phase of the membrane bilayer. In the case of the 16/23 chimera, accumulation of translocation intermediates correlates with prolonged association of the precursor protein to two membrane complexes of ~560 and 620 kDa, respectively, (17) that presumably represent thylakoidal TatB/C complexes (16). Time course experiments show that complex association of the 16/23 precursor protein takes place only transiently (Fig. 5*A*), which is indicative for an active translocation process.

Similar results were obtained when the authentic 16 and 23 kDa precursors as well as their mutant derivatives 16 E84M and

## Terminal Processing of Tat Substrates



**FIGURE 5. Association of translocation intermediates with Tat complexes in the thylakoid membrane.** *A*, in *thylakoido* time course experiment performed with the 16/23 chimera. Thylakoid transport reactions were washed twice with HM buffer, solubilized with digitonin (1.7%), separated on a 5–13.5% Blue Native polyacrylamide gradient gel, and visualized by phosphorimaging. The apparent sizes of the detected complexes are indicated. *B*, in *thylakoido* experiments were performed with authentic and mutant precursor proteins for 5 min at 25 °C and analyzed by SDS-PAGE. *C*, thylakoid transport reactions from *panel B* were treated as in *panel A*, separated on a Blue Native polyacrylamide gradient gel, and visualized by phosphorimaging. For further details, see the legend to Fig. 1.

23 S77F,D80L, respectively, were analyzed in parallel by SDS-PAGE and Blue Native-PAGE. In all these instances, the accumulation of translocation intermediates is accompanied by their association to two membrane complexes of high molecular mass (Fig. 5, *B* and *C*). These membrane complexes show mobilities upon native electrophoresis that are similar to those observed in transport experiments analyzing the 16/23 chimera. Remarkably, even for the authentic 23 kDa precursor protein binding to such membrane complexes was detected in some experiments (Fig. 5*C* and data not shown), demonstrating that binding to these membrane complexes is not restricted to chimeric or mutagenized proteins.

However, because of technical constraints it is not possible to determine whether all or only a fraction of the bitopic translocation intermediates accumulating in the membrane are actually bound to the membrane complexes. In fact, the mutant derivative of the 16/23 chimera with increased polarity in the TPP cleavage region (16/23 L82D) is not at all found associated with either of the two presumed Tat complexes during thylakoid transport (Fig. 5*C*), despite the fact that the delayed maturation of this polypeptide leads to the accumulation of significant amounts of the bitopic translocation intermediate within the membrane (Fig. 5*B*). This observation strongly suggests that the bitopic translocation intermediates do not necessarily remain associated with the translocase until cleavage by the thylakoidal processing peptidase takes place but that they

might instead be released from the membrane complex prior to terminal processing.

## DISCUSSION

In the present work, we have aimed to characterize the structural requirements for efficient maturation of thylakoidal precursor proteins after Tat-dependent membrane transport.

*Charged or Polar Residues Flanking the TPP Site Are Required for Efficient Maturation*—Thylakoid transport experiments performed with mutant derivatives of authentic and chimeric precursor proteins demonstrate that the efficiency of maturation depends on the composition of the amino acids flanking the TPP cleavage site. In addition to the well known dependence of processing on small and non-polar residues at positions  $-3$  and  $-1$  (1, 32), polar or even charged residues within this region are required for efficient processing. Unexpectedly, these residues may not only be supplied by the C-terminal part of the signal peptide but can also be provided by the N-terminal segment of the mature polypeptide. Lack of polar residues in either position that results in increased hydrophobicity within this region significantly reduces the efficiency of the maturation process (Figs. 3 and 4). This in turn leads to the accumulation of bitopic transport intermediates in which the translocated passenger protein remains anchored to the membrane from the luminal side by its signal peptide (Fig. 1*B*). Thus, depending on the signal peptide in a given precursor protein, the passenger polypeptide can take an active role in the transport process by influencing the efficiency of terminal processing by TPP.

*Need of Polarity or Problems with Hydrophobicity?*—What is the reason for the requirement of polarity within the TPP cleavage region? It appears unlikely that the charged or polar residues are needed for direct interaction of the substrate with the processing enzyme, because the amino acid sequence flanking the cleavage site is not significantly conserved except for the Ala-X-Ala motif (Fig. 2 and data not shown) and neither the exact position of the charged residues nor the degree of polarity seems strictly fixed. Reduced polarity in this region might instead prevent the exposure of the cleavage site to the luminal face of the thylakoid membrane, which in turn presumably affects its accessibility by the thylakoidal processing peptidase exerting its activity on the luminal side of the membrane (3). A similar conclusion has previously been drawn from the analysis of mutant derivatives of spontaneously inserting thylakoid proteins that likewise show reduced processing rates if polar residues in the vicinity of the TPP cleavage site are replaced by non-polar amino acids (33).

*What Comes First, Cleavage by TPP or Release from the Translocase?*—However, in view of the results obtained with the 16/23 L82D protein, an alternative or complementing scenario appears suitable. Considering the possibility that processing of the substrate by TPP may not take place at the translocase complex but instead within the lipid bilayer, charges and/or polarity in the region connecting the signal peptide with the passenger protein might be required to facilitate the lateral release of the translocated protein from the translocase into the lipid bilayer. The mutant 16/23 L82D accumulates as bitopic

## Terminal Processing of Tat Substrates

translocation intermediate Ti-2 already at early time points in kinetic thylakoid transport experiments (Fig. 4A). At later time points, this intermediate is almost quantitatively processed to the mature 23 kDa protein, demonstrating that essentially all of the protein accumulating in the Ti-2 conformation is recognized as substrate by the processing enzyme. However, native gel electrophoresis shows that this translocation intermediate is not associated with either of the presumed Tat membrane complexes (Fig. 5C). Instead, it seems to accumulate freely in the lipid bilayer, which strongly suggests that processing by TPP takes place in this instance after release of the protein into the membrane. It remains yet unsolved whether such release of a translocated protein from the Tat translocase is a prerequisite for processing. Considering, however, spontaneously inserting thylakoid proteins, like Cfo-II or PsbW that likewise carry cleavable signal peptides but do not depend on either Sec or Tat translocase for membrane transport (34, 35), a thylakoidal processing peptidase not associated with protein transport machinery but floating freely within the membrane bilayer is even more likely.

The signal for lateral opening of the translocase after membrane transport is presumably based on conformational changes in the Tat substrate upon transition from Ti-1 to Ti-2 (Fig. 1). However, a further signal might be provided by the polarity of the TPP cleavage region. Considering the accumulation of the uncharged 16/23 protein at the translocase (Fig. 5, A and C), any raise in hydrophobicity within this region seems to affect its lateral release into the membrane and thus result in stronger binding to the Tat complex. This assumption is in line also with a recent study demonstrating that increased hydrophobicity results in stronger Tat complex association (36).

Supporting evidence for this model can be obtained from the analysis of the Rieske protein that is targeted by the Tat pathway across the membrane. Transport is mediated by an N-terminal Tat-targeting signal that is not removed after transport but instead anchors the protein from the luminal side to the thylakoid membrane (21, 37). The topology of the mature Rieske protein thus corresponds to that of the bitopic translocation intermediates described here. It is obvious that at some point of the translocation process the protein has to be released laterally from the translocase into the lipid bilayer, but it is yet unknown which signal triggers this process. According to our hypothesis, an explicit release signal for membrane anchor proteins would not be required, because release of the bitopic translocation intermediates could well be the "default pathway" for all proteins targeted by the Tat translocase. In the case of the Rieske protein, no further processing would take place, whereas in the other cases TPP activity would be needed.

Further support comes from a recent study analyzing the maize homolog of the 16 kDa precursor protein presented here (38). In that study, the mature part of the precursor is efficiently translocated across the thylakoid membrane despite the fact that its signal peptide was covalently cross-linked to the TatC protein prior to transport, *i.e.* the precursor assumes the bitopic Ti-2 conformation with a stroma-exposed N terminus and the C terminus exposed to the

lumen. Remarkably, processing of this protein to the mature polypeptide is not observed, demonstrating that TPP does not have access to its processing site. Although it cannot be excluded that the cross-link leads to reduced flexibility of the protein, preventing its accessibility by TPP, it might as well be a consequence of the inability of the protein to dissociate from the Tat complex due to the cross-link to TatC. This scenario would be in line with a model in which release from the Tat complex into the lipid bilayer is even a prerequisite for terminal processing, although it should be emphasized that TPP activity associated with the Tat complex cannot be excluded at this point.

*Acknowledgment*—We thank Mario Jakob for critical review of the manuscript.

## REFERENCES

1. von Heijne, G. (1990) *J. Membr. Biol.* **115**, 195–201
2. Dalbey, R. E., and Wickner, W. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 15925–15931
3. Kirwin, P. M., Elderfield, P. D., and Robinson, C. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 16386–16390
4. Chaddock, A. M., Mant, A., Karnauchoff, I., Brink, S., Herrmann, R. G., Klösgen, R. B., and Robinson, C. (1995) *EMBO J.* **14**, 2715–2722
5. Berks, B. C. (1996) *Mol. Microbiol.* **22**, 393–404
6. Müller, M., and Klösgen, R. B. (2005) *Mol. Membr. Biol.* **22**, 113–121
7. Clark, S. A., and Theg, S. M. (1997) *Mol. Biol. Cell* **8**, 923–934
8. Hynds, P. J., Robinson, D., and Robinson, C. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 34868–34874
9. Marques, J. P., Schattat, M. H., Hause, G., Dudeck, I., and Klösgen, R. B. (2004) *J. Exp. Bot.* **55**, 1697–1706
10. Santini, C. L., Ize, B., Chanal, A., Müller, M., Giordano, G., and Wu, L. F. (1998) *EMBO J.* **17**, 101–112
11. Sargent, F., Bogsch, E. G., Stanley, N. R., Wexler, M., Robinson, C., Berks, B. C., and Palmer, T. (1998) *EMBO J.* **17**, 3640–3650
12. DeLisa, M. P., Tullman, D., and Georgiou, G. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 6115–6120
13. Richter, S., and Brüser, T. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 42723–42730
14. Hou, B., Frielingsdorf, S., and Klösgen, R. B. (2006) *J. Mol. Biol.* **355**, 957–967
15. Shanmugham, A., Wong Fong Sang, H. W., Bollen, Y. J., and Lill, H. (2006) *Biochemistry* **45**, 2243–2249
16. Cline, K., and Mori, H. (2001) *J. Cell Biol.* **154**, 719–729
17. Berghöfer, J., and Klösgen, R. B. (1999) *FEBS Lett.* **460**, 328–332
18. Mori, H., and Cline, K. (2002) *J. Cell Biol.* **157**, 205–210
19. Alami, M., Lüke, I., Deitermann, S., Eisner, G., Koch, H. G., Brunner, J., and Müller, M. (2003) *Mol. Cell* **12**, 937–946
20. Halpin, C., Elderfield, P. D., James, H. E., Zimmermann, R., Dunbar, B., and Robinson, C. (1989) *EMBO J.* **8**, 3917–3921
21. Molik, S., Karnauchoff, I., Weidlich, C., Herrmann, R. G., and Klösgen, R. B. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 42761–42766
22. Peltier, J. B., Friso, G., Kalume, D. E., Roepstorff, P., Nilsson, F., Adamska, I., and van Wijk, K. J. (2000) *Plant Cell* **12**, 319–341
23. Schubert, M., Petersson, U. A., Haas, B. J., Funk, C., Schröder, W. P., and Kieselbach, T. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 8354–8365
24. Summer, E. J., Mori, H., Settles, A. M., and Cline, K. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 23483–23490
25. Marques, J. P., Dudeck, I., and Klösgen, R. B. (2003) *Mol. Genet. Genomics* **269**, 381–387
26. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680–685
27. Schagger, H., and von Jagow, G. (1991) *Anal. Biochem.* **199**, 223–231
28. Kyte, J., and Doolittle, R. F. (1982) *J. Mol. Biol.* **157**, 105–132
29. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

