

**Proteintransport in den Chloroplasten:  
Untereinheiten des Tic-Komplexes und ihre  
Funktionen**

**Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Biologie  
an der Ludwig-Maximilian-Universität  
zu München**

**Vorgelegt von**

**Friederike Hörmann**

**München  
21.10.2005**

1. Gutachter: Prof. Dr. Soll
2. Gutachter: PD Dr. Engstler

Tag der mündlichen Prüfung: 07.12.2005

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit entstand am Botanischen Institut der Ludwig-Maximilian-Universität zu München in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jürgen Soll. Bei ihm möchte ich mich sowohl für die Bereitstellung des Themas bedanken, als auch für sein ständiges Interesse am Verlauf der Arbeit.

Dr. Michael Küchler und Dr. Lisa Heins sei für manchen Ratschlag und manche seelische Unterstützung aus weiter Ferne gedankt. Lisa, Deine bunten Socken sind super!

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe möchte ich für viele hilfreiche Gespräche und reichhaltige Tips, sowie Unternehmungen jenseits der Arbeit danken.

Insbesondere möchte ich mich bei Tim, Yvonne, Philipp, Anna und Bettina bedanken, die sehr zu einem entspannten Arbeitsklima beigetragen haben. Bettina möchte ich auch für das geduldige Korrekturlesen dieser Arbeit danken.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und Geschwistern, die mich in jeglicher Hinsicht unterstützt haben.

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Material</b>	<b>6</b>
2.1 Enzyme und ‚Kits‘	
2.2 Chemikalien	
2.3 Saatgut	
2.4 Bakterienstämme	
2.5 Vektoren	
2.6 Membranen	
2.7 Oligonukleotide	
2.8 Antiseren	
2.9 Molekulargewichtsstandards und Größenmarker	
2.10 Säulenmaterialien	
<b>3. Methoden</b>	<b>8</b>
<b>3.1 Molekularbiologische Methoden</b>	
3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA	
3.1.2 Isolierung genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	
3.1.3 Verdau von genomischer und Plasmid-DNA	
3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	
<b>3.2 Allgemeine proteinbiochemische Methoden</b>	
3.2.1 TCA-Präzipitation von Proteinen	
3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	
<b>3.3 Verfahren zur Trennung und zum Nachweis von Proteinen</b>	
3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	
3.3.2 Coomassie-Blaufärbung	

**3.3.3 Silberfärbung nach Ansorge**

**3.3.4 Membrantransfer von Proteinen (Western-Blot)**

**3.3.5 Nachweis von Proteinen mit Hilfe von spezifischen Antisera**

**3.4. Überexpression von rekombinantem Protein**

**3.4.1 Überexpression von rekombinantem Protein**

**3.5. Chromatographie**

**3.5.1 Aufreinigung von überexprimiertem Protein über Affinitätschromatographie**

**3.5.2 „Pull-Down Assay“ mit verschiedenen Tic110-Konstrukten**

**3.6 In vitro Proteinimport**

**3.6.1 *In vitro* Transkription und – Translation**

**3.6.2 Isolierung intakter Chloroplasten**

**3.6.3 Proteinimport in isolierte Chloroplasten**

**3.7 Ausgewählte proteinbiochemische Methoden**

**3.7.1 Isolierung von äußerer und innerer Hüllmembranen aus Erbsen-Chloroplasten**

**3.7.2 Immunpräzipitation von Proteinen**

**3.7.3 Quervernetzung von Tic-Komponenten während des Proteinimports**

**3.7.4 Thermolysinbehandlung von Hüllmembranen und Chloroplasten**

**3.7.5 Trypsinbehandlung von Chloroplasten**

**3.7.6 NADP-Synthese und Markierung von Tic32**

**3.7.7 Dehydrogenase-Test**

**3.7.8 Mikroskopie**

**3.8 Elektronenmikroskopie**

**4. Ergebnisse**

**16**

**4.1 Tic110**

**4.1.1 Topologiemodelle von Tic110**

- 4.1.2 CD-Spektrum**
- 4.1.3 Proteolytischer Verdau von chloroplastidären inneren Hüllmembranen**
- 4.1.4 Proteolytischer Verdau ganzer Chloroplasten**
- 4.1.5 Kristallisation von Tic110**
- 4.2 Interaktionen von Tic110C**
  - 4.2.1 Der C-Terminus von Tic110 interagiert mit HSP93 und HSP70**
- 4.3 Tic110 oder Tic20 die Pore der chloroplastidären Hüllmembran?**
  - 4.3.1 Relative Mengenbestimmung von Tic Komponenten in isolierten chloroplastidären Hüllmembranen**
- 4.3 IEP32**
  - 4.3.1 Identifizierung von Tic110N Interaktionspartnern**
- 4.4 Zugehörigkeit von IEP32 zum Tic Komplex**
  - 4.4.1 IEP32 ist eine Komponente des Tic-Komplex**
  - 4.4.2 IEP32 ist am Proteinimport beteiligt**
- 4.5 Tic32 hat Dehydrogenaseeigenschaften**
  - 4.5.1 Tic32 bindet Nukleotide**
  - 4.5.2 Tic32 ist eine aktive Dehydrogenase**
- 4.6 Charakterisierung von T-DNA Insertionslinien des Tic32 in Arabidopsis thaliana**
  - 4.6.1 Tic32 Knock-out Pflanzen**
  - 4.6.2 Elektronenmikroskopie von Chloroplasten der Tic32 Mutante**
- 4.7 Proteinimportstudien**
  - 4.7.1 Der Import von FNR-Isologen in den Chloroplasten lässt sich durch die Gabe von deamino-NAD und HAR beeinflussen**
  - 4.7.2 Der Redoxzustand des Chloroplasten beeinflusst den Proteinimport von FNR-und Fd-Isologen**

## **5. Diskussion**

**43**

- 5.1 Tic110**
  - 5.1.1 Topologie und Struktur von Tic110**
- 5.2 Charakterisierung von IEP32**
  - 5.2.1 IEP32 interagiert mit dem N-Terminus von Tic110**

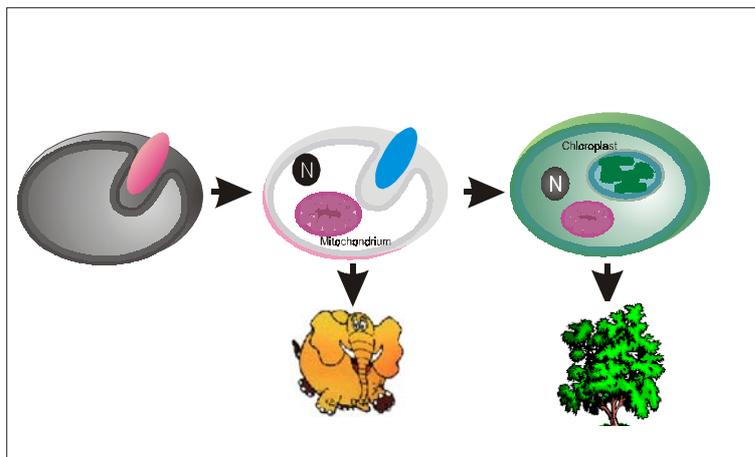
**5.2.2 Tic32 T-DNA Insertionslinien sind Embryo-letal**

**5.2.3 Der Import von FNR- und Ferredoxin-Isologen lässt sich über den Redoxzustand des Chloroplasten beeinflussen**

<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>52</b>
<b>7. Literatur</b>	<b>53</b>
<b>8. Anhang</b>	<b>60</b>

## 1. Einleitung

Chloroplasten sind ebenso wie Mitochondrien aus ehemals freilebenden Prokaryoten hervorgegangen (Schwartz und Dayhoff, 1978). Eine eukaryotische Wirtszelle hat einen cyanobakteriellen Vorfahren aufgenommen. Dieser wurde im Laufe der Evolution als Endosymbiont in die Wirtszelle integriert. Mit der Zeit fand ein massiver Gentransfer vom Genom des Endosymbionten in den Kern der Wirtszelle statt (Martin und Herrmann, 1998). Das Plastidengenom selber codiert nur noch für zehn bis 200 Proteine (Abdallah et al., 2000). Folglich werden >95% aller plastidären Proteine im Cytosol translatiert und müssen posttranslational in den Chloroplasten transportiert werden.



**Abb.1: Entstehung von Mitochondrien und Chloroplasten.** Zunächst nahm eine Wirtszelle ein Proteobakterium auf, aus dem sich dann das Mitochondrium entwickelte. Später nahmen einige dieser Wirtszellen ein Cyanobakterium auf, aus dem dann der Chloroplast hervorging.

Um die zahlreichen biochemischen Funktionen des Chloroplasten, wie Photosynthese, Aminosäuresynthese und Lipidbiosynthese aufrechterhalten zu können, musste ein Mechanismus entwickelt werden, der einen reibungslosen Transport der kernkodierten Proteine in den Plastiden gewährleistet. Ein Importapparat in beiden Hüllmembranen ermöglicht die Translokation von Vorstufenproteinen in den Chloroplasten. Der Toc-Komplex (translocon at the outer envelope of chloroplasts) ermöglicht den Transport über die äußere Membran und der Tic-Komplex (translocon at the innner envelope of chloroplasts) transportiert das Vorstufenprotein in das Stroma oder in die innere Membran (Soll und Schleiff, 2004). Ähnlich wie Proteine, die in Mitochondrien oder in das Endoplasmatische Retikulum transportiert werden, tragen fast alle chloroplastidären Vorstufenproteine eine N-terminale, abspaltbare Extension (Transitpeptid) zur organellspezifische Zielsteuerung (Blobel, 1979). Dieses Transitpeptid ist sowohl notwendig als auch ausreichend für den Transport zum und in den Plastiden (Keegstra et al., 1989). Die meisten Proteine der äußeren chloroplastidären Hüllmembran (OEP) besitzen kein abspaltbares Transitpeptid (Blobel, 1979; Soll und Tien, 1998). Die Information zum Transport in den Plastiden sitzt wahrscheinlich in

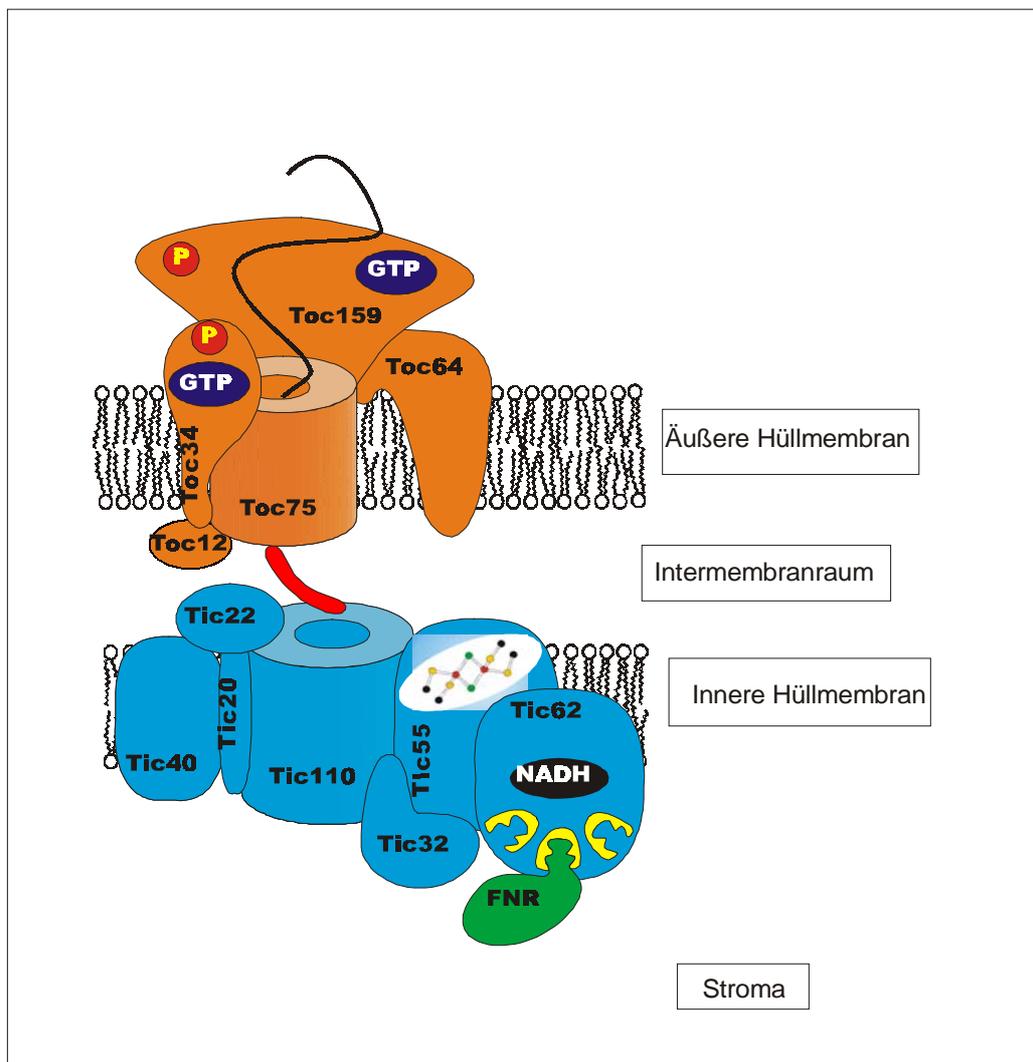
einer internen Signalsequenz im Protein. Inzwischen sind auch Proteine der inneren Hüllmembran bekannt, die keine abspaltbare Transitsequenz besitzen und dennoch importiert werden (Nada und Soll, 2004). Obwohl die Transitpeptide verschiedener Vorstufenproteine sich im Hinblick auf Aminosäuresequenz und Länge nur wenig ähneln, gibt es einige Gemeinsamkeiten: 1. Transitpeptide sind angereichert mit hydroxylierten Aminosäuren wie Serin oder Threonin. 2. Sie sind aus kleinen hydrophoben Aminosäuren aufgebaut, welches im allgemeinen in einer positiven Ladung resultiert. 3. In wässrigen Lösungen liegen Transitpeptide unstrukturiert vor, mit einem geringen Anteil von  $\beta$ -Faltblättern. Treffen sie auf eine hydrophobe Umgebung, wie z.B. Lipide, nehmen sie *in vitro* eine helikale Struktur an (Bruce, 2001).