**Terminal Processing of Tat Substrates**

30. Ma, X., and Browse, J. (2006) *Phytochemistry* **67**, 1629–1636
31. Pratap, J., and Dikshit, K. L. (1998) *Mol. Gen. Genet.* **258**, 326–333
32. Shackleton, J. B., and Robinson, C. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 12152–12156
33. Tissier, C., Woolhead, C. A., and Robinson, C. (2002) *Eur. J. Biochem.* **269**, 3131–3141
34. Michl, D., Robinson, C., Shackleton, J. B., Herrmann, R. G., and Klösgen, R. B. (1994) *EMBO J.* **13**, 1310–1317
35. Kim, S. J., Robinson, C., and Mant, A. (1998) *FEBS Lett.* **424**, 105–108
36. Gérard, F., and Cline, K. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 5263–5272
37. Karnauhov, I., Herrmann, R. G., and Klösgen, R. B. (1997) *FEBS Lett.* **408**, 206–210
38. Gérard, F., and Cline, K. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 6130–6135

### 3 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Mechanismus des Tat-abhängigen Proteintransports an der Thylakoidmembran untersucht. Es konnten neue Erkenntnisse zu den drei Teilschritten Bindung, Translokation und Prozessierung, die durch den Einsatz des 16/23-Proteins sichtbar gemacht werden können, gewonnen werden. Diese Erkenntnisse und die daraus resultierenden Fragen werden im Folgenden behandelt.

#### 3.1 Spontane Insertion – aber wie, in welcher Konformation und warum?

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass Substrate des Tat-Wegs zur Initiation des Transportprozesses spontan in die Thylakoidmembran inserieren können. Das erste Protein über das berichtet wurde, dass es mutmaßlich in der Lage ist spontan und ohne Unterstützung von anderen Proteinen in eine Membran zu integrieren, war das Vorläuferprotein des „coat protein“ (procoat) des M13 Phagen (Kuhn *et al.*, 1986). Man ging davon aus, dass zwei hydrophobe Domänen die einen kurzen hydrophilen Bereich umgrenzen zunächst an die Membran binden und anschließend, durch Integration der hydrophoben Bereiche in die Lipidphase, den kurzen hydrophilen Teil über die Membran translozieren. Später stellte sich jedoch heraus, dass dieses Protein für die erfolgreiche Insertion in eine Membran wiederum das Protein YidC benötigt (Samuelson *et al.*, 2000). Aus thermodynamischer Sicht ist eine spontane, nicht durch weitere Proteine unterstützte, Insertion eines Proteins in eine Lipidmembran aber prinzipiell dennoch möglich. Als treibende Kräfte wurden einfache hydrophobe Effekte, aber auch Änderungen der Konformation von inserierenden Bereichen eines solchen Proteins identifiziert (Engelman & Steitz, 1981; Wieprecht *et al.*, 1999; Seelig, 2004). Zwischenzeitlich wurden in der chloroplastidären Thylakoidmembran Proteine gefunden, bei denen man bis heute davon ausgeht, dass sie ohne Unterstützung in die Membran inserieren können (Michl *et al.*, 1994; Lorkovic *et al.*, 1995; Robinson *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1998; Mant *et al.*, 2001). Auch eine Beteiligung des plastidären Proteins Alb3, welches starke Homologie zum oben genannten YidC besitzt, konnte bislang ausgeschlossen werden. Allen gefundenen spontan inserierenden Proteinen ist der Aufbau, des in die Membran inserierenden Bereichs, gemeinsam. Dieser ist wie beim procoat-Protein aus zwei hydrophoben Bereichen aufgebaut, die einen kurzen hydrophilen Bereich umgrenzen. Daher wird auch für die spontan integrierenden

Thylakoidproteine der gleiche Insertionsmechanismus wie beim procoat-Protein vermutet (Michl *et al.*, 1994). Das Endprodukt dieses Insertionsmechanismus ist ein U-förmig über zwei Transmembranhelices in der Membran verankertes Protein, dessen Konformation auch als *loop*-Konformation bezeichnet wird.

Da sowohl N- als auch C-Terminus des 16/23-Proteins im Zustand des Ti-1 auf der stromalen Seite der Membran exponiert sind, scheint es wahrscheinlich, dass auch das 16/23-Protein eine solche *loop*-Konformation im Zuge einer spontanen Membraninsertion annimmt. Zum gleichen Schluss kamen die Autoren einer Studie, die Fusionen von bakteriellen Signalpeptiden mit dem grün-fluoreszierenden Protein (GFP) untersuchten. Dabei stellte sich heraus, dass auch diese Signalpeptid-GFP Fusionen mit reinen Lipidmembranen, ohne Beeinflussung durch andere Proteine, interagieren und mutmaßlich in einer *loop*-Konformation in diese integrieren (Shanmugham *et al.*, 2006).

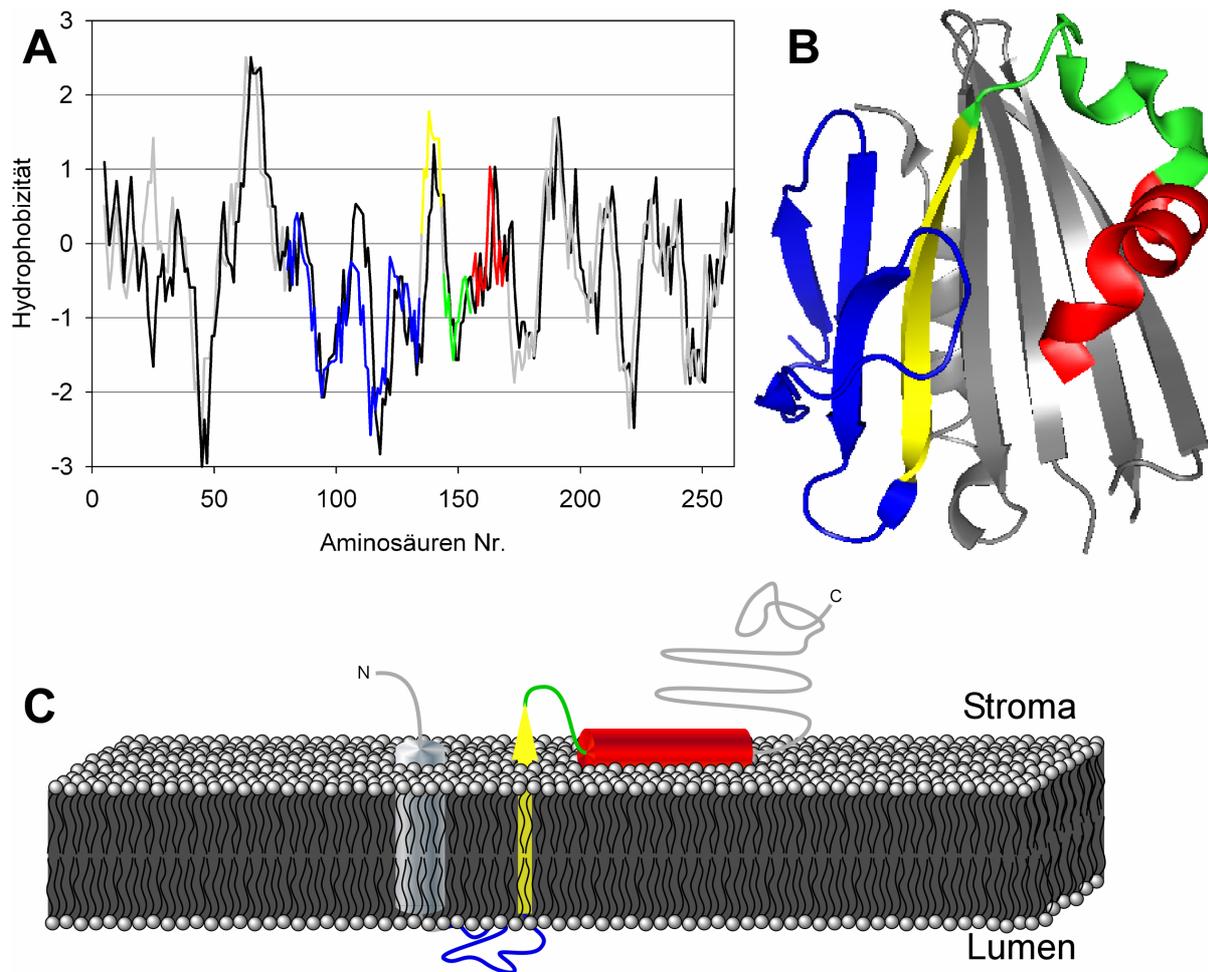
### 3.1.1 Die Konformation des ersten Translokationsintermediats

Das Modell der spontanen Insertion anderer thylakoidärer Proteine bzw. des procoat-Proteins lässt sich nicht ohne weiteres auf das 16/23-Protein übertragen. So weist z.B. das am besten charakterisierte spontan inserierende Protein der Thylakoidmembran, das sogenannte CF<sub>0</sub>II-Protein, einen durch die Membran vor Proteasen geschützten Membrananker mit der Größe von ca. 3,5 kDa auf (Michl *et al.*, 1999). Rechnet man eine weitere Transmembrandomäne sowie eine Verbindung zweier solcher Domänen hinzu, um das Molekulargewicht eines für eine *loop*-Konformation spezifischen Degradationsprodukts zu berechnen, so müsste ein solches Proteinfsegment eine Größe von ca. 8 kDa haben. Das Degradationsprodukt des 16/23-Proteins weist aber ein Molekulargewicht von 14 kDa auf. Da die Längen von Transmembrandomänen nicht stark variieren, bedeutet dies, dass nur der Bereich zwischen den Transmembrandomänen im 16/23-Protein für das abweichende Molekulargewicht verantwortlich sein kann. In spontan inserierenden Proteinen weisen diese Bereiche Molekulargewichte von ca. 1-2 kDa auf (Thompson *et al.*, 1999), wohingegen im 16/23-Protein dann ca. 6-7 kDa anzunehmen wären. Ob ein so großer hauptsächlich hydrophiler Teil eines Proteins über den Mechanismus der spontanen Insertion über eine Membran transloziert werden kann, ist unklar.