Eine Besonderheit für plastidäre Vorstufenproteine, die sie von mitochondrialen Transitpeptiden unterscheidet, ist die Phosphorylierung von Serinen oder Threoninen innerhalb des Transitpeptids (Waegemann und Soll, 1996). Diese phosphorylierten Vorstufenproteine werden wahrscheinlich in einem Komplex aus 14-3-3 Proteinen und HSP70 zur Oberfläche des Chloroplasten transportiert (May und Soll, 2000). Dort werden sie vor dem Import in den Chloroplasten dephosphoryliert.

Vorstufenproteine werden am Chloroplasten zunächst von dem Rezeptor Toc34 in Abhängigkeit von GTP erkannt (Sveshnikova et al., 2000b). Das Binden des Vorstufenproteins stimuliert die GTPase-Funktion von Toc34 und während der GTP-Hydrolyse wird das Vorstufenprotein vom Toc34<sub>GDP</sub> auf Toc159 übertragen (Jelic et al., 2002). Toc159 besteht aus drei Domänen. Die N-terminale A-Domäne, die aus zahlreichen sauren Aminosäuren besteht; die zentrale G-Domäne, welche die GTP-Bindestelle beinhaltet und die C-terminale M- oder Membran-Domäne (Bauer et al., 2000; Hiltbrunner et al., 2001). Die M-Domäne übernimmt das Vorstufenprotein von Toc34 und unter erneuter GTP-Hydrolyse wird das Vorstufenprotein dann durch den Kanal der äußeren Hüllmembranen, Toc75, geschoben (Schleiff et al., 2003). Toc75 wurde *in vitro* als spannungsabhängiger Kanal charakterisiert, der eine spezifische Bindestelle für Vorstufenproteine aufweist (Hinnah et al., 2002). Der Kanal wird von 16  $\beta$ -Faltblättern gebildet (Sveshnikova et al., 2000a). Toc64 wurde erst kürzlich charakterisiert (Sohrt und Soll, 2000). Es dient wahrscheinlich, ähnlich wie Toc34 und Toc159 als Rezeptor. Es enthält drei TPR-Motive, die Protein-Protein Wechselwirkung vermitteln. Denkbar wäre, dass dieser Rezeptor für die Erkennung des „Guidance-Komplex“ verantwortlich ist. Toc12 ist die neueste Komponente des Toc-Komplex. Toc12 ist an der dem Intermembranraum zugewandten Seite der äußeren chloroplastidären Hüllmembran lokalisiert und es wird diskutiert, dass Toc12 zusammen mit

Tic22 und einem HSP70 einen Intermembranraumkomplex bildet, der die Proteintranslokation durch den Intermembranraum bis zum Tic-Komplex gewährleistet (Becker et al., 2004) Ähnliche Systeme gibt es im ER mit Bip und Sec63 und im Mitochondrium mit dem Pam-Komplex (Corsi und Schekman, 1997; Rehling et al., 2004).

In den meisten Fällen geschieht die Translokation von Vorstufenproteinen wahrscheinlich gleichzeitig durch Toc und Tic (Alefsen et al., 1994; Schnell und Blobel, 1993). Der Transport über die innere Hüllmembran benötigt ATP, welches wahrscheinlich für Chaperone im Stroma gebraucht wird, die für eine vollständige Translokation notwendig sind (Schleiff und Soll, 2000)



**Abb.2: Schema des Proteinimports über die äußere und innere Hüllmembran von Chloroplasten.** Der Toc-Komplex (translocon at the outer envelope of chloroplasts) transportiert die Proteine als Vorstufenproteine über die äußere Hüllmembran, der Tic-Komplex (translocon at the inner envelope of chloroplasts) transportiert die Proteine über die innere Hüllmembran. Die Zahlen geben das jeweilige Molekulargewicht der Komponenten an.

Bis jetzt sind sieben Tic-Komponenten identifiziert, deren Funktion weitgehend ungeklärt ist. Tic110 ist die erste Komponente, für die eine Beteiligung am Import über Co-

Immunopräzipitation mit Vorstufenproteinen gezeigt wurde (Akita et al., 1997; Lubeck et al., 1996). Es hat laut Computervorhersage ein oder zwei hydrophobe  $\alpha$ -helikale Transmembrandomänen im N-Terminus, die das Protein in der inneren Membran verankern. Die Topologie und Funktion des 80 kDa großen C-Terminus ist noch nicht geklärt. Im Intermembranraum scheint Tic110 in der Nähe vom Toc-Komplex zu sein, da es mit Toc75 aufgereinigt werden kann (Akita et al., 1997; Kessler und Blobel, 1996; Lubeck et al., 1996; Nielsen et al., 1997). Auf der stromalen Seite kann Tic110 mit Chaperonen wie HSP93 oder Chaperonin60 interagieren (Akita et al., 1997; Jackson et al., 1998). Rekonstitution von rekombinant exprimiertem Tic110 zeigte, dass Tic110 einen Kationen-selektiven Kanal in Lipid-Bilayern bildet (Heins et al., 2002). Der Kanal hat einen Durchmesser von 15-20 Å, ähnlich wie Toc75.

Zusammen mit Tic110 können die beiden Komponenten Tic55 und Tic62 in einem Kern-Komplex über Blau-Native-Polyacrylgelelektrophorese isoliert werden (Kuchler et al., 2002). Tic55 hat ein Eisen-Schwefel-Zentrum und eine mononukleare Eisenbindestelle (Caliebe et al., 1997). Diese Domänen sind für Untereinheiten bakterieller Oxygenasen charakteristisch (Mason und Cammack, 1992). Nach DEPC Inkubation von Chloroplasten war ein importhemmender Effekt zu sehen (Caliebe et al., 1997). Oshini und Mitarbeiter (1994) konnten zeigen, dass DEPC den Elektronentransport am Komplex III der mitochondrialen Atmungskette durch Modifikationen des Rieske-Eisen-Schwefel-Zentrum hemmt. Tic62 weist eine konservierte NADP-Bindestelle auf. Der C-terminale Teil weist ins Stroma und kann dort mit der Ferredoxin-NADP-Oxidoreductase (FNR) interagieren (Kuchler et al., 2002). Die FNR koppelt den photosynthetischen Elektronenfluss mit der Reduktion des chloroplastidären NADP-Pools. Da NADP(H) vornehmlich in CO<sub>2</sub>-Fixierung, Nitrat- und Schwefelreduktion, sowie Fettsäure- und Isoprenoidsynthese eine Rolle spielt, wurde spekuliert, ob die Interaktion von FNR und Tic62 das NADP/NADP(H)-Verhältnis mit dem Proteinimport koppelt und somit reguliert. Unterstützung für diese Theorie kommt von Hirohashi und Mitarbeitern (2000), die verschiedene Ferredoxin-Isoformen im Licht und im Dunkeln importierten. Ferredoxin I ist involviert in photosynthetischen Elektronenfluss und wird sowohl im Licht als auch im Dunkeln importiert. Ferredoxin III ist mehr an metabolischen Prozessen im Chloroplasten beteiligt und wird im Licht in den Intermembranraum fehlgeleitet. Ferredoxin III wird nur im Dunkeln korrekt in das Stroma importiert (Hirohashi et al., 2001). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Proteinimport über die innere chloroplastidäre Hüllmembran redoxreguliert sein könnte.

Tic40 wurde über seine Interaktion mit Vorstufenproteinen in Quervernetzungsexperimenten identifiziert (Ko et al., 1995). Antikörper gegen Tic40 fällen Tic110 (Stahl et al., 1999). Die C-terminale Region ist dem Stroma zugewandt und scheint zwei funktionelle Domänen zu haben. Zum einen gibt es Homologien zu HSP70 interagierenden Proteinen und HSP70/HSP90 organisierenden Proteinen, zum Anderen findet man eine Tetratricopeptid-Domäne für Protein-Protein Wechselwirkungen (Chou et al., 2003; Stahl et al., 1999). Tic40 könnte also die für den Import notwendigen Chaperone rekrutieren.

Zu Tic22 und Tic20 ist nicht viel bekannt (Kouranov et al., 1998). Tic22 ist an der dem Intermembranraum zugewandten Seite der inneren Hüllmembran lokalisiert und ist eventuell zusammen mit dem sogenannten Intermembranraum-Komplex dafür zuständig, das Vorstufenprotein am Toc-Komplex zu übernehmen und zum Tic-Komplex zu geleiten (Becker et al., 2004). Tic20 ist ein integrales Membranprotein mit vier vorhergesagten Transmembranhelizes (Kouranov et al., 1998). Diese Eigenschaft und die Ähnlichkeit zu bakteriellen Aminosäuretransportern sowie zu Tim17, dem Importkanal in der inneren Membran von Mitochondrien, geben Anlass zu der Annahme, dass Tic20 an der Porenbildung des Tic-Komplex beteiligt ist (Rassow et al., 1999). Zur Zeit fehlen experimentelle Daten, die diese Theorie stützen könnten.

Kürzlich wurde über Affinitätschromatographie mit dem N-Terminus von Tic110 ein weiteres Protein identifiziert: IEP32. IEP32 gehört zur Klasse der „short-chain“ Dehydrogenasen und wäre neben Tic55 und Tic62 eine weitere Redox-Komponente des Tic-Komplex. Ziel dieser Arbeit war es, eine Zugehörigkeit zum Tic-Komplex für IEP32 zu zeigen und den Einfluss von unterschiedlichen Redoxzuständen des Chloroplasten auf den Proteinimport zu untersuchen. Ausserdem sollte die Topologie von Tic110 erneut untersucht werden.

## 2. Material

### 2.1 Enzyme und ‚Kits‘

Die verwendeten Enzyme wurden von den Firmen MBI Fermentas (St.Leon-Rot), New England Biolabs (Boston, USA) und Eppendorf (Hamburg) bezogen.

Zur DNA-Isolierung wurden das Plasmid-Midi-Kit von Macherey und Nagel (Düren), sowie das Plasmid-Mini-Kit von Eppendorf (Hamburg) verwendet

### 2.2 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in höchster Qualität von namhaften Herstellern bezogen.

### 2.3 Saatgut

Die Tic32-Mutanten von *Arabidopsis thaliana* wurden von Syngenta (USA) sowie GABI (Köln) erworben, die Mutanten von Tic62 und Tic55 wurden von Syngenta (USA) bezogen.

Erbsen-Samen der Sorten var.Violetta, var.Golf wurden von Raiffeisen AG Kiel und Bayerische Futtersaatbau (Ismaning) erworben.

### 2.4 Bakterienstämme

Es wurden die *E.coli*-Stämme DH5 $\alpha$  von GibcoBRL (Eggenstein) und BL21 von Novagen (Madison, USA) bezogen.

### 2.5 Vektoren

Der Vektor pET21d wurde von Novagen (Madison, USA) erworben, die Vektoren pSP64 und pSP65 wurden von Promega (Madison, USA) bezogen.

### 2.6 Membranen

Nitrozellulose-Membranen (Protran BA-S83, 0,2 $\mu$ m) wurden von der Firma Schleicher&Schüll (Dassel), PVDF-Membranen (Polyvinylfluorid; Hybond<sup>TM</sup>-PVDF) von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) und Sterilfilter (FiltropurS 0,2; Pore size 0,2 $\mu$ m) von Sarstedt (Nürnberg) bezogen.

### 2.7 Oligonukleotide

Oligonukleotide, die für die RT-PCR an *Arabidopsis thaliana* verwendet wurden

at32RTfor	5`-cacgtgaaagcaaacgagaa-3`
at32RTback	5`-tgctgaaatcccaaaccttc-3`
3'trailerat4g11410	5`-gggtcgattgataatgaaaaaaaa-3`
5'leaderat4g11410	5`-gttggtttggttgagattagact-3`
ACT2/7f	5`-atggccgatggtgaggatattcag-3`
ACT2/7r	5`-ttagaagcatttctctgaacaatcg-3`

Oligonukleotide, die für das Screening der T-DNA Insertionslinien verwendet wurden

atTic32rev	cagaagtttagcaacagaaatg
atTic32for	acagcgcgtgttctttcactg

## 2.8 Antiseren

$\alpha$ -Tic110	(AG Soll)	$\alpha$ -Tic40	(AG Soll)
$\alpha$ -Tic62	(AG Soll)	$\alpha$ -Tic32	(AG Soll)
$\alpha$ -Toc75	(AG Soll)	$\alpha$ -Tic22	(AG Soll)
$\alpha$ -Tic55	(AG Soll)	$\alpha$ -Toc34	(AG Soll)
Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-AP-Konjugat		Sigma (Deisenhofen)	
Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-Biotin-Konjugat		Sigma (Deisenhofen)	

## 2.9 Molekulargewichtsstandards und Größenmarker

Für die denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese wurden sowohl der „Low Molecular Weight“ Standart bestehend aus  $\alpha$ -Lactalbumin, Trypsin-Inhibitor, Trypsinogen, Carboanhydrase, Glyceraldehyd-3-Dehydrogenase, Hühnerei-Albumin und Rinderserumalbumin sowie das „MW-SDS-700L“ Kit der Firma Sigma (Deisenhofen) eingesetzt. Zur Abschätzung der Fragmentgrößen von über Agarosegelelektrophorese aufgetrennter DNA wurde mit EcoRI und HindIII restringierte  $\lambda$ -Phagen DNA eingesetzt.

## 2.10 Säulenmaterialien

Die Aufreinigung rekombinanter Proteine mit einem Histidin<sub>6</sub>-Rest erfolgte über Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose von Quiagen (Hilden) oder alternativ über Ni-FastFlow von Amersham (Freiburg). Für die Immunopräzipitation wurden Protein-A Glas Beads von Millipore (Billerica, USA) eingesetzt. Für weitere Aufreinigungsschritte von rekombinantem Protein wurde der Kationen Austauscher von Amersham (Freiburg) verwendet.

## 3. Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA der Vektoren wurde mittels des Plasmid-Mini-Kits von Eppendorf (Hamburg) oder des Plasmid-Midi-Kits von Macherey und Nagel (Düren) isoliert.

Plasmid-DNA zur Kontrolle der Subklonierung eines Inserts wurde nach dem Protokoll von Zhou und Mitarbeitern (Zhou et al., 1990) präpariert. Nach Anzucht der Bakterien über Nacht wurden die Zellen aus jeweils 1,5ml pelletiert und das Pellet in 100µl TE (50mM Tris/HCl pH 8.0; 1mM EDTA pH 8.0) aufgenommen. Nach Zugabe von 300µl TENS (10mM Tris/HCl pH 8.0; 1mM EDTA pH 8.0; 0,5% SDS; 0,1% NaOH) und 1µl Rnase, wurde die Suspension gut gemischt, mit 150ml 3M NaAc pH 5.2 versetzt, und der Ansatz für 7 min bei 18000 x g zentrifugiert. Die DNA im Überstand wurde nach Zugabe von 1ml 100% Ethanol präzipitiert und durch Zentrifugation für 5 min bei 18000xg pelletiert. Das Pellet wurde 2x in 70% Ethanol gewaschen, in 20µl Tris pH 8.0 aufgenommen und bei 20°C gelagert.

#### 3.1.2 Isolierung genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

Zur Isolierung genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana* wurden von jeweils einem Pflänzchen einige Blättchen gezupft und in einem Eppendorf-Gefäß gesammelt. Die Blättchen wurden mit Hilfe eines elektrischen Potters (RW 20DZM, Ika Labortechnik) zerkleinert. Nach Zugabe von 400µl Isolationsmedium (0,2mM Tris/HCl pH 7,5; 0,025mM EDTA pH 8.0; 0,5% SDS; 0,25mM NaCl) wurde der Ansatz bei Raumtemperatur für 3-5 min inkubiert und anschließend für 5 min bei 12000xg zentrifugiert. 300µl des Überstandes wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, mit 300µl Isopropanol versetzt und für 15 min bei 18000 x g zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde in 100µl 10mM Tris pH 8.0 aufgenommen. Es wurde jeweils 1/30 der DNA-Menge für einen PCR-Ansatz verwendet.

#### 3.1.3 Verdau von genomischer und Plasmid-DNA

Für einen quantitativen Ansatz wurde in 100µl Endvolumen verdaut, für einen qualitativen Ansatz in 20µl.

Der Ansatz enthielt 50-110ng zu verdauende DNA, die Restriktionsenzyme, den entsprechenden Puffer und H<sub>2</sub>O. Von den Enzymen wurden 5-10 U dazugegeben. Der Ansatz wurde für 90 min bei 37°C inkubiert, anschließend einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen und das Pellet in 20µl 20mM Tris pH 8.0 aufgenommen. Der Verdau wurde auf einem 1% Agarose-Gel überprüft (Sambrook et al., 1989).

### **3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die PCR wurde zum Vervielfältigen bestimmter DNA-Abschnitte und zum Einführen von Restriktionsstellen in DNA-Fragmente eingesetzt. Die Amplifikation der Fragmente erfolgte durch 30 sek Denaturierung bei 94°C, 1 min Hybridisierung bei einer Temperatur, die 5-7°C unter der Schmelztemperatur der Oligonukleotide lag, und schließlich 1-3 min Synthese der DNA bei 68°C-72°C. Dieser Zyklus wurde 25-40 x wiederholt.

## **3.2 Allgemeine proteinbiochemische Methoden**

### **3.2.1 TCA-Präzipitation von Proteinen**

Proteine in wässrigen Lösungen wurden durch Zugabe von Trichloressigsäure (Endkonzentration 10% [w/v]) und Inkubation für 30 min auf Eis präzipitiert und durch anschließende Zentrifugation (30 min/15000 x g) sedimentiert. Das resultierende Sediment wurde gegebenenfalls mit 0,5M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> oder 1M Tris-Base neutralisiert.

### **3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Bestimmung des Proteingehalts wurde entsprechend der Methode von Lowry (Lowry et al., 1951) durchgeführt.

## **3.3 Verfahren zur Trennung und zum Nachweis von Proteinen**

### **3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte mit Hilfe denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970) in Trenngelen von 10%-12,5%. Für das Sammelgel wurde 0,5M Tris pH 6.8 verwendet, für das Trenngel 1,5M Tris pH 8.8. Vor dem Auftrag auf das Gel wurden die Proben mit Solubilisierungspuffer (40% Glycerin, 9% SDS, 250mM Tris pH 6.8, 1 Spatelspitze Bromphenolblau) versetzt und 3-5 min bei 96°C inkubiert.

### **3.3.2 Coomassie-Blaufärbung**

Nach der Polyacrylamidgelelektrophorese wurde das Gel für 15 min in Färbelösung (50% Methanol, 7% Essigsäure, 0,18% Coomassie Brilliant Blue R250) unter Schütteln inkubiert und danach solange im Entfärber (40% Methanol, 7% Essigsäure, 3% Glycerin) geschüttelt, bis die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund zu unterscheiden waren. Nach kurzem Wässern wurde das Gel unter Vakuum getrocknet.

### 3.3.3 Silberfärbung nach Ansorge

Zu einer Detektion von Proteinen im Bereich bis zu 2ng wurde das Gel nach der Polyacrylamidgelelektrophorese mindestens eine Stunde in Entfärber (siehe 3.3.2) inkubiert und danach der Silberfärbung nach Ansorge (Ansorge, 1985) unterzogen. Dafür wurde das Gel zunächst in Lösung A (20% Trichloressigsäure, 50% Methanol, 2% Kupferchlorid, 0,1% Formaldehyd) geschüttelt, dann 10 min in Lösung B (10% Ethanol, 5% Essigsäure) und dann 5-10 min in einer Mischung aus Lösung D und E (D:0,1% Kaliumpermanganat, 0,01% Kaliumhydroxid; E:40% KOH). Darauf folgte wieder für 5 min Lösung B, für 10 min Lösung C (10% Ethanol) und anschließend 10 min H<sub>2</sub>O. Das gewässerte Gel wurde dann für 10 min in Lösung F (0,2% Silbernitrat) inkubiert und nach kurzem Spülen mit H<sub>2</sub>O zur Detektion in Lösung G (0,2% Natriumcarbonat) überführt, bis Banden sichtbar wurden. Danach wurde das Gel für eine halbe Stunde in Entfärber geschwenkt und nach kurzem Wässern getrocknet.

### 3.3.4 Membrantransfer von Proteinen (Western-Blot)

Gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden auf Nitrozellulose-Membranen mit einer „semi-dry-blot“-Apparatur von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) transferiert (Towbin et al., 1979). Auf die Kathodenfläche wurden sechs in Kathodenpuffer (25m Tris/HCl pH 7.6; 4mM Aminocaprinsäure, 20% Methanol) getränkte Whatman (0,2mm) gelegt, darauf das ebenfalls in Kathodenpuffer getränkte Gel gefolgt von der in Anodenpuffer 2 (25mM Tris/HCl pH 10.4; 20% Methanol) inkubierten Membran. Darüber wurden drei in Anodenpuffer 2 getränkte Whatman-Papiere und sechs in Anodenpuffer 1 (0,3M Tris/HCl pH 10.4; 20% Methanol) getränkte Whatman gelegt. Zum Schluß wurde die Anode darübergegeben und es wurde für 45-60min transferiert. Die Stromstärke berechnete sich nach der Formel  $0,8 \times g$  Gelfläche.

### 3.3.5 Nachweis von Proteinen mit Hilfe von spezifischen Antisera

Zur Detektion der auf die Membran transferierten Proteine wurde die Membran einer Immundekoration mit spezifischen Antisera unterzogen. Dazu wurde die Membran dreimal 10 min in Sättigungspuffer (100mM Tris/HCl pH 7.4; 160mM NaCl; bis 0,1% Tween20; bis 1% Magermilchpulver (w/v)) abgesättigt und zusammen mit dem Antiserum (1:250, 1:500 oder 1: 1000 in Sättigungspuffer verdünnt) eingeschweißt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach folgten wieder drei Waschschrte in Sättigungspuffer, bevor die Membran dann mit dem sekundären Antikörper in einer Verdünnung von 1:30000 in Sättigungspuffer für 60 min

bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Vor der Detektion erfolgten wieder drei Waschschrte in Sättigungspuffer. Auf die Membran wurde nun 10ml Färbelösung (100mM Tris/HCl pH 9,5; 100mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>) gegeben, der noch 66µl NBT (50mg/ml) und 132µl BCIP (12.5mg/ml) zugefügt wurden. Von dem Antikörper detektierte Proteine wurden als violette Banden sichtbar.