Ein weiterer Unterschied des 16/23-Proteins zu den spontan inserierenden Proteinen ist das Fehlen eines stark hydrophoben Bereichs im reifen Teil des Proteins (Abb. 14A). Im Rahmen einer zuvor in der Arbeitsgruppe erstellten Promotionsarbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine amphipathische  $\alpha$ -Helix innerhalb des reifen Teils des Proteins als

zweite Transmembrandomäne dienen könnte (Hou, 2004). Allerdings weist diese amphipathische Helix keine ausgeprägte Hydrophobizität auf, so dass fraglich ist, ob sie als treibende Kraft für eine spontane Insertion dienen kann. Bei genauerer Betrachtung der Hydrophobizitätsverteilung sowie der Struktur des 23 kDa Proteins (Abb. 14A und B) wäre aber alternativ denkbar, dass ein weiter N-terminal gelegener stärker hydrophober Bereich die Membran durchquert und die amphipathische Helix stattdessen auf der stromalen Seite in die Membran eintaucht (Abb. 14C). Dem stärker hydrophoben Bereich kann in der Kristallstruktur des 23 kDa Proteins aus Tabak eine  $\beta$ -Faltblattstruktur zugeordnet werden und er besitzt eine Länge von ca. 25 Å (vermessen unter Verwendung von PyMOL 0.97 (<http://pymol.sourceforge.net/>)). Auch der Membrananker der Untereinheit IV des Cytochrom *b<sub>6</sub>/f*-Komplexes aus *Chlamydomonas reinhardtii* (PDB ID: 1Q90) weist z.B. eine Länge von ca. 25 Å auf und Membranen verfügen in der Regel über eine Dicke von ca. 30 Å (Chen & Moy, 2000). Es wäre also theoretisch möglich, dass der hydrophobe  $\beta$ -Faltblattstrang die Membran durchspannt. Die Struktur eines  $\beta$ -Strangs würde dabei vermutlich nicht aufrechterhalten werden, es wäre aber ausreichend Hydrophobizität für eine spontane Membraninsertion vorhanden. Weiterhin könnte durch das Eintauchen der amphipathischen Helix in die stromale Seite der Membran auch dieser Bereich des Proteins vor Degradation durch Proteasen geschützt sein. Außerdem wäre der Bereich des Proteins, der durch die hydrophoben Kräfte über die Membran geschleust werden muss kleiner als im zuvor genannten Modell, was wiederum eine spontane Insertion in einer *loop*-Konformation auch energetisch wahrscheinlicher erscheinen lässt.

Die aufgeführten Überlegungen sind allerdings sehr spezifisch auf den reifen Teil des 23 kDa Proteins bezogen. Da andere Passagierproteine andere Strukturen und andere Hydrophobizitätsverteilungen aufweisen, ist davon auszugehen, dass auch eine spontane Insertion diverser Vorläuferproteine anders abläuft. Denkbar ist dabei auch, dass die hydrophoben Bereiche der Vorläuferproteine die Membran gar nicht durchspannen, sondern lediglich zur Bindung in diese eintauchen und dadurch vor Proteasen geschützt sind. Eine detaillierte Aufklärung der Struktur der proteasegeschützten Bereiche des 16/23-Proteins im Zustand des Ti-1 wird allerdings erst durch die Anwendung spektroskopischer Methoden wie winkelabhängige Infrarotspektroskopie (IR) an Modellmembranen, Circular dichroismus (CD) oder Kernresonanzspektroskopie (NMR) möglich sein.



**Abb. 14: Alternatives Modell zur Konformation des 16/23-Proteins nach spontaner Insertion.**

(A) Hydrophobizitätsplots (Kyte & Doolittle, 1982) der Vorläuferproteine des 23 kDa Proteins aus Spinat (*schwarze Linie*) und Tabak (*graue Linie*). Es sind verschiedene Bereiche des reifen 23 kDa Proteins markiert: *blau* – hydrophiler Bereich am N-Terminus, *gelb* – hydrophober Bereich, *grün* – hydrophiler Bereich, *rot* – mutmaßliche amphipathische  $\alpha$ -Helix, *grau* – C-terminaler Bereich. Die Farbkodierung bezieht sich auch auf (B) und (C). (B) Kristallstruktur des 23 kDa Proteins aus Tabak (Ifuku *et al.*, 2004). Die Abbildung wurde mit PyMOL 0.97 (<http://pymol.sourceforge.net/>) erstellt. (C) Schematische Darstellung des 16/23-Proteins im Zustand des Ti-1 nach erfolgter spontaner Insertion in die Thylakoidmembran.

### 3.1.2 Liposomen als artifizielles Membransystem

Abgesehen von den strukturellen Unklarheiten, die die spontane Insertion des 16/23-Proteins betreffen, wurden während der Erstellung der vorliegenden Arbeit Daten veröffentlicht, aus denen hervorgeht, dass möglicherweise die Verwendung von Liposomen zur Untersuchung von spontanen Membraninsertionsereignissen zu falsch positiven Ergebnissen führen könnte (Nishiyama *et al.*, 2006; Kawashima *et al.*, 2008). Diese Annahme bezieht sich allerdings auf Liposomen, die aus Lipiden aus *E. coli* aufgebaut sind. Die Autoren beschreiben, dass derartige Liposomen unspezifisch Membranproteine integrieren, die sonst nachweislich für ihre Integration auf andere Proteine angewiesen sind. Werden diese

Liposomen allerdings zu einem bestimmten Anteil mit Diacylglycerin (DAG) angereichert, so wurde keine unspezifische Membraninsertion mehr gemessen. DAG ist ein Vorläufer für Phospholipide und macht in Membranen von *E. coli* einen Anteil von ca. 1 % aus. Darüber hinaus neigt es wie MGDG aus Thylakoiden aufgrund seiner Molekülgeometrie nicht dazu Doppellipidschichten auszubilden. Wie DAG die spontane Insertion in Liposomen verhindert ist unklar. Zunächst wurde vermutet, dass durch die Krümmung der Membran in Liposomen die äußere Lipidschicht Lücken aufweist und somit der Eintritt von lipophilen Strukturen begünstigt ist (Nishiyama *et al.*, 2006). Diese Lücken sollten mutmaßlich durch DAG verschlossen werden, wobei diese Behauptung aber wieder revidiert wurde, da der Effekt von DAG unabhängig von der Größe der Liposomen auftritt und somit die Krümmung der Membran keine derartige Rolle spielen kann (Kawashima *et al.*, 2008). Hinzu kommt, dass ein Effekt von DAG auf die spontane Insertion erst ab 3-10 % DAG deutlich zum Tragen kommt, was wiederum außerhalb des physiologischen Bereichs liegt und somit die Aussagefähigkeit der Studie in Frage zu stellen ist. Da künstliche Systeme natürlich auch immer das Risiko beinhalten ein anderes Verhalten als das entsprechende biologische System zu zeigen, lohnt dennoch ein Vergleich dieses bakteriellen Systems mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Liposomen. Dazu ist zunächst festzuhalten, dass Liposomen die aus PC hergestellt wurden generell in der Lage sind Membranpotentiale und Protonengradienten auszubilden und aufrecht zu erhalten (de Kroon *et al.*, 1991). Dies zeigt, dass solche Liposomen prinzipiell stabil sowie dicht sind und somit zumindest geladene Ionen nicht unspezifisch die Membran durchqueren können. Ob ein Zusatz von DAG zu PC-Liposomen auch die spontane Proteininsertion des 16/23-Proteins verhindert, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht getestet. Da aber eine spontane Insertion in Liposomen die 30 % MGDG enthalten noch möglich ist und MGDG zu DAG sehr ähnlich ist, spricht dies dafür, dass die spontane Insertion des 16/23-Proteins in Liposomen nicht unspezifisch erfolgt.

### **3.1.3 Spontane Membraninsertion von Vorläuferproteinen gegenüber Rezeptor-vermittelter Bindung als initialer Schritt des Tat-abhängigen Proteintransports**

Schließlich stellt sich noch die Frage nach dem Sinn einer spontanen Insertion eines Vorläuferproteins in die Membran über die es transportiert werden soll. Normalerweise geht man davon aus, dass biologische Prozesse gerichtet ablaufen, damit die Zelle eine größtmögliche Effizienz erreichen kann. Die Initiation eines Transportprozesses durch die spontane Integration des Transportsubstrats in die Membran erscheint auf den ersten Blick eher ungerichtet. Es ist aber zu bedenken, dass im Fall des Tat-Transports die

Vorläuferproteine nicht wie beim Sec-Transport (Zhou & Xu, 2005) durch lösliche Faktoren zur Translokase geleitet werden. Das Vorläuferprotein könnte sich also im dreidimensionalen Raum bis zur Bindung an den TatBC-Rezeptorkomplex bewegen. Die Wahrscheinlichkeit, dass das Vorläuferprotein auf die Thylakoidmembran trifft, ist weitaus größer als die auf einen der TatBC-Rezeptoren zu treffen, welche über die Thylakoide verteilt sind. Sobald aber das Vorläuferprotein in die Membran integriert, ist die Bewegungsfreiheit auf einen zweidimensionalen Raum beschränkt und die Wahrscheinlichkeit, dass das Vorläuferprotein auf einen Rezeptorkomplex trifft, erhöht sich. Aus dieser Annahme ist wiederum zu schließen, dass ein Vorläuferprotein nach seiner Integration in die Membran anschließend lateral an den TatBC-Rezeptorkomplex binden müsste. Im bakteriellen System wurden mehrere Aminosäuren innerhalb der ersten N-terminalen Hälfte von TatC gefunden, die für die Bindung von Vorläuferproteinen verantwortlich sind (Holzapfel *et al.*, 2007). Da sich diese Bindestellen sowohl auf der *cis*- als auch auf der *trans*-Seite der Membran sowie innerhalb der Transmembranbereiche von TatC befinden, erscheint eine laterale Bindung nach erfolgter spontaner Membraninsertion wahrscheinlicher als eine Bindung im löslichen Zustand von der *cis*-Seite der Membran.