### **3.4. Überexpression von rekombinantem Protein**

#### **3.4.1 Überexpression von rekombinantem Protein**

Die Überexpression aller Konstrukte erfolgte im pET-System und wurde im *E.coli*-Expressionstamm BL21(DE3) durchgeführt. Als Selektionsantibiotikum wurde Ampicillin in einer Konzentration von 0,1mg/ml verwendet. Alle überexprimierten Proteine aggregierten zu Proteineinschlusskörperchen („Inclusionbodies“) und konnten als solche nach Paulsen und Mitarbeitern (Paulsen et al., 1990) aufgereinigt werden. Die Bakterien wurden mit der „French Press“ aufgeschlossen. Dafür wurden die Bakterien sedimentiert, in Lysispuffer (20mM Tris/HCl pH8; 20% Saccharose, 500mM NaCl) aufgenommen und bei 1200psi aufgeschlossen. Die DNA wurde durch Ultraschallbehandlung zerstört. Die Proteineinschlusskörperchen wurden durch Zentrifugation (40000 x g, 30 min, 4°C) von löslichen Bakterienbestandteilen getrennt und nach fünfmaligem Waschen in 20mM Tris/HCl pH 8, 500mM NaCl in diesem Puffer eingefroren oder direkt weiter aufgereinigt.

### **3.5. Chromatographie**

#### **3.5.1 Aufreinigung von überexprimiertem Protein über Affinitätschromatographie**

Alle überexprimierten Proteine waren mit einer C-oder N-terminalen Hexahistidinextension versehen, über die sie mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt werden konnten. Dazu wurden Proteineinschlusskörperchen (siehe 3.4.1) zunächst in 6-8M Harnstoff, 20mM Tris pH 8, 500-1000mM NaCl und 10mM Imidazol denaturiert und bei Raumtemperatur 1h inkubiert. Nicht gelöstes Protein und Membranreste wurden durch Zentrifugation (15000 x g, 10 min) sedimentiert. Das gelöste Protein wurde dann 1h mit Nickelagarose, die vorher im selben Puffer äquilibriert wurde, rotierend inkubiert. Diese Suspension wurde in eine 3ml Leersäule gegeben. Das Säulenmaterial wurde mit 10fachem Säulenvolumen Waschpuffer (20mM Tris/HCl pH 8.0; 500-1000mM NaCl, 20mM Imidazol, 6-8M Harnstoff) gewaschen, und anschließend wurde das gebundene Protein in 5 Schritten mit Elutionspuffer (20mM Tris/HCl pH 8; 6-8M Harnstoff, 500-1000mM NaCl, 150mM Imidazol) eluiert.

### 3.5.2 „Pull-Down Assay“ mit verschiedenen Tic110-Konstrukten

Das „Pull-down Assay“ mit folgenden Tic110-Konstrukten: Tic110N, Tic110mSSU, Tic110Ckurz, Tic110lang, wurde nach Shveshnikov (Dissertation, 2000) und Hörmann und Mitarbeitern (Hormann et al., 2004) durchgeführt. Über die Säulen von den Tic110 C-terminalen Fragmenten wurde statt solubilisierter innere Hüllmembran lösliche Chloroplastenfraktionen gegeben.

## 3.6 In vitro Proteinimport

### 3.6.1 In vitro Transkription und – Translation

Die *in vitro* Transkription erfolgte in 50µl Ansätzen mit folgender Zusammensetzung: 3-5µg linearisierte Plasmid-DNA, 100U entsprechender RNA-Polymerase, 1 x Transkriptionspuffer, 50U RNase-Inhibitor, 1mM DTT, 0,5mgBSA, 0,5mM CAP, je 5mM ATP, CTP und UTP. Nach 20 min Inkubation bei 37°C wurde GTP ad 1,2mM hinzugegeben und der Ansatz für weitere 2 h inkubiert. Die RNA wurde direkt für die *in vitro* Translation in Retikulozytenlysat eingesetzt. Es wurde dazu das „Flexi Rabbit reticulocyte lysate system“ von Promega nach Herstellerangaben verwendet.

### 3.6.2 Isolierung intakter Chloroplasten

Intakte Chloroplasten wurden aus Blättern 9-11 Tage alter Erbsenpflanzen (*Pisum sativum*), die in einer Klimakammer unter Licht-Dunkel-Rhythmus (mindestens 12 h Licht) auf Vermiculit angezogen wurden, isoliert. Die Isolierung erfolgte nach Schindler und Mitarbeitern (Schindler und Soll, 1987). Anschließend wurde die Chlorophyllkonzentration nach Arnon (Arnon, 1949) bestimmt.

### 3.6.3 Proteinimport in isolierte Chloroplasten

Die *in vitro* Translokation von <sup>35</sup>S-markiertem Vorstufenprotein in intakte isolierte Chloroplasten erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 100µl in 330mM Sorbit; 50mM Hepes/KOH pH 7,6; 3mM MgSO<sub>4</sub>; 10mM Methionin; 10mM Cystein; 20mM Kaliumglukonat; 10mM NaHCO<sub>3</sub>; 2% BSA (w/v); und 3mM ATP. Es wurden 1-10% des Reaktionsansatzes an Translationsprodukt eingesetzt. Die Translokation wurde durch die Zugabe von Chloroplasten entsprechend einem Chlorophyllgehalt von 20µg gestartet und für 2-15 min bei 25°C dunkel oder im Licht inkubiert. Anschließend wurden die Chloroplasten durch Zentrifugation (5 min, 4492 x g, 4°C) durch ein 40% Percollkissen (40% Percoll; 330mM Sorbit; 50mM Hepes/KOH pH 7,6) reisoliert und in Waschmedium (330mM Sorbit;

50mM Hepes/NaOH pH 7.6; mM MgCl<sub>2</sub> ) gewaschen oder zur anschließenden Proteasebehandlung in entsprechendem Puffer resuspendiert. Zur Detektion und Analyse <sup>35</sup>S-markierter Proteine wurde nach der Elektrophorese eine Coomassie-Färbung durchgeführt. Die Gele wurden zwischen Filterpapier und Frischhaltefolie getrocknet und auf Röntgenfilmen (Kodak X-Omat AR) oder Phosphoimager-Screens exponiert.

### **3.7 Ausgewählte proteinbiochemische Methoden**

#### **3.7.1 Isolierung von äußerer und innerer Hüllmembranen aus Erbsen-Chloroplasten**

Die Isolierung von getrennten äußeren und inneren Hüllmembranen aus Erbsen-Chloroplasten erfolgte nach der Methode von Keegstra und Youssif in modifizierter Form, wie bei Waegemann und Mitarbeitern (Waegemann et al., 1992) beschrieben. Als Ausgangsmaterial dienten Erbsen, die im Gewächshaus oder im Freiland angezogen wurden.

#### **3.7.2 Immunpräzipitation von Proteinen**

Die Immunpräzipitation von Proteinen erfolgt mit Variationen der Pufferbedingungen nach Mason und Mitarbeitern (Mason et al., 1988). Für diese Experimente wurden die inneren Hüllmembranen pelletiert (256000 x g, 10 min, 4°C), in IP-Puffer (10mM Hepes/NaOH pH7,6; 150mM NaCl) resuspendiert und durch Zugabe von 1,5% Decylmaltosid oder 2% Octylglucosid (w/v) solubilisiert. Der Ansatz wurde dann 1:10 verdünnt und mit 5-10µl eines polyklonalen Antiserums für 60 min inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit in IP-Puffer äquilibrierter Protein A-Sepharose für 60-90 min. Das Material wurde mehrfach gewaschen, die aufgereinigten Proteine wurden mit SDS-Solubilisierungspuffer bei 95°C für 1 min vom Material gelöst. Die Analyse der Immunpräzipitationsexperimente erfolgte über SDS-PAGE und Immundetektion der Proteine nach Westerntransfer.

#### **3.7.3 Quervernetzung von Tic-Komponenten während des Proteinimports**

Die Quervernetzung von Tic-Komponenten wurde verändert nach Chou und Mitarbeitern (Chou et al., 2003) und Akita und Mitarbeitern (Akita et al., 1997) durchgeführt. Isolierte Chloroplasten aus Erbse (20µg Chlorophyll) wurden mit radioaktiv markiertem pSSU für 2 min auf Eis oder für 10 min bei 25°C inkubiert. Zur Quervernetzung wurden die Ansätze mit 0.5mM DSP für 15 min auf Eis inkubiert und die Reaktion wurde durch Zugabe von 25mM Glycin gestoppt. Die Chloroplasten wurden in 25mM Hepes/NaOH pH 7,6; 0,5mM EDTA lysiert und die Membranfraktionen wurden nach Zentrifugation (125000 x g, 30 min) in 1%SDS solubilisiert. Danach wurde verfahren wie in 3.3.1 beschrieben.

Quervernetzungsprodukte wurden durch das  $\beta$ -Mercaptoethanol im SDS-Gelpuffer gespalten. Radioaktiv markierte Proteine wurden mit einem Phosphoimager (Fuji BAS 3000) analysiert.

### **3.7.4 Thermolysinbehandlung von Hüllmembranen und Chloroplasten**

Bei der Thermolysinbehandlung im Anschluß an ein Proteinimportexperiment wurden die Chloroplasten zunächst in 330mM Sorbit; 50mM Hepes/KOH pH 7,6; 0,5mM  $\text{CaCl}_2$  resuspendiert und dann mit 0,2 $\mu\text{g}$  Thermolysin pro  $\mu\text{g}$  Chlorophyll für 20min auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10mM EDTA gestoppt. Die Chloroplasten wurden pelletiert und in 330mM Sorbit; 50mM Hepes/KOH pH 7,6; 5mM EDTA gewaschen.

Zur proteolytischen Degradation exponierter Proteine wurden innere Chloroplastenhüllmembranen in 25mM Hepes/KOH pH 7,6, 5mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,5mM  $\text{CaCl}_2$  mit 0,2 $\mu\text{g}$  Thermolysin pro 1 $\mu\text{g}$  Protein für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proteolyse wurde durch Zugabe von 10mM EDTA beendet. Die Vesikel wurden durch Zentrifugation (256000 x g, 10 min, 4°C) reisoliert, in Solubilisierungspuffer aufgenommen und die Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt. Die Degradation bestimmter Proteine wurde über Immunodetektion kontrolliert.

### **3.7.5 Trypsinbehandlung von Chloroplasten**

Zur Topologiebestimmung chloroplastidärer Proteine wurden intakte Chloroplasten mit Trypsin behandelt. Dazu wurden Chloroplasten entsprechend 15 $\mu\text{g}$  Chlorophyll eingesetzt und 1 $\mu\text{g}$  Trypsin pro 1 $\mu\text{g}$  Chlorophyll. Nach 1,2,5 und 10 min wurde die Proteasereaktion durch Zugabe von 3 $\mu\text{g}$  Trypsin-Inhibitor und 1 $\mu\text{g}$  Pefabloc beendet, der Ansatz wurde einmal gewaschen, die Chloroplasten reisoliert und die Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt. Der proteolytische Abbau bestimmter Proteine wurde über Immunodetektion kontrolliert.

### **3.7.6 NADP-Synthese und Markierung von Tic32**

Für die Herstellung von radioaktiv markiertem NADP wurden 1,5 $\mu\text{M}$   $\text{NAD}^+$ , 0,04 Ci  $\chi\text{-P}^{32}$ -ATP, 2mM  $\text{MnSO}_4$ , 20mM Hepes/NaOH pH 7.6 mit 1,6mg NAD Kinase für 30 min bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Teil des Ansatzes vor der Inkubation für 10 min mit Apyrase behandelt. Der andere Teil wurde nach der Inkubation mit Apyrase behandelt, um freies ATP loszuwerden. Die Kinase wurde durch Erhitzen bei 95° inaktiviert, bei 15000 x g pelletiert und der Überstand wurde auf Dünnschichtplatten aufgetragen, um die Synthese des NADP zu kontrollieren. Dafür wurde eine Dünnschichtchromatographie-Platte mit

Fluoreszenzindikator besprüht und radioaktiv markiertes ATP, „kaltes“ ATP, „kaltes“ NADP und der Überstand wurden vorsichtig aufgetropft. Der Lauf fand in 600mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> statt. Nach dem Lauf wurde ein Film für 30 min aufgelegt.

### **3.7.7 Dehydrogenase-Test**

Für die Aktivitätsmessung von Tic32 wurde das Protein in *E.coli* BL21 (DE3) bei 25°C für 5 Stunden löslich überexprimiert und über Ni-NTA aufgereinigt. Die Aktivität wurde in 1ml KiPO<sub>4</sub>-Puffer gemessen. Dazu wurden 8μM NADH<sub>2</sub> und 100μM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] gegeben, sowie 20μg Tic32 oder chloroplastidäre Hüllmembranen entsprechend 20μg Protein. Die Abnahme von NADH<sub>2</sub> wurde bei 340nm für 3 min beobachtet. In Kontrollansätzen wurde entweder kein Protein eingesetzt oder K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] statt K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>].

### **3.7.8 Mikroskopie**

Samen wurden in Hoyer's Lösung (Lui et al., 1998) inkubiert und geklärte Samen wurden mit Normarski-Lichtmikroskopie Technik analysiert (Axiophot, Zeiss; Jena, Deutschland).

## **3.8 Elektronenmikroskopie**

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden in der Abteilung von Prof.Dr. Gerhard Wanner durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Tic110

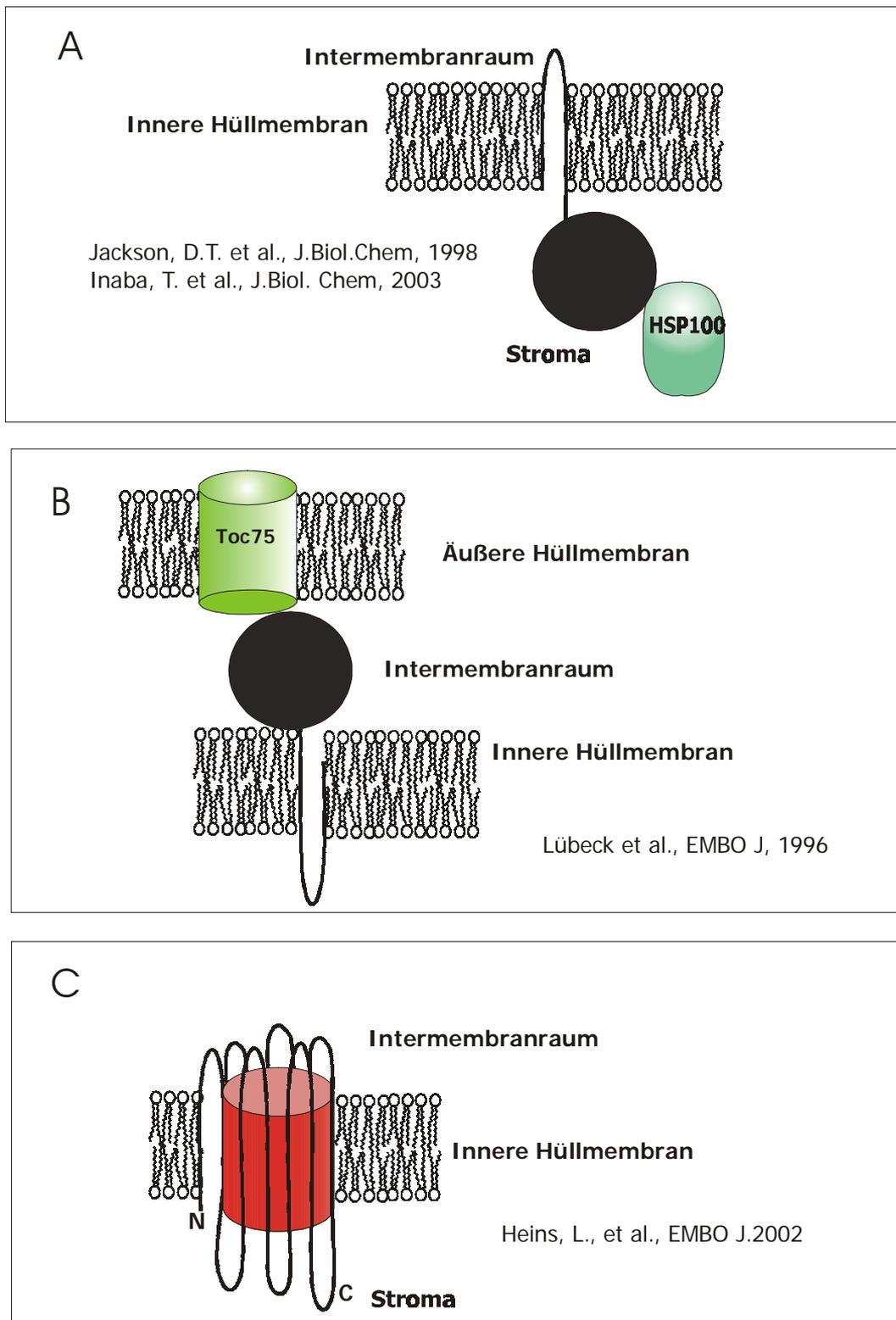
Während die Zugehörigkeit von Tic55, Tic62, Tic22 und Tic20 zum Tic-Komplex diskutiert wird, ist Tic110 die einzige Komponente, die allgemein anerkannt wird. Topologie und Funktion des Proteins werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Modell a) Tic110 ist an der Ausbildung von Translokationsverbindungen zwischen dem Toc- und Tic-Komplex beteiligt, da es in Quervernetzungsexperimenten mit Toc75 und einem Vorstufenprotein gefunden wurde (Akita et al., 1997; Lubeck et al., 1996).

Modell b) Tic110 könnte an der Rekrutierung von Chaperonen aus dem Stroma wie cpn60 und HSP93 beteiligt sein, sie wurden ebenfalls in Quervernetzungsexperimenten zusammen mit Tic110 gefunden (Inaba et al., 2003; Jackson et al., 1998).

Modell c) Eine Funktion des Proteins wurde von Heins und Mitarbeitern *in vitro* gezeigt. Rekombinantes Tic110 bildete in elektrophysiologischen Messungen einen Kationenselektiven Kanal. Daher wurde angenommen, dass Tic110 einen Teil der Translokationspore in inneren chloroplastidären Hüllmembranen darstellt (Heins et al., 2002) In dieser Arbeit wurden verschiedene experimentelle Ansätze weiterverfolgt, die Topologie von Tic110 darzustellen, um dadurch auf die Funktion des Proteins schließen zu können.

#### 4.1.1 Topologiemodelle von Tic110

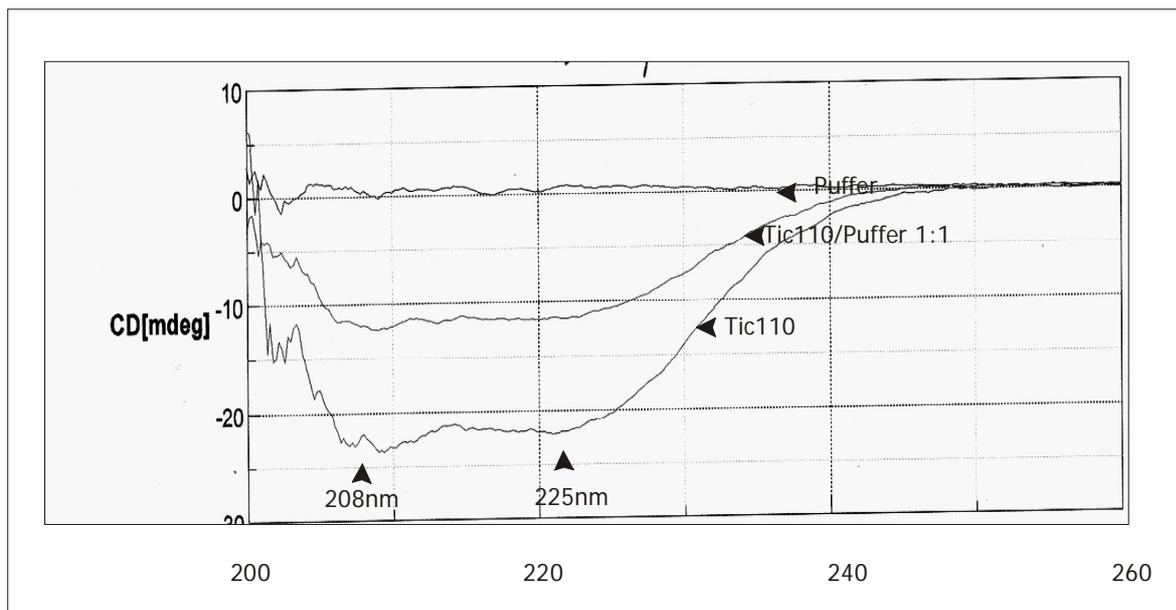
Aktuell werden bis zu drei Topologiemodelle für Tic110 diskutiert (Heins et al., 2002; Inaba et al., 2003; Jackson et al., 1998; Lubeck et al., 1996). Topologiemodell 1 beschreibt Tic110 mit 1-2 N-terminalen Transmembranhelizes und einer globulären Domäne am C-Terminus (Abb.3a). Die C-terminale Domäne ragt ins Stroma und rekrutiert Chaperone, welche das translozierende Vorstufenprotein in Empfang nehmen. Ein zweites Modell basiert auf der gleichen Sekundärstruktur, allerdings ist die C-terminale Domäne in den Intermembranraum gerichtet, wo sie eine „Brücke“ zwischen dem Toc- und Tic-Komplex herstellt (Abb.3b). Das dritte Modell, basierend auf den Daten eines CD-Spektrums, beschreibt am C-Terminus  $\beta$ -Faltblätter, die die Translokationspore bilden sollen (Abb.3c).



**Abb. 3: Schemata unterschiedlicher Tic110 Topologiemodelle.** A) Tic110 ist mit zwei N-terminalen Membranhelizes in der Membran verankert und der C-Terminus bildet eine lösliche Domäne, die ins Stroma gerichtet ist und dort Chaperone rekrutiert. B) Tic110 ist mit zwei N-terminalen Membranhelizes in der Membran verankert und der C-Terminus bildet eine lösliche Domäne, die in den Intermembranraum gerichtet ist und dort eine Verbindung zum Toc Komplex ausbildet. C) Tic110 ist mit zwei N-terminalen Membranhelizes in der Membran verankert und der C-Terminus bildet  $\beta$ -Faltblätter aus, die eine Pore bilden.

#### 4.1.2 CD-Spektrum

Die wohl wichtigste Anwendung der CD (Circulardichroismus)-Spektroskopie ist die Analyse von Proteinsekundärstrukturen. Im Fall von Tic110 wurde in einem der Modelle die Möglichkeit zur Ausbildung von  $\beta$ -Faltblättern im C-Terminus beschrieben (Abb. 3c). In der Literatur wird kein Protein einer inneren Membran beschrieben, welches aus  $\beta$ -Faltblättern besteht. Die Eigenschaft  $\beta$ -Faltblätter auszubilden, ist, soweit bekannt, nur Proteinen von äußeren Membranen von Bakterien oder Organellen vorbehalten. Daher sollte die Sekundärstruktur von rekombinantem Tic110 im CD-Spektrum bestimmt werden. Dafür wurde das mature Protein in BL21 (DE3) Zellen überexprimiert, in Harnstoff solubilisiert, über Ni-NTA aufgereinigt und das gereinigte Protein wurde durch schrittweise Dialyse des Harnstoff rückgefaltet. Die Konzentration des Proteins betrug 0,8 mg/ml. Das CD-Spektrum wurde in der Gruppe von Prof. Dr. D. Oesterhelt aufgenommen und zeigt eindeutig eine  $\alpha$ -helikale Struktur. Man sieht die für  $\alpha$ -helicale Proteine typischen Minima bei 208 nm und 225 nm (Abb. 4).

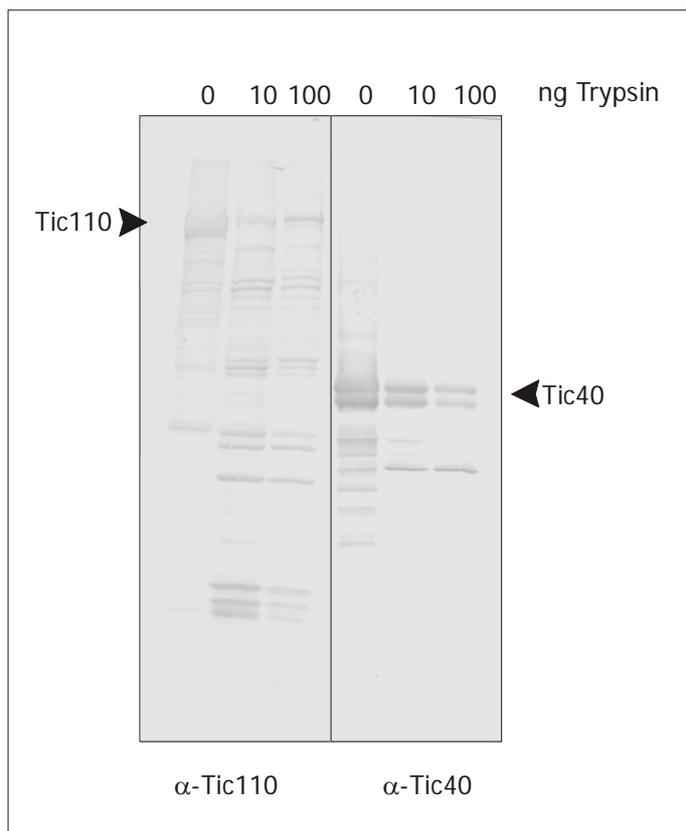


**Abb. 4: CD-Spektrum von rekombinant überexprimiertem Tic110.** Tic110 wurde rekombinant in *E.coli* überexprimiert, in Harnstoff aufgereinigt und durch stufenweise Dialyse des Harnstoffes rückgefaltet. Das Protein wurde gegen 50mM Hepes gemessen.