### **3.2 Lösliche stromal lokalisierte Tata-Komplexe als Komponente der Tat-Translokase**

In der vorliegenden Arbeit wurde demonstriert, dass die Komponente TatA der Tat-Translokationsmaschinerie in löslicher Form im Stroma von Chloroplasten vorliegt. Diese lösliche Form von TatA ist in der Lage den Transport von entsprechenden Vorläuferproteinen über den Tat-Weg zu vermitteln, selbst wenn das Vorläuferprotein bereits am TatBC-Komplex gebunden ist. *In vitro* führt die Zugabe von stromalem TatA sogar zur Steigerung der Transportrate. Bislang war zwar klar, dass TatA für den eigentlichen Schritt der Translokation essentiell ist (Mori & Cline, 2002), man ging aber davon aus, dass es strikt in der Membran verankert ist (z.B. (Mori *et al.*, 1999)). Allerdings wurde auch in früheren Arbeiten bereits lösliches TatA im Cytoplasma von Gram-positiven Bakterien gefunden (Pop *et al.*, 2003; De Keersmaecker *et al.*, 2005), ein direkter Einfluss dieser löslichen Proteine auf den Schritt der Translokation konnte aber bislang nicht nachgewiesen werden. Vielmehr wird vermutet, dass lösliches TatA dazu dient Vorläuferproteine, analog zum Protein SecB des Sec-Systems (Zhou & Xu, 2005), zur Translokase zu leiten. Diese Funktion ist aber, nach den Daten der vorliegenden Arbeit, für das pflanzliche Tat-System auszuschließen, da alle Schritte

bis zur Bindung des Vorläuferproteins am TatBC-Komplex unabhängig von stromalem TatA ablaufen.

Ähnlich zu den Daten aus *Bacillus subtilis* (Westermann *et al.*, 2006) ist aber, dass TatA im Stroma zu hochmolekularen Komplexen zusammentritt. Auffällig ist dabei, dass die kleineren Komplexe von 300 und 500 kDa in geringeren Mengen als der 880 kDa Komplex auftreten. Anhand der Stöchiometrie und den Größen der kleineren Komplexe wäre es denkbar, dass es sich dabei um zwei TatA-Module handelt, die wiederum miteinander eine Assoziation zum großen Komplex eingehen können. Die Verteilung der aktiven TatA-Komplexe im Saccharose-Gradienten weist allerdings darauf hin, dass die kleinen Komplexe die aktive Form darstellen, während die 880 kDa Komplexe möglicherweise inaktiv sind.

Interessante Daten bezüglich der stromal lokalisierten TatA-Komplexe liefert auch eine kürzlich veröffentlichte Studie aus dem bakteriellen System. Dort wurden im Cytoplasma von *E. coli* röhrenartige sehr flexible Strukturen, welche aus TatA Protein bestehen, beschrieben (Berthelmann *et al.*, 2008). Diese werden zwar erst nach ca. 15-facher Überexpression von TatA sichtbar, was darauf hindeutet, dass es sich mutmaßlich um artifizielle Strukturen handelt. Aber dennoch bieten diese Daten Einblicke in die komplexen Eigenschaften von TatA. Die genannten polymeren Strukturen sind ein Indiz dafür, dass sich TatA in hydrophiler Umgebung zu homomultimeren Strukturen zusammenlagern kann. Dies steht in Übereinstimmung mit den TatA-haltigen hochmolekularen Proteinkomplexen, die in *Bacillus subtilis* (Westermann *et al.*, 2006) sowie in der vorliegenden Arbeit beschrieben wurden. Das Vorhandensein der röhrenartigen Strukturen in *E. coli* stellt allerdings für den Proteintransport keine hinreichende Bedingung dar, was wiederum auch ein Indiz dafür ist, dass eher kleine TatA-Komplexe die aktive Form von TatA darstellen. Weiterhin werden die röhrenartigen Strukturen nur sichtbar, wenn TatC gleichzeitig exprimiert wird. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die TatA-Komplexe an TatC binden können. Auf die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit übertragen könnte dies bedeuten, dass die beobachtete Bindung von stromalem TatA an NaBr-vorbehandelte Thylakoide auch von TatC abhängig ist und TatA nicht wie bislang vermutet spontan in die Thylakoidmembran integriert (Fincher *et al.*, 2003). Eine solche Abhängigkeit im pflanzlichen System zu testen wäre allerdings nicht trivial, da keine TatC-Deletionsmutanten zu Verfügung stehen. Alternativ könnte die Assoziation von TatA-Komplexen an TatC durch spezifische Antikörper gegen TatC blockiert werden. Da diese Antikörper aber die Tat-abhängige Translokation vermutlich schon vor der Assoziation des Vorläuferproteins an den TatBC-Rezeptorkomplex verhindern, müsste das Vorläuferprotein vor der Blockierung an den TatBC-Komplex gebunden werden, was aber

durch die Vorbehandlung der Thylakoide mit NaBr möglich ist. Sollte sich jedenfalls eine spezifische Bindung von stromalen TatA-Komplexen an membrangebundenes TatC nachweisen lassen, so würde dies ein ganz neues Licht auf den Mechanismus des Tat-abhängigen Proteintransports werfen.

Insgesamt ist festzuhalten, dass die weitere Charakterisierung von TatA in löslicher wie auch in membrangebundener Form zum besseren Verständnis des Tat-Mechanismus beitragen könnte, da TatA nach wie vor den eigentlichen Schritt der Translokation vermittelt und somit den Schlüssel für den Mechanismus darstellt. Das in der vorliegenden Arbeit etablierte Testsystem der NaBr-Vorbehandlung von Thylakoiden bietet gute Voraussetzungen für weitere Untersuchungen in dieser Richtung. Es bietet z.B. auch die Möglichkeit gezielt verändertes TatA-Protein einzusetzen und auf Translokationsaktivität zu testen. Auch die Tatsache, dass bestimmte aktive Fraktionen des stromalen Extrakts abgetrennt werden können bietet Möglichkeiten für die weitere Charakterisierung von TatA-Komplexen.

Es ist an dieser Stelle aber auch darauf hinzuweisen, dass der Transport von Vorläuferproteinen *in vitro* prinzipiell auch in Abwesenheit von stromalem TatA abläuft und somit lösliches TatA offenbar nicht essentiell ist. Aufgrund dieser Tatsache kann dem löslichen stromal lokalisierten TatA auch noch keine eindeutige Funktion zugewiesen werden. Einerseits könnte die Funktion von stromalem TatA die eines Vorrats an momentan nicht benötigtem TatA-Protein sein. Dafür spricht, dass die komplexen Strukturen von TatA in *E. coli* erst nach Überexpression im Cytoplasma zu detektieren sind, also erst wenn mehr TatA Protein vorhanden ist als benötigt wird. Allerdings wurde TatA in der vorliegenden Arbeit im Stroma von Wildtyp-Erbesen detektiert. Dies zeigt, dass TatA auch ohne Überexpression in löslicher Form vorkommt und daher vermutlich nicht unnötig als Vorrat im Stroma vorliegt. Vielmehr könnte das Vorkommen von löslichem TatA funktionell bedingt sein. Das heißt, dass TatA möglicherweise hydrophobe wie auch hydrophile Eigenschaften besitzen muss, um seine Funktion ausführen zu können. Inwiefern diese Eigenschaften für die Funktion von TatA notwendig sind bleibt aber zunächst unklar. Gezielte Veränderungen der Eigenschaften von TatA könnten aber dazu beitragen aufzuklären, ob TatA für seine Funktion notwendigerweise lösliche Komplexe bilden können muss.

### **3.3 Die Abspaltung von Tat-Signalpeptiden erfolgt mutmaßlich erst nach der Dissoziation des Vorläuferproteins vom TatBC-Komplex**

Die Daten der vorliegenden Arbeit machen deutlich, dass der Grad an Hydrophobizität, der in der Region der Prozessierungsstelle zwischen Signalpeptid und reifem Protein vorherrscht, maßgeblich die Effizienz der Prozessierung zum reifen Protein beeinflusst. Unerwartet war dabei vor allem, dass nicht nur Veränderungen im C-Terminus des Signalpeptids die Effizienz des Tat-abhängigen Transports beeinflussen, sondern auch die Aminosäurezusammensetzung im N-Terminus des zu transportierenden Proteins Auswirkungen auf die Transporteffizienz haben kann. Da auch Proteine wie beispielsweise GFP durch Fusion mit einem entsprechenden Signalpeptid problemlos über den Tat-Weg transportiert werden (Marques *et al.*, 2003; Marques *et al.*, 2004), wurde dagegen bislang davon ausgegangen, dass der Tat-abhängige Transport wenig durch das Passagierprotein beeinflusst wird. Für die biotechnologische Nutzung des Tat-Proteintransportwegs in Bakterien und Pflanzen (Brüser, 2007; Bally *et al.*, 2008; Tissot *et al.*, 2008) könnte die Erkenntnis, dass Passagierproteine möglicherweise Einfluss auf die Transporteffizienz haben, in Zukunft nützlich sein. Dagegen würde ein ineffizienter Proteintransport möglicherweise einen Rückstau an der Tat-Translokase provozieren und könnte zur unspezifischen Degradation von Vorläuferproteinen führen und damit die Ausbeute erheblich mindern.