#### 4.1.3 Proteolytischer Verdau von chloroplastidären inneren Hüllmembranen

Durch Inkubation von Vesikeln der inneren Chloroplastenhüllmembran mit der Protease Trypsin wurde die Orientierung von Tic110 im Vergleich zu Tic40 untersucht. Trypsin kann die Membran unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht penetrieren, was bedeutet, dass man alle die Domänen des Proteins abbaut, die auf der äußeren Seite der Vesikel sitzen und nicht durch die Lipidmembran geschützt werden. Der Verdau wird dann über SDS-PAGE und

nachfolgendes Western-Blotting kontrolliert. In der vorliegenden Arbeit wurden Vesikel der inneren chloroplastidären Hüllmembranen mit 10 und 100ng Trypsin pro 10 $\mu$ g Protein versetzt und für 90 sek bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Antikörpern gegen Tic110 und Tic40 immunodekoriert. Tic40 wird durch die Zugabe von Trypsin nicht abgebaut, da es ein integrales Membranprotein ist, das in das Stroma ragt (Abb. 5, Spuren 10 und 100,  $\alpha$ -Tic40). Ein Teil von Tic110 wird mit Trypsin abgebaut. (Abb. 5, Spuren 10 und 100,  $\alpha$ -Tic110).



**Abb. 5: Proteolytischer Verdau von inneren Chloroplastenhüllmembranen.** Es wurden innere chloroplastidäre Hüllmembranen entsprechend 10 $\mu$ g Protein mit 10 und 100ng Trypsin für 90sek bei 4°C behandelt. Die Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot mit Antikörpern gegen Tic40 und Tic110 detektiert.

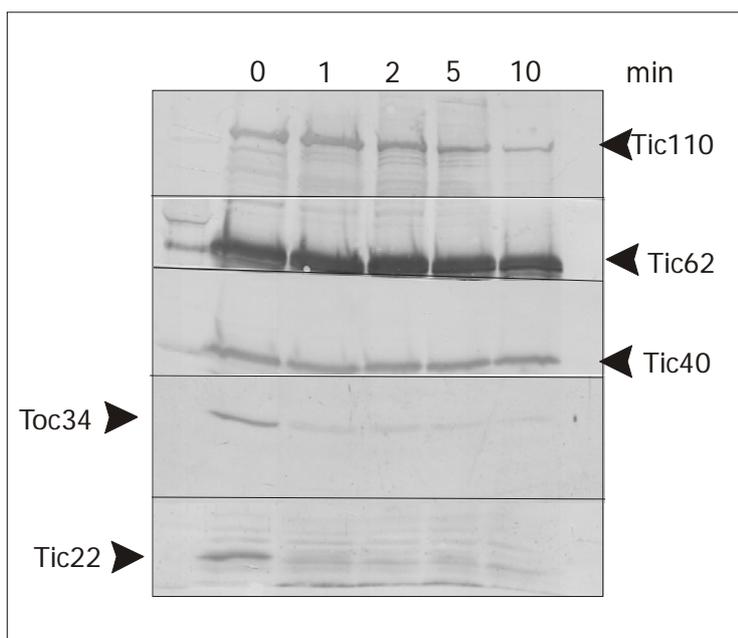
#### 4.1.4 Proteolytischer Verdau ganzer Chloroplasten

Vor dem Hintergrund, dass die Orientierung von Vesikeln der inneren Chloroplastenhüllmembran nicht eindeutig bestimmt werden kann, wurde die Orientierung von Tic110 in ganzen Chloroplasten im Vergleich zu Toc34, Tic22, Tic40 und Tic62 untersucht. Dafür wurden Chloroplasten entsprechend 15 $\mu$ g Chlorophyll eingesetzt und mit der Protease Trypsin behandelt. Trypsin kann die Membran penetrieren und lässt die Interpretation spezifischer Proteinabbaumuster in bezug auf die Orientierung bestimmter Proteine in der Membran zu. Es wurden je 1 $\mu$ g Trypsin pro 1 $\mu$ g Chlorophyll eingesetzt. Die

Proben wurden für 0, 1, 2, 5 und 10min auf Eis inkubiert. Die Proteasebehandlung wurde durch Zugabe von Trypsin-Inhibitor und Pefa-bloc beendet.

Toc34, ein Protein der äusseren Hüllmembran von Chloroplasten, war schon nach einer Inkubationszeit von 1min fast vollständig von der Protease degradiert. Ebenso Tic22, ein Protein, das im Intermembranraum an die innere Hüllmembran von Chloroplasten assoziiert ist (Abb. 6, Spuren 0 und 1).

Tic40 und Tic62 dagegen sind noch nach 10min Inkubation mit der Protease vollständig intakt, was bedeutet, dass die Protease die innerere Membran noch nicht penetriert hat und Proteine, die ins Stroma ragen, noch geschützt sind (Abb. 6, Spuren 0-10). Tic110 allerdings wird im Laufe der Inkubationszeit teilweise degradiert. Schon nach 2 min Inkubation mit Trypsin, ist die Menge an intaktem Tic110 verringert (Abb. 6, Spur 2) und mit fortlaufender Zeit nimmt die Menge an Tic110 weiter ab (Abb. 6, Spur 5 und 10). Dieses Ergebnis bestätigt die Daten der Proteolyse an Vesikeln der inneren Hüllmembran von Chloroplasten.



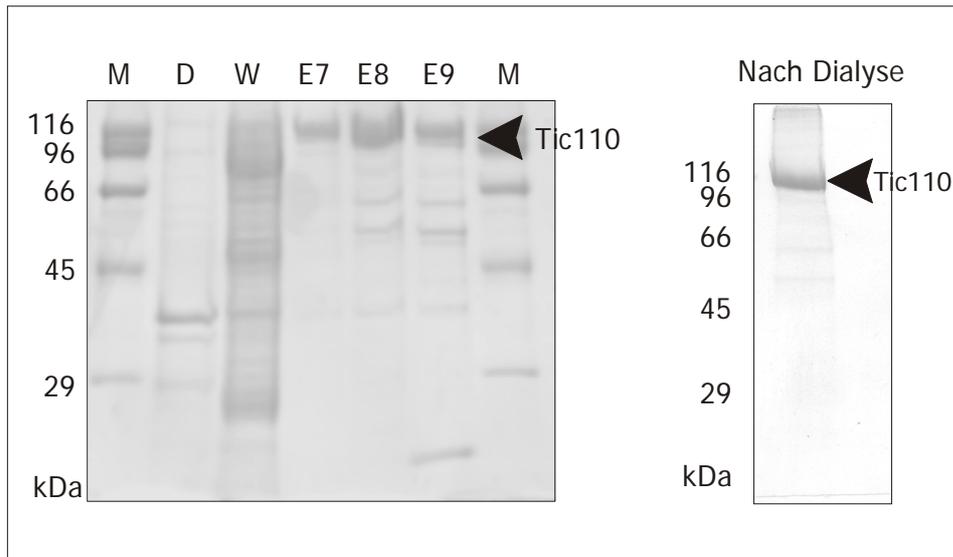
**Abb. 6: Proteolytischer Verdau ganzer Chloroplasten.**

Chloroplasten entsprechend 15 $\mu$ g Chlorophyll wurden mit 15 $\mu$ g Trypsin für 1min, 2min, 5min und 10 min bei 4°C inkubiert. Die Protease-Reaktion wurde mit Trypsin-Inhibitor aus Sojabohne und Pefa-bloc abgestoppt. Die Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteolyse über Immunoblot kontrolliert.

#### 4.1.5 Kristallisation von Tic110

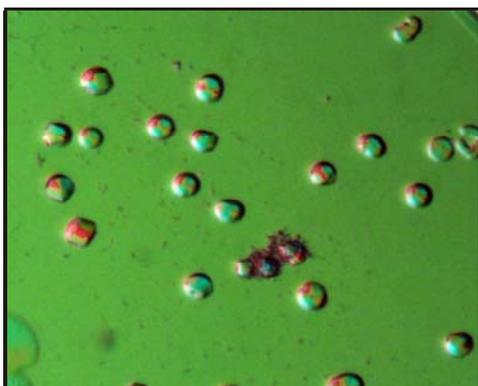
Die vorangegangenen Experimente erbrachten keine eindeutigen Ergebnisse im Hinblick auf Topologie und Sekundärstruktur. Die Röntgenstrukturanalyse von Tic110-Kristallen böte die Möglichkeit mehr und detaillierte Informationen über die Struktur des Proteins zu bekommen. Membranproteine stellen allerdings im Gegensatz zu löslichen Proteinen eine große Herausforderung in der Kristallographie dar. Bis heute gibt es nur wenige Membranproteine, die erfolgreich kristallisiert wurden (Caffrey, 2003). Für die Kristallographie werden größere

Mengen sehr reines Protein in hohen Konzentrationen (10mg/ml) benötigt. Tic110 wurde auch für verschiedenste kristallographische Experimente rekombinant in *E.coli* überexprimiert und unter denaturierenden Bedingungen über Ni-Sepharose aufgereinigt. Elutionsfraktionen wurden auf Reinheit mittels SDS-PAGE überprüft. Eine vollständige Anbindung des rekombinanten Tic110 an die Ni-Matrix konnte erreicht werden (Abb. 7, Spur D). Die Elutionsfraktionen E7, E8 und E9 zeigten die höchste Reinheit und wurden für weitere Experimente verwendet (Abb. 7, Spur E7, E8, E9).



**Abb. 7: Aufreinigung von rekombinant überexprimiertem Tic110 über Ni-Sepharose.** Es wurden jeweils 1/50 des Durchfluss (D), Wasch (W) und den verschiedenen Elutionsfraktionen (E7-E9) über 10% SDS-PAGE und anschließende Coomassie-Färbung analysiert. Die Pfeile markieren das Vollängenprotein von Tic110. Links sind die Molekulargewichte der Standardproteine angegeben (M).

Zunächst wurden diese drei Fraktionen vereint, mit 0,4% (w/v) Dodecylmaltosid solubilisiert und anschließend der Harnstoff schrittweise über Dialyse entfernt. Aggregiertes Protein wurde über Zentrifugation abgetrennt und der Überstand wurde (Abb. 7, nach Dialyse) von Dr. Kornelius Zeth aus der Arbeitsgruppe Prof. Dr. D. Oesterhelt für Kristallisierungsansätze verwendet. Bisherige Ansätze konnten aufgrund technischer Defekte nicht analysiert werden und müssen in der Zukunft wiederholt werden (Abb. 8)

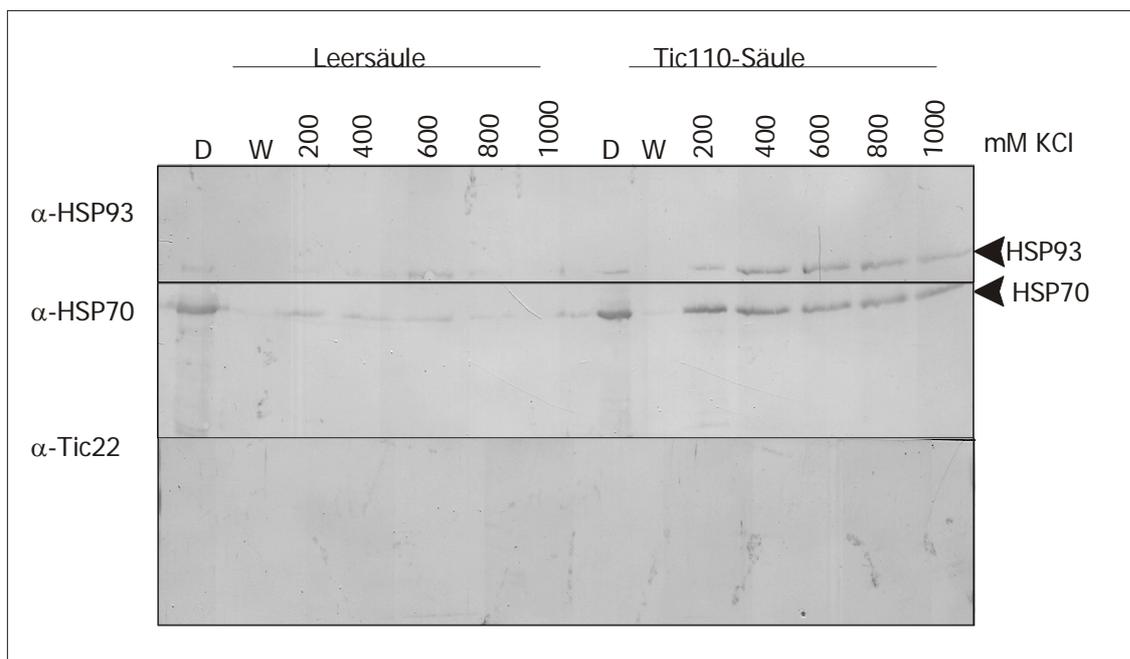


**Abb. 8: Tic110 Kristalle.** Rekombinant überexprimiertes Tic110 wurde über Ni-Sepharose in Harnstoff aufgereinigt, rückgefaltet und für Kristallisationsansätze eingesetzt.