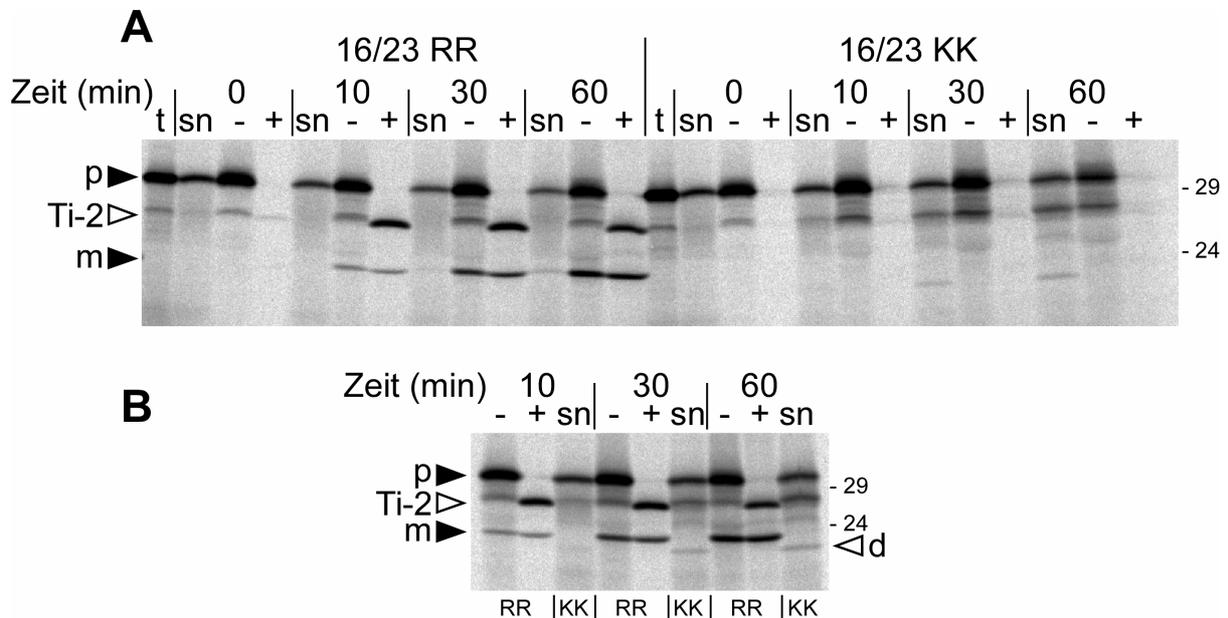
Im Detail zeigte sich, dass die erhöhte Hydrophobizität nicht direkt die Prozessierung durch die Thylakoidprozessierungspeptidase (TPP) behindert, sondern zu einer stärkeren und folglich längeren Assoziation des Vorläuferproteins an den TatBC-Rezeptorkomplex führt. Eine ähnlich verstärkte Assoziation zwischen Vorläuferprotein und TatBC-Komplex wurde auch in einer unabhängigen Studie beschrieben (Gérard & Cline, 2007). Weitere Daten der gleichen Autoren (Gérard & Cline, 2006), wie auch die hier präsentierten Daten lassen den Schluss zu, dass eine Prozessierung von Vorläuferproteinen nicht möglich ist, solange diese am TatBC-Rezeptorkomplex gebunden sind. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass das Vorläuferprotein im Zustand des Ti-2 vom TatBC-Komplex dissoziiert und lateral in die Membran entlassen werden muss. Dass dies prinzipiell möglich ist, zeigt die Analyse des Rieske-Proteins. Dieses Protein wird auch über den Tat-Weg transportiert, das Signalpeptid dient aber nach erfolgter Translokation als Membrananker und wird nicht durch die TPP abgespalten (Karnauchov *et al.*, 1997; Molik *et al.*, 2001). Im Grunde entspricht die Struktur dieses Proteins also dem Ti-2 der hier beschriebenen Proteine. Das heißt also, dass die laterale Entlassung des Rieske-Proteins in die Membran keinen Sonderfall darstellt, sondern

mutmaßlich alle Tat-abhängig transportierten Proteine diesem Schema folgen. Lediglich die finale Prozessierung durch die TPP würde also beim Rieske-Protein entfallen.

Einen gewissen Widerspruch zu bisher veröffentlichten Daten bringt dieses Modell allerdings mit sich. Vor einigen Jahren wurde beschrieben, dass bei *in vivo* Experimenten die reife Form von Substraten des Tat-Wegs zu gewissen Teilen im Stroma von Chloroplasten akkumuliert. Die Autoren gehen davon aus, dass die Vorläuferproteine durch die TPP prozessiert worden sein müssen. Da die TPP ihre Aktivität auf der luminalen Seite der Thylakoidmembran ausführt (Kirwin *et al.*, 1988) wurde weiter geschlossen, dass der Transportprozess so weit fortgeschritten sein muss, dass sich die Prozessierungsstelle des Vorläuferproteins im Lumen befindet und es zur Prozessierung kommen kann. Anschließend erfolgt eine sogenannte Retrotranslokation, das heißt ein Teil der prozessierten Proteine wird zurück ins Stroma transportiert (Di Cola & Robinson, 2005). Es wurde vermutet, dass der Rücktransport von Proteinen noch während des Transportvorgangs erfolgt, auch wenn nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die Proteine die Membran bereits vollständig durchquert haben. Da nach den Daten der vorliegenden Arbeit aber die Prozessierung erst nach der Translokation und Dissoziation vom TatBC-Komplex erfolgt, wäre aber genau dieser Rücktransport nach vollständigem Durchtritt durch die Membran die einzige, wenn auch unwahrscheinliche Möglichkeit alle Daten in einem gemeinsamen Modell zu berücksichtigen.

Es muss an dieser Stelle aber auch darauf hingewiesen werden, dass die Retrotranslokation nur unter bestimmten Bedingungen beobachtet werden kann und auch die Autoren der Studie in Betracht ziehen, dass sie eine Folge der starken Überexpression von Vorläuferproteinen sein könnte. Hinzu kommt, dass die Inkubationszeiten bei den eingesetzten *in vivo* Methoden die von *in vitro* Experimenten um ein mehrfaches übersteigen. Des Weiteren sind die Daten der Studie nicht immer kohärent. So weicht beispielsweise je nach Experiment die Größe des im Stroma detektierten reifen Proteins leicht von der eigentlichen Größe ab bzw. tauchen teilweise Doppelbanden auf, die nicht berücksichtigt werden. Ein ähnliches Phänomen konnte bei eigenen Arbeiten beobachtet werden. Untersucht man nach der Inkubation von Thylakoiden mit Vorläuferprotein den Puffer in dem die Reaktion stattgefunden hat (bzw. den Überstand nach der ersten Zentrifugation) über einen Zeitraum von einer Stunde, so kann dort im Fall des 16/23-Proteins lediglich das Vorläuferprotein detektiert werden (Abb. 15). Wird dagegen eine Variante des 16/23-Proteins eingesetzt, die nicht transportiert werden kann, weil das Zwillingsarginin-Motiv zu einer KK-Sequenz ausgetauscht wurde (16/23 KK), dann kann nach 30-60 min im Überstand der Reaktion eine Bande detektiert werden, die auf den ersten Blick dem reifen Protein

entsprechen könnte (Abb. 15A). Dies würde bedeuten, dass die KK-Variante des 16/23-Proteins zwar nicht transportiert wird, es aber dennoch zu einer Prozessierung zum reifen Protein kommt.



**Abb. 15: Analyse der Überstände nach Inkubation von Thylakoiden mit Vorläuferproteinen.**

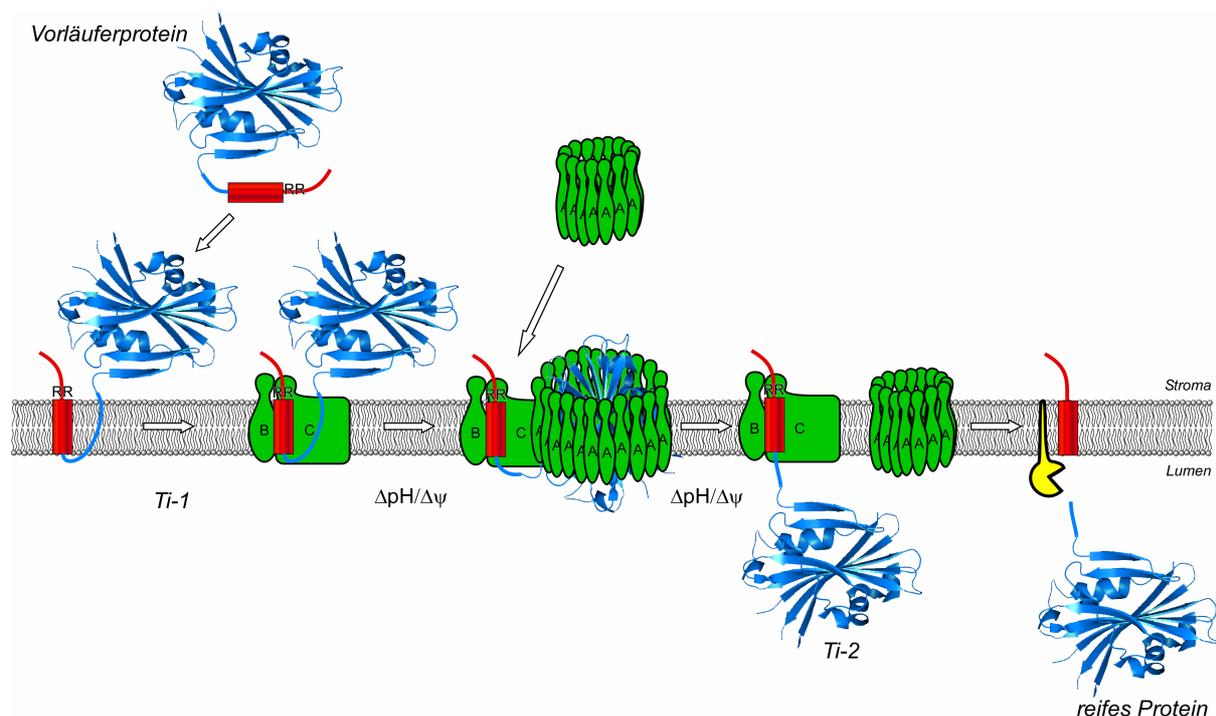
(A) Thylakoide wurden mit den Vorläuferproteinen *16/23 RR* und *16/23 KK* inkubiert. Die Überstände (*sn*) der ersten Zentrifugation nach der Inkubation wurden gefällt und stöchiometrische Mengen der Fällung wurden parallel zu den anderen Ansätzen analysiert. (B) Ein Teil der Proben aus (A) wurde in einer alternativen Reihenfolge nochmals analysiert. Proben mit den Varianten des 16/23-Proteins sind durch *RR* bzw. *KK* gekennzeichnet. *d* kennzeichnet ein Degradationsprodukt des Vorläuferproteins 16/23 KK. Für weitere Details siehe Legenden zu Abb. 8 und 10.

Werden aber die gleichen Proben nochmals analysiert und die Überstände der KK-Variante direkt neben den Proben des ursprünglichen 16/23-Proteins auf ein Gel aufgetragen, so wird klar, dass die KK-Variante des 16/23-Proteins nicht zum reifen Protein prozessiert wird. Stattdessen handelt es sich hier vermutlich um eine unspezifische Degradation durch eine membranständige Protease der Thylakoidmembran. Diese generiert ein Degradationsprodukt, welches etwas kleiner ist als das reife 23 kDa Protein. Dieses Experiment zeigt, dass durch z.B. längere Inkubationszeiten auch unspezifische Degradationsprodukte detektiert werden können, die zusätzlich auch eine ähnliche Größe wie das reife Protein aufweisen. Aufgrund der Proteasestabilität von reifem GFP (welches auch in der oben genannten Studie analysiert wurde) kann es auch hier dazu kommen, dass Proteasen unspezifisch das Signalpeptid degradieren und so reifes Protein entsteht. Es werden also weitere Untersuchungen nötig sein, um herauszufinden, ob eine Retrotranslokation von vollständig transportiertem reifem Protein möglich ist. Alternativ wäre aber auch denkbar, dass der reife Teil des Vorläuferproteins im Zustand von Ti-2 zwar proteaseresistent ist, aber

dennoch nicht vollständig über die Membran transloziert vorliegt. Würde eine Dissoziation vom TatBC-Komplex in diesem teilweise translozierten Zustand erfolgen, wäre somit die Prozessierung zum reifen Protein möglich. Da das Protein aber noch nicht vollständig transloziert wäre, könnte es in einem solchen Szenario die Membran auch wieder auf der stromalen Seite verlassen.

### 3.4 Abschließendes Modell zum Mechanismus des Tat-abhängigen Proteintransports

Die Erkenntnisse, welche in der vorliegenden Arbeit gewonnen werden konnten, führen dazu, dass das in Abb. 7 gezeigte Modell an mehreren Stellen modifiziert werden muss (Abb. 16).



**Abb. 16: Modifiziertes Modell des Tat-abhängigen Translokationsmechanismus.**

Für Details siehe Abb. 7 bzw. Beschreibung im Text.

Der Transportvorgang wird mutmaßlich durch die spontane Insertion eines Teils des Vorläuferproteins in die Thylakoidmembran initiiert und es kommt zur Bildung des ersten Translokationsintermediats. Anschließend erfolgt die laterale Bindung des Vorläuferproteins an den TatBC-Rezeptorkomplex. Eine direkte Interaktion des Vorläuferproteins mit dem TatBC-Komplex, wie sie in Abb. 7 dargestellt ist, kann aber bislang nicht ausgeschlossen werden. Sowohl membranständiges wie auch lösliches TatA-Protein kann anschließend die

Translokation des reifen Teils des Proteins über die Membran in einem noch ungeklärten Mechanismus vermitteln. Mutmaßlich wird dazu ein  $\Delta pH$  bzw.  $\Delta\Psi$  sowie möglicherweise ein Kontakt zwischen TatA und TatC benötigt. Durch die Translokation des reifen Teils über die Membran erfolgt die Umsetzung des Vorläuferproteins vom ersten zum zweiten Translokationsintermediat. In diesem Zustand ist das Vorläuferprotein nur noch kurz mit dem TatBC-Rezeptorkomplex assoziiert, bevor es lateral in die Membran entlassen wird. Dieser Schritt erfolgt mit geringerer Effizienz wenn die Hydrophobizität im Bereich der TPP-Prozessierungsstelle erhöht ist. Nach der Dissoziation vom TatBC-Komplex erfolgt in den meisten Fällen die Prozessierung durch die TPP und das reife Protein wird ins Thylakoidlumen entlassen. Das in der Membran verbliebene Signalpeptid wird vermutlich durch membranständige Proteasen der Thylakoidmembran degradiert (persönliche Mitteilung, Enguo Fan). Im Fall des Rieske Proteins ist der Transportprozess nach der lateralen Entlassung in die Membran abgeschlossen, da das Signalpeptid dieses Proteins als Membrananker dient und nicht abgespalten wird. Es kann also direkt in den Cytochrom *b<sub>6</sub>/f*-Komplex eingebaut werden.

Die TatA Moleküle sind aus Gründen der Einfachheit weiterhin nach dem Modell einer hydrophilen Porenbildung dargestellt. Es ist aber anzumerken, dass bislang immer noch nicht geklärt ist, ob TatA tatsächlich eine hydrophile Pore bilden kann oder ob nicht ein grundsätzlich anderer Mechanismus der Translokation zu Grunde liegt. Die löslichen TatA-Komplexe müssen aufgrund der hydrophilen Umgebung eine von den membranständigen TatA-Komplexen abweichende Komplexstruktur aufweisen. Da nun auch noch derartige hydrophile TatA-Komplexe beschrieben wurden, ist nach wie vor insbesondere der eigentliche Schritt der Translokation über die Membran am wenigsten charakterisiert und bietet die größten und interessantesten Möglichkeiten für weitere Untersuchungen.

## 4 Literaturverzeichnis

- Alder, N.N. & Theg, S.M. (2003)** Energetics of protein transport across biological membranes: A study of the thylakoid  $\Delta$ pH-dependent/cpTat pathway. *Cell*, 112, 231-242.
- Andersson, M.X., Kjellberg, J.M. & Sandelius, A.S. (2001)** Chloroplast biogenesis. Regulation of lipid transport to the thylakoid in chloroplasts isolated from expanding and fully expanded leaves of pea. *Plant Physiol*, 127, 184-193.
- Bageshwar, U.K. & Musser, S.M. (2007)** Two electrical potential-dependent steps are required for transport by the *Escherichia coli* Tat machinery. *J Cell Biol*, 179, 87-99.
- Bally, J., Paget, E., Droux, M., Job, C., Job, D. & Dubald, M. (2008)** Both the stroma and thylakoid lumen of tobacco chloroplasts are competent for the formation of disulphide bonds in recombinant proteins. *Plant Biotechnol J*, 6, 46-61.
- Behrendt, J., Standar, K., Lindenstrauss, U. & Brüser, T. (2004)** Topological studies on the twin-arginine translocase component TatC. *FEMS Microbiol Lett*, 234, 303-308.
- 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, 18341-18346.
- Berghöfer, J. & Klösgen, R.B. (1996)** Isolation and characterization of a cDNA encoding the SecY protein from spinach chloroplasts (accession no. Z54351) (PGR96-090). *Plant Physiol*, 112, 863.
- Berghöfer, J. & Klösgen, R.B. (1999)** Two distinct translocation intermediates can be distinguished during protein transport by the TAT ( $\Delta$ pH) pathway across the thylakoid membrane. *FEBS Lett*, 460, 328-332.
- Berks, B.C., Sargent, F. & Palmer, T. (2000)** The Tat protein export pathway. *Mol Microbiol*, 35, 260-274.
- Berthelmann, F., Mehner, D., Richter, S., Lindenstrauß, U., Lünsdorf, H., Hause, G. & Brüser, T. (2008)** Recombinant expression of *tatABC* and *tatAC* results in the formation of interacting cytoplasmic TatA tubes in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, doi:10.1074/jbc.M707757200.
- 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, 3851-3859.
- 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, 1993-1998.
- Bruce, B.D. (1998)** The role of lipids in plastid protein transport. *Plant Mol Biol*, 38, 223-246.

- Bruce, B.D. (2000)** Chloroplast transit peptides: structure, function and evolution. *Trends Cell Biol*, 10, 440-447.
- Bruce, B.D. (2001)** The paradox of plastid transit peptides: conservation of function despite divergence in primary structure. *Biochim Biophys Acta*, 1541, 2-21.
- Brüser, T. (2007)** The twin-arginine translocation system and its capability for protein secretion in biotechnological protein production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 76, 35-45.
- Calderone, V., Trabucco, M., Vujicic, A., Battistutta, R., Giacometti, G.M., Andreucci, F., Barbato, R. & Zanotti, G. (2003)** Crystal structure of the PsbQ protein of photosystem II from higher plants. *EMBO Rep*, 4, 900-905.
- Chaddock, A.M., Mant, A., Karnauchov, 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, 2715-2722.
- Chan, C.S., Zlomislic, M.R., Tieleman, D.P. & Turner, R.J. (2007)** The TatA subunit of *Escherichia coli* twin-arginine translocase has an N-in topology. *Biochemistry*, 46, 7396-7404.
- Chanal, A., Santini, C. & Wu, L. (1998)** Potential receptor function of three homologous components, TatA, TatB and TatE, of the twin-arginine signal sequence-dependent metalloenzyme translocation pathway in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 30, 674-676.
- Chen, A. & Moy, V.T. (2000)** Cross-linking of cell surface receptors enhances cooperativity of molecular adhesion. *Biophys J*, 78, 2814-2820.
- Clark, S.A. & Theg, S.M. (1997)** A folded protein can be transported across the chloroplast envelope and thylakoid membranes. *Mol Biol Cell*, 8, 923-934.
- Clausmeyer, S. (1992)**. Import, Sortierung, Assemblierung von kernkodierten Proteinen des Chloroplasten. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- 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, 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, 2688-2696.
- 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, 719-729.
- De Keersmaecker, S., Van Mellaert, L., Schaerlaekens, K., Van Dessel, W., Vrancken, K., Lammertyn, E., Anné, J. & Geukens, N. (2005)** Structural organization of the twin-arginine translocation system in *Streptomyces lividans*. *FEBS Lett*, 579, 797-802.
- de Kroon, A.I., Vogt, B., van't Hof, R., de Kruijff, B. & de Gier, J. (1991)** Ion gradient-induced membrane translocation of model peptides. *Biophys J*, 60, 525-537.