## 4.2 Interaktionen von Tic110C

### 4.2.1 Der C-Terminus von Tic110 interagiert mit HSP93 und HSP70

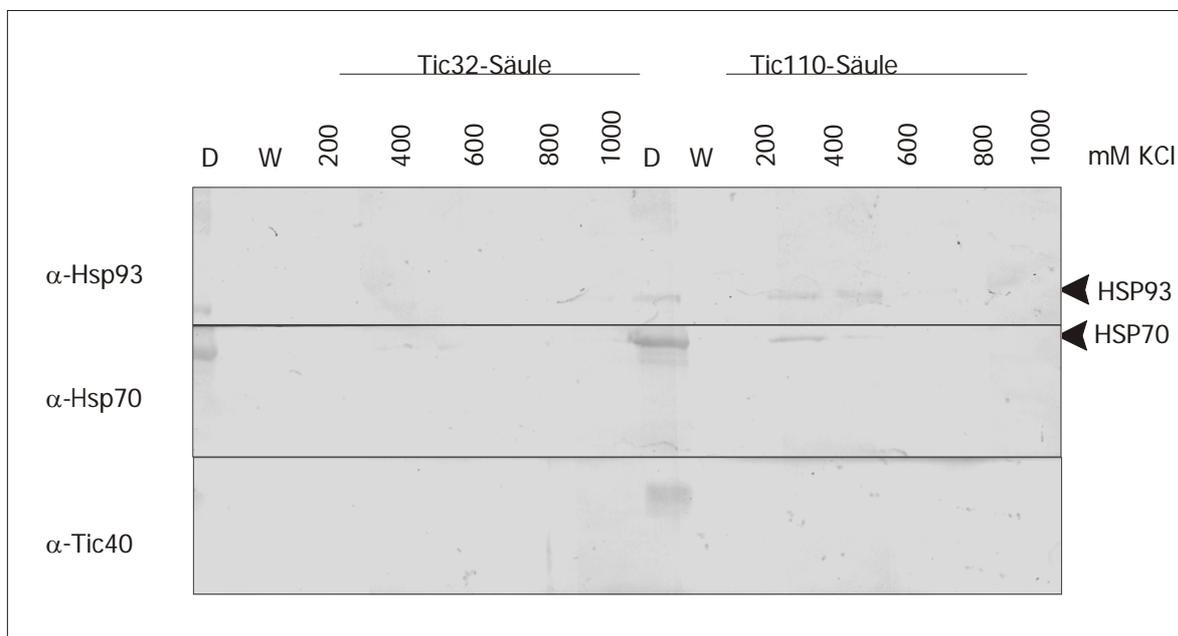
Eine weitere Möglichkeit, die Topologie von Tic110 zu untersuchen, ist die Identifikation weiterer Interaktionspartner. Da insbesondere die Lokalisierung des C-Terminus nicht geklärt ist, wurde die C-terminale Domäne von Tic110 (AS178-AS958) überexprimiert, in Harnstoff solubilisiert und über eine Hexahistidinextension an Ni-NTA gekoppelt und das Protein an der Säule rückgefaltet. Die C-terminale Domäne ist laut den Modellen 1 und 2 (siehe Abb. 3) entweder in den Intermembranraum oder ins Stroma gerichtet. Deshalb wurde die Säule mit der C-terminalen Domäne mit dem löslichen Überstand lysierter Chloroplasten inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit 50mM KCl, wurden mögliche Interaktionspartner mit steigendem KCl Gradienten von 200-1000mM KCl von der Säule eluiert. Die Proben wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Antikörpern gegen HSP93, HSP70 und Tic22 immunodekoriert. Als Kontrolle diente eine Ni-NTA Säule, an die kein Protein gekoppelt war. In den Eluatfraktionen von der Tic110-Säule ließen sich sowohl HSP93 als auch HSP70 im Western Blot detektieren (Abb. 9, Spuren 200-1000). Tic22 wurde nicht detektiert (Abb. 9).



**Abb. 9: HSP93 und HSP70 interagieren mit dem C-Terminus von Tic110.** Der C-Terminus von Tic110 (As 178-AS 985) wurde heterolog überexprimiert. Überexprimiertes Protein wurde an eine Ni-NTA-Säule gekoppelt. Chloroplasten wurden hypertonisch lysiert und der Überstand mit der Tic110C Matrix inkubiert. Ungebundene Proteine (D), Waschschrte (W) und Elutionsschrte (200-1000mM KCl) wurden per SDS-PAGE und folgendem Immuno-Blot analysiert. Die Nickelsäule ohne angebundenes Protein diente als Konrolle (Leersäule).

Somit scheint ein Teil des C-Terminus im Stroma lokalisiert zu sein. Da Chaperone auch an Proteine binden, die nicht richtig gefaltet wurden, wurde der gleiche Versuch mit einem

verkürzten Fragment der C-terminalen Domäne, und somit leichter rückfaltbar, durchgeführt. Dafür wurden die Aminosäuren 841-958 des C-Terminus überexprimiert, ebenfalls in Harnstoff solubilisiert und an die Nickelsäule gekoppelt. Nach Rückfaltung wurde wieder der Überstand lysierter Chloroplasten über die Säule gegeben und potentielle Interaktionspartner wurden mit steigendem KCl-Gradienten von der Säule eluiert und immunodekoriert. Als Negativkontrolle diente diesmal eine Nickelsäule, an die überexprimiertes Tic32 gekoppelt wurde. Wieder können in den Eluatfraktionen der Tic110-Säule HSP93 und HSP70 detektiert werden (Abb.10, Tic110-Säule, Spuren 200,400). In den Eluatfraktionen der Tic32-Säule können weder HSP93 noch HSP70 detektiert werden (Abb.10, Tic32-Säule, Spuren 200-1000).



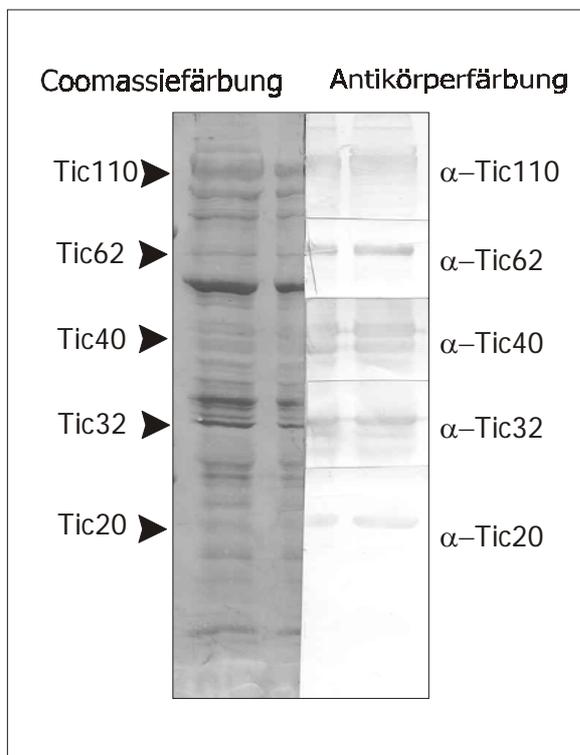
**Abb. 10: HSP93 und HSP70 interagieren mit einem verkürzten Fragment des C-Terminus von Tic110.** Der C-Terminus von Tic110 (As 851-AS 985) wurde heterolog überexprimiert. Überexprimiertes Protein wurde an eine Ni-NTA-Säule gekoppelt. Chloroplasten wurden hypertonic lysiert und der Überstand mit der Tic110C Matrix inkubiert. Ungebundene Proteine (D), Waschschrte (W) und Elutionsschrte (200-1000mM KCl) wurden per SDS-PAGE und folgender Silberfärbung analysiert. Die Tic32-Säule diente als Kontrolle.

### 4.3 Tic110 oder Tic20 die Pore der chloroplastidären Hüllmembran?

#### 4.3.1 Relative Mengenbestimmung von Tic Komponenten in isolierten chloroplastidären Hüllmembranen

Das porenbildende Protein des Tic-Komplex konnte bisher nicht eindeutig identifiziert werden. Heins und Mitarbeiter (2002) konnten zeigen, dass rekombinant exprimiertes Tic110 in Bilayern einen Kation-selektiven Kanal bildet. Andere Arbeitsgruppen (Chen et al., 2002b) favorisieren Tic20 als Pore auf Grund der Ähnlichkeiten zu bakteriellen Transportern und Tim17 (Rassow et al., 1999). Die Pore des Toc-Komplex, Toc75, ist das mengenmäßig

prominenteste Protein in der äusseren Membran. Um keinen „Proteinstau“ im Intermembranraum zu erzeugen, sollten ähnlich viele Transporter in der inneren Membran vorhanden sein wie Toc75. Deshalb wurden die Proteinmengen von Tic110 und Tic20 in der inneren Chloroplastenhüllmembran verglichen. Dafür wurden innere chloroplastidäre Hüllmembranen über SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF geblottet, und nach Anfärbung von den Proteinen mit Ponceau wurde die Membran geteilt. Der eine Teil wurde mit Antikörpern gegen Tic110, Tic62, Tic40 und Tic20 dekoriert, der andere Teil wurde mit Coomassie G 250 gefärbt. Danach wurden beide Teile der Membran wieder aneinandergelegt. Tic110 lässt sich eindeutig einer Coomassie-färbaren zuordnen (Abb. 11,  $\alpha$ -Tic110), während auf Höhe des Tic20 keine Coomassie-färbare Bande zu detektieren ist (Abb. 11,  $\alpha$ -Tic20). Die Menge an Tic110 ist eindeutig größer in der Membran als die Menge an Tic20.



**Abb. 11: Vergleich der Proteinmengen von Tic20 und Tic110 in inneren Chloroplastenhüllmembranen.** Innere Chloroplastenhüllmembranen entsprechend 20 $\mu$ g Protein wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF Membran geblottet und geteilt. Die Proteine des einen Teils wurden mit Coomassie G angefärbt, die Proteine des zweiten Teils wurden mit Antiseren gegen Tic110, Tic62, Tic40, Tic32 und Tic20 detektiert. Die beiden Membranhälften wurden nach der Detektion zusammengelegt und die Proteinmengen verglichen.