- Di Cola, A. & Robinson, C. (2005)** Large-scale translocation reversal within the thylakoid Tat system *in vivo*. *J Cell Biol*, 171, 281-289.
- Engelman, D.M. & Steitz, T.A. (1981)** The spontaneous insertion of proteins into and across membranes: the helical hairpin hypothesis. *Cell*, 23, 411-422.
- 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, 807-815.
- Fincher, V., Dabney-Smith, C. & Cline, K. (2003)** Functional assembly of thylakoid  $\Delta$ pH-dependent/Tat protein transport pathway components *in vitro*. *Eur J Biochem*, 270, 4930-4941.
- Franklin, A.E. & Hoffman, N.E. (1993)** Characterization of a chloroplast homologue of the 54-kDa subunit of the signal recognition particle. *J Biol Chem*, 268, 22175-22180.
- Frielingsdorf, S. (2003)**. Charakterisierung der frühen Schritte des  $\Delta$ pH/TAT-abhängigen Proteintransports am Beispiel des chimären 16/23-Proteins. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Gérard, F. & Cline, K. (2006)** Efficient twin arginine translocation (Tat) pathway transport of a precursor protein covalently anchored to its initial cpTatC binding site. *J Biol Chem*, 281, 6130-6135.
- Gérard, F. & Cline, K. (2007)** The thylakoid proton gradient promotes an advanced stage of signal peptide binding deep within the Tat pathway receptor complex. *J Biol Chem*, 282, 5263-5272.
- Gohlke, U., Pullan, L., McDevitt, C.A., Porcelli, I., de Leeuw, E., Palmer, T., Saibil, H.R. & Berks, B.C. (2005)** The TatA component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 10482-10486.
- Gouffi, K., Gérard, F., Santini, C.L. & Wu, L.F. (2004)** Dual topology of the *Escherichia coli* TatA protein. *J Biol Chem*, 279, 11608-11615.
- Gray, M.W. & Doolittle, W.F. (1982)** Has the endosymbiont hypothesis been proven? *Microbiol Rev*, 46, 1-42.
- Gutensohn, M., Fan, E., Frielingsdorf, S., Hanner, P., Hou, B., Hust, B. & Klösgen, R.B. (2006)** Toc, Tic, Tat et al.: structure and function of protein transport machineries in chloroplasts. *J Plant Physiol*, 163, 333-347.
- Holzappel, E., Eisner, G., Alami, M., Barrett, C.M., Buchanan, G., Lüke, I., Betton, J.M., Robinson, C., Palmer, T., Moser, M. & Müller, M. (2007)** The entire N-terminal half of TatC is involved in twin-arginine precursor binding. *Biochemistry*, 46, 2892-2898.
- Hou, B. (2004)**. Mechanism of  $\Delta$ pH/TAT-dependent protein transport at the thylakoid membrane. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Hou, B., Frielingsdorf, S. & Klösgen, R.B. (2006)** Unassisted membrane insertion as the initial step in  $\Delta$ pH/Tat-dependent protein transport. *J Mol Biol*, 355, 957-967.

- Hynds, P.J., Robinson, D. & Robinson, C. (1998)** The sec-independent twin-arginine translocation system can transport both tightly folded and malformed proteins across the thylakoid membrane. *J Biol Chem*, 273, 34868-34874.
- Ifuku, K., Nakatsu, T., Kato, H. & Sato, F. (2004)** Crystal structure of the PsbP protein of photosystem II from *Nicotiana tabacum*. *EMBO Rep*, 5, 362-367.
- Jack, R.L., Sargent, F., Berks, B.C., Sawers, G. & Palmer, T. (2001)** Constitutive expression of *Escherichia coli* *tat* genes indicates an important role for the twin-arginine translocase during aerobic and anaerobic growth. *J Bacteriol*, 183, 1801-1804.
- Jarvis, P. (2008)** Targeting of nucleus-encoded proteins to chloroplasts in plants. *New Phytol*, 179, 257-285.
- Karnauchov, I., Herrmann, R.G. & Klösigen, R.B. (1997)** Transmembrane topology of the Rieske Fe/S protein of the cytochrome *b<sub>6</sub>/f* complex from spinach chloroplasts. *FEBS Lett*, 408, 206-210.
- Kawashima, Y., Miyazaki, E., Müller, M., Tokuda, H. & Nishiyama, K.I. (2008)** Diacylglycerol specifically blocks spontaneous integration of membrane proteins and allows detection of a factor-assisted integration. *J Biol Chem*, doi:10.1074/jbc.M801812200.
- Kim, S.J., Robinson, C. & Mant, A. (1998)** Sec/SRP-independent insertion of two thylakoid membrane proteins bearing cleavable signal peptides. *FEBS Lett*, 424, 105-108.
- Kirwin, P.M., Elderfield, P.D. & Robinson, C. (1987)** Transport of proteins into chloroplasts. Partial purification of a thylakoidal processing peptidase involved in plastocyanin biogenesis. *J Biol Chem*, 262, 16386-16390.
- Kirwin, P.M., Elderfield, P.D., Williams, R.S. & Robinson, C. (1988)** Transport of proteins into chloroplasts. Organization, orientation, and lateral distribution of the plastocyanin processing peptidase in the thylakoid network. *J Biol Chem*, 263, 18128-18132.
- Klösigen, R.B., Brock, I.W., Herrmann, R.G. & Robinson, C. (1992)** Proton gradient-driven import of the 16 kDa oxygen-evolving complex protein as the full precursor protein by isolated thylakoids. *Plant Mol Biol*, 18, 1031-1034.
- 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, 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, 329-333.
- 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, 335-339.
- Kyte, J. & Doolittle, R.F. (1982)** A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*, 157, 105-132.

- 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, 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, 2627-2634.
- Latowski, D., Kruk, J., Burda, K., Skrzynecka-Jaskier, M., KostECKA-Gugala, A. & Strzalka, K. (2002)** Kinetics of violaxanthin de-epoxidation by violaxanthin de-epoxidase, a xanthophyll cycle enzyme, is regulated by membrane fluidity in model lipid bilayers. *Eur J Biochem*, 269, 4656-4665.
- 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, 3789-3793.
- 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, 8930-8934.
- Madueño, F., Bradshaw, S.A. & Gray, J.C. (1994)** The thylakoid-targeting domain of the chloroplast Rieske iron-sulfur protein is located in the N-terminal hydrophobic region of the mature protein. *J Biol Chem*, 269, 17458-17463.
- Mant, A., Schmidt, I., Herrmann, R.G., Robinson, C. & Klösgen, R.B. (1995)** Sec-dependent thylakoid protein translocation.  $\Delta$ pH requirement is dictated by passenger protein and ATP concentration. *J Biol Chem*, 270, 23275-23281.
- 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, 36200-36206.
- Margulis, L. (1971)** The origin of plant and animal cells. *Am Sci*, 59, 230-235.
- Marques, J.P., Dudeck, I. & Klösgen, R.B. (2003)** Targeting of EGFP chimeras within chloroplasts. *Mol Genet Genomics*, 269, 381-387.
- Marques, J.P., Schattat, M.H., Hause, G., Dudeck, I. & Klösgen, R.B. (2004)** *In vivo* transport of folded EGFP by the  $\Delta$ pH/TAT-dependent pathway in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*, 55, 1697-1706.
- 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, 1633-1639.
- Martin, W. & Herrmann, R.G. (1998)** Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and why? *Plant Physiol*, 118, 9-17.

- Michl, D., Karnauchoy, 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, 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, 1310-1317.
- Mitra, K., Frank, J. & Driessen, A. (2006)** Co- and post-translational translocation through the protein-conducting channel: analogous mechanisms at work? *Nat Struct Mol Biol*, 13, 957-964.
- Molik, S., Karnauchoy, I., Weidlich, C., Herrmann, R.G. & Klösgen, R.B. (2001)** The Rieske Fe/S protein of the cytochrome *b<sub>6</sub>/f* complex in chloroplasts: missing link in the evolution of protein transport pathways in chloroplasts? *J Biol Chem*, 276, 42761-42766.
- Moore, M., Harrison, M.S., Peterson, E.C. & Henry, R. (2000)** Chloroplast Oxalp homolog albino3 is required for post-translational integration of the light harvesting chlorophyll-binding protein into thylakoid membranes. *J Biol Chem*, 275, 1529-1532.
- 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, 205-210.
- Mori, H., Summer, E.J. & Cline, K. (2001)** Chloroplast TatC plays a direct role in thylakoid  $\Delta$ pH-dependent protein transport. *FEBS Lett*, 501, 65-68.
- Mori, H., Summer, E.J., Ma, X. & Cline, K. (1999)** Component specificity for the thylakoidal Sec and Delta pH-dependent protein transport pathways. *J Cell Biol*, 146, 45-56.
- Motohashi, R., Nagata, N., Ito, T., Takahashi, S., Hobo, T., Yoshida, S. & Shinozaki, K. (2001)** An essential role of a TatC homologue of a  $\Delta$ pH- dependent protein transporter in thylakoid membrane formation during chloroplast development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 10499-10504.
- Mould, R.M., Shackleton, J.B. & Robinson, C. (1991)** Transport of proteins into chloroplasts. Requirements for the efficient import of two luminal oxygen-evolving complex proteins into isolated thylakoids. *J Biol Chem*, 266, 17286-17289.
- Müller, M. & Klösgen, R.B. (2005)** The Tat pathway in bacteria and chloroplasts (review). *Mol Membr Biol*, 22, 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.
- Müller, S.D., De Angelis, A.A., Walther, T.H., Grage, S.L., Lange, C., Opella, S.J. & Ulrich, A.S. (2007)** Structural characterization of the pore forming protein TatA<sub>d</sub> of the twin-arginine translocase in membranes by solid-state <sup>15</sup>N-NMR. *Biochim Biophys Acta*, 1768, 3071-3079.
- Musser, S.M. & Theg, S.M. (2000)** Characterization of the early steps of OE17 precursor transport by the thylakoid  $\Delta$ pH/Tat machinery. *Eur J Biochem*, 267, 2588-2598.

- 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, 31338-31341.
- Netzer, W.J. & Hartl, F.U. (1998)** Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and -independent mechanisms. *Trends Biochem Sci*, 23, 68-73.
- Nielsen, V.S., Mant, A., Knoetzel, J., Møller, B.L. & Robinson, C. (1994)** Import of barley photosystem I subunit N into the thylakoid lumen is mediated by a bipartite presequence lacking an intermediate processing site. Role of the delta pH in translocation across the thylakoid membrane. *J Biol Chem*, 269, 3762-3766.
- Nishiyama, K., Ikegami, A., Moser, M., Schiltz, E., Tokuda, H. & Müller, M. (2006)** A derivative of lipid A is involved in signal recognition particle/SecYEG-dependent and -independent membrane integrations. *J Biol Chem*, 281, 35667-35676.
- Pop, O.I., Westermann, M., Volkmer-Engert, R., Schulz, D., Lemke, C., Schreiber, S., Gerlach, R., Wetzker, R. & Müller, J.P. (2003)** Sequence-specific binding of prePhoD to soluble TatA<sub>d</sub> indicates protein-mediated targeting of the Tat export in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*, 278, 38428-38436.
- Richter, S., Lindenstrauss, U., Lücke, C., Bayliss, R. & Brüser, T. (2007)** Functional Tat transport of unstructured, small, hydrophilic proteins. *J Biol Chem*, 282, 33257-33264.
- Robinson, C., Cai, D., Hulford, A., Brock, I.W., Michl, D., Hazell, L., Schmidt, I., Herrmann, R.G. & Klösgen, R.B. (1994)** The presequence of a chimeric construct dictates which of two mechanisms are utilized for translocation across the thylakoid membrane: evidence for the existence of two distinct translocation systems. *Embo J*, 13, 279-285.
- Robinson, C. & Ellis, R.J. (1984)** Transport of proteins into chloroplasts. Partial purification of a chloroplast protease involved in the processing of imported precursor polypeptides. *Eur J Biochem*, 142, 337-342.
- Robinson, D., Karnauchov, I., Herrmann, R.G., Klösgen, R.B. & Robinson, C. (1996)** Protease-sensitive thylakoidal import machinery for the Sec-, ΔpH- and signal recognition particle-dependent protein targeting pathways, but not for CF<sub>0</sub>II integration. *Plant Journal*, 10, 149-155.
- Robson, A. & Collinson, I. (2006)** The structure of the Sec complex and the problem of protein translocation. *EMBO Rep*, 7, 1099-1103.
- 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, 13223-13228.
- Sambrook, J. & Russell, D. (2000)** Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3 edn. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 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, 637-641.

- 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, 101-112.
- Sargent, F. (2007)** The twin-arginine transport system: moving folded proteins across membranes. *Biochem Soc Trans*, 35, 835-847.
- 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, 3640-3650.
- 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, 36073-36082.
- Schatz, G. & Dobberstein, B. (1996)** Common principles of protein translocation across membranes. *Science*, 271, 1519-1526.
- 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, 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, 10312-10316.
- Schünemann, D. (2007)** Mechanisms of protein import into thylakoids of chloroplasts. *Biol Chem*, 388, 907-915.
- Seelig, J. (2004)** Thermodynamics of lipid-peptide interactions. *Biochim Biophys Acta*, 1666, 40-50.
- Sessa, G. & Weissmann, G. (1968)** Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *J Lipid Res*, 9, 310-318.
- 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, 1467-1470.
- Shanmugham, A., Wong Fong Sang, H.W., Bollen, Y.J. & Lill, H. (2006)** Membrane binding of twin arginine preproteins as an early step in translocation. *Biochemistry*, 45, 2243-2249.
- Smeekens, S., Bauerle, C., Hageman, J., Keegstra, K. & Weisbeek, P. (1986)** The role of the transit peptide in the routing of precursors toward different chloroplast compartments. *Cell*, 46, 365-375.
- 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, 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, 4059-4066.
- Tissot, G., Canard, H., Nadai, M., Martone, A., Botterman, J. & Dubald, M. (2008)** Translocation of aprotinin, a therapeutic protease inhibitor, into the thylakoid lumen of genetically engineered tobacco chloroplasts. *Plant Biotechnol J*, 6, 309-320.
- 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, 15000-15007.
- Voelker, R. & Barkan, A. (1995)** Two nuclear mutations disrupt distinct pathways for targeting proteins to the chloroplast thylakoid. *Embo J*, 14, 3905-3914.
- von Heijne, G. (1990)** The signal peptide. *J Membr Biol*, 115, 195-201.
- von Heijne, G., Steppuhn, J. & Herrmann, R.G. (1989)** Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur J Biochem*, 180, 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, 267-276.
- Webb, M.S. & Green, B.R. (1991)** Biochemical and biophysical properties of thylakoid acyl lipids. *Biochim Biophys Acta*, 1060, 133-158.
- Weeden, N.F. (1981)** Genetic and biochemical implications of the endosymbiotic origin of the chloroplast. *J Mol Evol*, 17, 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, 93-101.
- Wessel, D. & Flüggé, U.I. (1984)** A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem*, 138, 141-143.
- Westermann, M., Pop, O.I., Gerlach, R., Appel, T.R., Schlörmann, W., Schreiber, S. & Müller, J.P. (2006)** The TatA<sub>d</sub> component of the *Bacillus subtilis* twin-arginine protein transport system forms homo-multimeric complexes in its cytosolic and membrane embedded localisation. *Biochim Biophys Acta*, 1758, 443-451.
- 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, 785-794.
- Wu, L.F., Ize, B., Chanal, A., Quentin, Y. & Fichant, G. (2000)** Bacterial twin-arginine signal peptide-dependent protein translocation pathway: evolution and mechanism. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2, 179-189.
- Yuan, J., Henry, R., McCaffery, M. & Cline, K. (1994)** SecA homolog in protein transport within chloroplasts: evidence for endosymbiont-derived sorting. *Science*, 266, 796-798.

**Zhou, J. & Xu, Z. (2005)** The structural view of bacterial translocation-specific chaperone SecB: implications for function. *Mol Microbiol*, 58, 349-357.

## 5 Anhang

### 5.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	TatA
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
B	TatB
BN	blau nativ (engl. <i>blue native</i> )
C	TatC
cp	chloroplastidär
C-Terminus	Carboxyterminus
ca.	circa
DAG	Diacylglycerin
$\Delta G$	Änderung der Freien Enthalpie
DGDG	Digalactosyldiacylglycerin
$\Delta pH$	Protonengradient
$\Delta \Psi$	elektrochemischer Gradient
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
engl.	Englisch
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
His-Tag	Hexahistidin-Anhang
HM	HEPES-Magnesium
kDa	Kilodalton
kJ	Kilojoule
LHC	Lichtsammelkomplex (engl. <i>light harvesting complex</i> )
m	reifes Protein (engl. <i>mature Protein</i> )
M	Molar
MGDG	Monogalactosyldiacylglycerin

---

min	Minute
mol	Stoffmenge Mol
N-Terminus	Aminoterminus
NaBr	Natriumbromid
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
NaSCN	Natriumthiocyanat
NTP	Nukleosid-5'-triphosphat
p	Vorläuferprotein (engl. <i>precursor protein</i> )
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	engl. <i>phosphate-buffered saline</i>
PC	Phosphatidylcholin
PDB	Protein Datenbank (engl. <i>Protein Data Bank</i> )
PG	Phosphatidylglycerin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PI	Phosphatidylinositol
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>rounds per minute</i> )
Sec	engl. <i>secretory</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPP	stromale Prozessierungspeptidase
SRP	Signalerkennungspartikel (engl. <i>signal recognition particle</i> )
SQDG	Sulfoquinovosyldiacylglycerin
Tat	engl. <i>twin-arginine translocation</i>
Ti-1	Translokationsintermediat-1
Ti-2	Translokationsintermediat-2
TPP	Thylakoidprozessierungspeptidase
x g	x-faches der Erdschwerebeschleunigung

## 5.2 Publikationsliste

**Frielingsdorf, S. & Klösgen, R.B. (2007)** Prerequisites for terminal processing of thylakoidal Tat substrates. *J Biol Chem*, 282, 24455-24462.

**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, 333-347.

**Hou, B., Frielingsdorf, S. & Klösgen, R.B. (2006)** Unassisted membrane insertion as the initial step in  $\Delta$ pH/Tat-dependent protein transport. *J Mol Biol*, 355, 957-967.

**Klösgen, R.B., Molik, S., Frielingsdorf, S., Gutensohn, M., Jakob, M., Marques, J.P. & Hou, B. (2004)** Protein transport across the thylakoid membrane. *Endocytobiosis Cell Res*, 15, 518-526.

## Danksagung

Ich danke Rabe Klösgen für die Überlassung des überaus interessanten Themas, seine stetige Bereitschaft das bestehende Arbeitsmodell wieder in Frage zu stellen und die überaus großzügigen Möglichkeiten und Freiheiten bei der Bearbeitung dieses Themas.

Ich bedanke mich bei Mario für die gereinigten Antikörper, die am Ende der Arbeit doch noch mal essentiell waren.

Vielen Dank auch an Frau Rose, Frau Kuhnert und Birgit, deren Hilfe auch zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Besonderer Dank gebührt auch Herrn Platzer, der unermüdlich und mit Großer Ausdauer den widrigen Bedingungen bei der Anzucht der Erbsen getrotzt hat und somit die Bereitstellung des grundlegenden Materials für die meisten Experimente sichergestellt hat.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für das sehr angenehme Arbeitsklima und die schöne Zeit. Im Besonderen danke ich allen, die ich in den vergangenen Jahren im Labor, beim Essengehen und Cafétrinken, auf Tagungen und Arbeitsgruppenausflügen, im Büro, bei Filmabenden, in der Disco, in der Kneipe, im Urlaub und allgemein in der Freizeit näher kennen lernen durfte und schätzen gelernt habe. Ich weiß, dass jetzt einige hier gerne noch mal explizit ihren Namen lesen würden. Das würde aber den Rahmen sprengen, weshalb ich an dieser Stelle ganz die „Schweiz“ bin – ich denke aber, dass sich die entsprechenden Personen auch so angesprochen fühlen werden.

Ich möchte mich auch bei meinen Eltern bedanken, die ich zwar die letzten Jahre viel zu selten gesehen habe, die mir aber dies alles ermöglicht haben und immer für mich da sind. Auch meinen Geschwistern danke ich, weil sie immer noch mit mir reden, obwohl ich mich viel zu selten melde.

Mandy sei für die vielen schönen Jahre hier in Halle und ihre lange Freundschaft gedankt – ich hoffe sie wird noch lange währen.

Ich wünschte ich könnte auch Henning danken – ich widme ihm diese Arbeit.

Schließlich möchte ich mich noch bei Andrea bedanken. Für ihre Liebe, Geduld und ihr Verständnis, das sie zeitweise für mich aufbringt, das Korrekturlesen und noch viel viel mehr...

## **Erklärung**

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

Halle (Saale), August 2008

Stefan Frielingsdorf

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Stefan Daniel Frielingsdorf  
Geburtstag und -ort: 3. Mai 1979 in Lahr/Schwarzwald  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig  
Adresse: Breite Straße 15 ab 09/2008: Greifswalder Straße 43a  
06108 Halle 10405 Berlin

## Ausbildung

ab 09/2008 Wissenschaftlicher Mitarbeiter/Postdoc in der Arbeitsgruppe Prof. Friedrich am Institut für Biologie – Mikrobiologie der Humboldt-Universität zu Berlin

seit 2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter/Doktorand in der Arbeitsgruppe Prof. Klösgen am Institut für Biologie – Pflanzenphysiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Thema: Funktionelle Charakterisierung von Teilschritten des Tat-abhängigen Proteintransports an der Thylakoidmembran

02/2004-12/2004 Wissenschaftliche Hilfskraft in der Arbeitsgruppe Prof. Klösgen am Institut für Biologie – Pflanzenphysiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

11/2003 Diplom in Biochemie  
Thema: Charakterisierung der frühen Schritte des  $\Delta pH$ /Tat-abhängigen Proteintransports am Beispiel des chimären 16/23-Proteins

10/1998-11/2003 Studium der Biochemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

06/1998 Abitur

1989-1998 Max-Planck-Gymnasium, Lahr/Schwarzwald

1985-1989 Friedrich-Grundschule, Lahr/Schwarzwald

Halle, August 2008  
Stefan Frielingsdorf