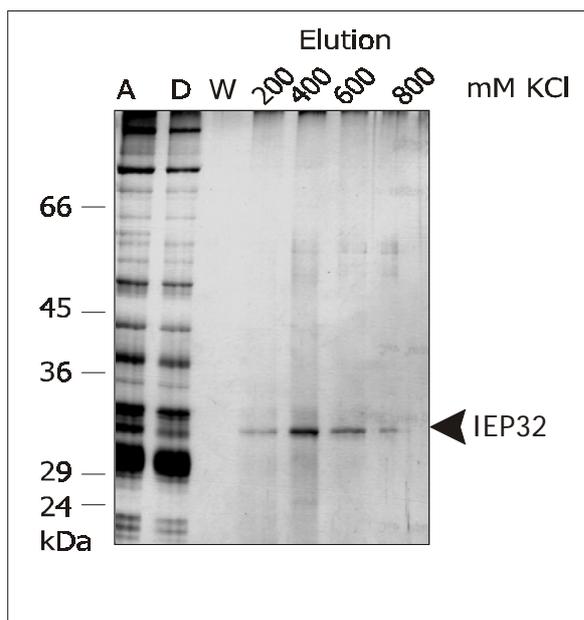
### 4.3 IEP32

#### 4.3.1 Identifizierung von Tic110N Interaktionspartnern

Zahlreiche Vorarbeiten dienen der Identifikation möglicher Interaktionspartner von Tic110. Dazu wurde die N-terminale Domäne von Tic110 mit einer C-terminalen

Hexahistidinextension in *E.coli* BL21(DE3) überexprimiert. Als „Abstandshalter“ wurde die mSSU-Sequenz zwischen die Tic110-Domäne und dem His-Tag integriert. Im Selektionsexperiment wurde das rekombinant überexprimierte Fusionsprotein in Harnstoff solubilisiert und über die Histidin-Extension an Nickel-Agarose gekoppelt, an der Säule rückgefaltet und mit inneren Chloroplastenhüllmembranen nach Behandlung mit Detergenz inkubiert. Potentielle Interaktionspartner wurden über das Fusionsprotein an die Säule gebunden und mit steigender Salzkonzentration eluiert. Nach Analyse des Eluats mittels SDS-PAGE wurde ein Protein von 32 kDa detektiert. Die N-terminale Aminosäuresequenzierung ergab für das 32 kDa Protein, dass es sich um eine sogenannte „short-chain“ Dehydrogenase (SDR) handelt. SDRs sind ubiquitär in allen Organismen verbreitet und erfüllen verschiedenste Funktionen. Weitere Analysen ergaben, dass das 32kDa Protein in der inneren Hüllmembran von Chloroplasten lokalisiert ist. Experimente zur Extraktion oder Proteasebehandlung von inneren chloroplastidären Hüllmembranen ließen die Einstufung des 32 kDa Proteins als integrales Membranprotein zu (Shveshnikov, Dissertation 2000).

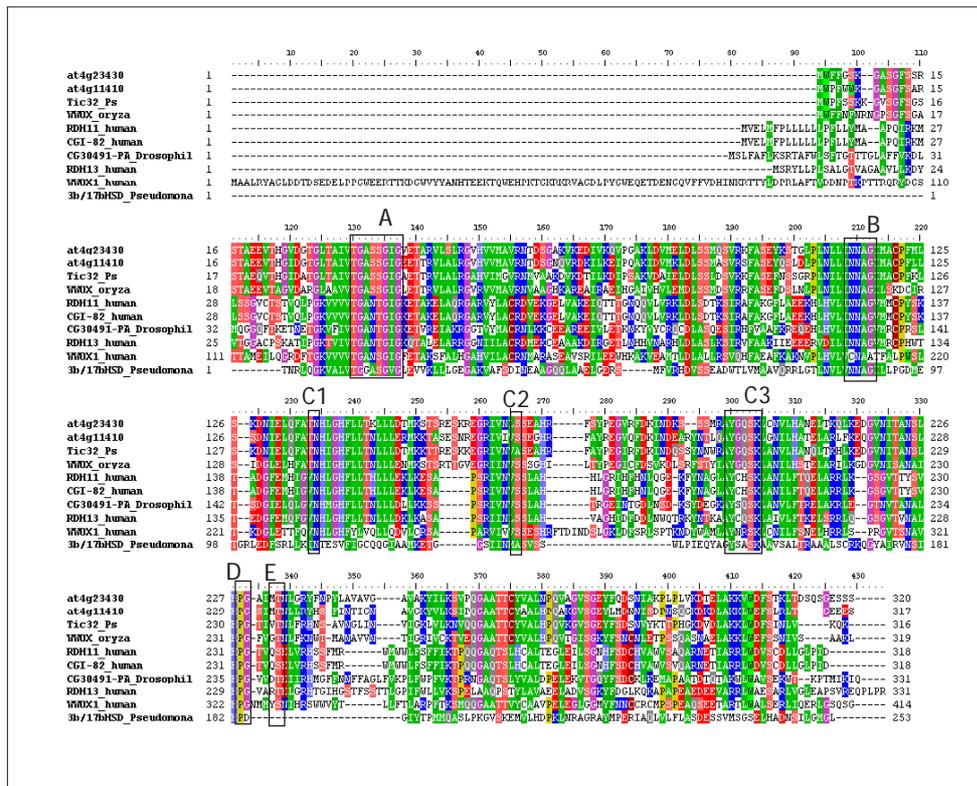
In der vorliegenden Arbeit sollte die Zugehörigkeit dieser Komponente zum Tic-Komplex untersucht werden. Um zunächst die Interaktion mit Tic110 zu bestätigen, wurde die N-terminale Domäne von Tic110 ohne mSSU an eine Nickel-Säule gekoppelt. Das Ergebnis wurde bestätigt und somit konnte eine falsch-positive Interaktion von IEP32 mit mSSU ausgeschlossen werden. Es konnte nur das ca. 32 kDa große Protein mit ungefähr 600mM KCl von der Säule eluiert werden (Abb. 13, Spuren 200-600mM).



**Abb. 13: IEP32 interagiert mit Tic110.** Der N-Terminus von Tic110 wurde heterolog überexprimiert. Überexprimiertes Protein wurde an eine Ni-NTA-Säule gekoppelt. Innere chloroplastidäre Hüllmembranen wurden in 3% Decylmaltosid solubilisiert und mit der Tic110N Matrix inkubiert. Der Auftrag (A), Ungebundene Proteine (D), Waschschrte (W) und Elutionsschritte (200-1000mM KCl) wurden per SDS-PAGE und folgender Silberfärbung analysiert.

Das Protein wurde entsprechend der Lokalisierung und des kalkulierten Molekulargewichts IEP32 genannt. Die Primärsequenz zeigt starke Homologien zu dem *Arabidopsis thaliana*

Protein at4g23430, welches in einem Proteom-Projekt als Komponente von gemischten Chloroplastenhüllmembranen identifiziert wurde (Ferro et al., 2003)(Abb. 14).



**Abb. 14: Sequenzabgleich von Tic32 aus *Pisum sativum* mit Orthologen aus *Arabidopsis thaliana* (at4g23430 und at4g11410), *Oryza sativa* (WVOX\_oryza), *Drosophila* (CG30491-Drosophila), *Homo sapiens* (RDH11, RDH13, CCG1-82, WVOX1) und *Pseudomonas testosteroni* 3β/17β-HSD (3β/17βHSD). Aktive Zentren und konservierte Aminosäurereste der SDR Familie sind mit Buchstaben gekennzeichnet und eingerahmt (A: TGXXXGXG; B: NNAG; C1-C3: Tetrade aus Asn, Ser, Tyr und Lys, wichtig für das aktive Zentrum; D+E: beteiligt an Ko-Faktor Bindung)**

Es scheint keine spaltbare chloroplastidäre Signalsequenz zu besitzen (Nada und Soll, 2004). IEP32 weist die charakteristischen Merkmale der „short-chain“ Dehydrogenasen auf, darunter das NADP<sup>+</sup> bindende Motif GxxxGxG, das Helix stabilisierende NNAG und das aktive Zentrum YGXXK (Abb. 15, graue Boxen).

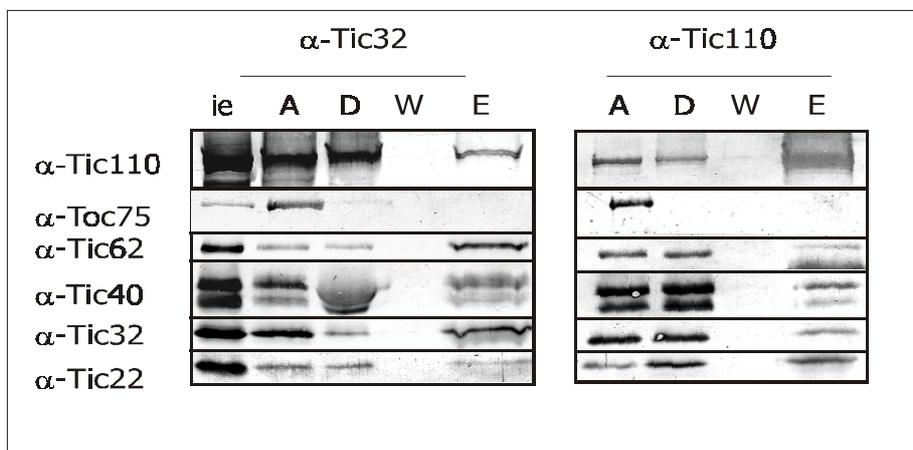
```
MWPFSSKKGVSFGSGSSTAEQVTHGIDATGLTAIVTGASSGTGAATTRVL
ALRGAVHVMGVRNMVAAKDVKDTILKDI PSAKVDAIELDLSLDSVKKFA
SEFNSSGRPLNILINNAGIMACPFKLSKDNIELQFATNHIGHFLLTNLLL
DTMKTTRESKKEGRIVNVASEAHRFAYPEGIRFDKINDQSSYNNWRAYG
QSKLANVLHANQLTKHLKEDGVNITANSLHPGTIVTNLFRHNSAVNGLIN
VIGKLV LKNVQQAATTCYVALHPQVKGVSGEYFSDSNVYKTPHGKDVD
LAKKLWDF S INLVKQK
```

**Abb. 15: Aminosäuresequenz eines cDNA-Klons aus einer Erbsenblatt cDNA-Bank. Konservierte Motive von „short-chain“ Dehydrogenasen sind grau hinterlegt.**

## 4.4 Zugehörigkeit von IEP32 zum Tic Komplex

### 4.4.1 IEP32 ist eine Komponente des Tic-Komplex

Folgeexperimente sollten klären, ob IEP32 zusammen mit bisher bekannten Tic-Komponenten in einem Proteinkomplex zu finden ist. Dafür wurden innere chloroplastidäre Hüllmembranen mit 2% Octylglycosid solubilisiert und entweder mit Antiserum gegen IEP32 oder Tic110 immunpräzipitiert und im Immunoblot detektiert. Der Komplex, der mit Antiserum gegen IEP32 aufgereinigt wurde, bestand aus Tic110, Tic62, Tic40 und IEP32. Tic22 war nur in geringen Mengen und Toc75 gar nicht zu finden (Abb. 16, Spur5). Der Komplex, der mit dem Antiserum gegen Tic110 aufgereinigt wurde, zeigte eine ähnliche



Zusammensetzung, allerdings wurde mehr Tic22 detektiert (Abb. 16, Spur 9).

**Abb. 16: IEP32 ist mit dem Tic-Komplex assoziiert.** Innere chloroplastidäre Hüllmembranen wurden mit 2% Octylglucosid solubilisiert. Der Überstand wurde mit

Antikörpern gegen IEP32 und Tic110 inkubiert und der Ansatz wurde dann zu Protein A-Sepharose gegeben. Es wurden jeweils 1/100 des Überstandes (A), des Durchfluss (D), des letzten Waschschritts (W) sowie die gesamten Elutionsfraktionen (E) auf SDS-PAGE aufgetragen, dann auf Nitrocellulose transferiert und mit Antikörpern gegen Tic110, Tic62, Tic40, IEP32 und Tic22 immundekoriert, Antikörper gegen Toc75 dienten als Kontrolle.

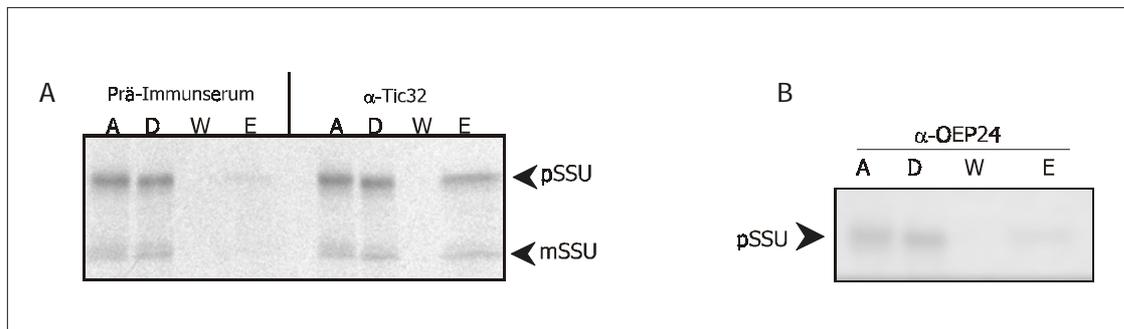
### 4.4.2 IEP32 ist am Proteinimport beteiligt

Auch Methoden zur chemischen Quervernetzung von Proteinen werden genutzt, um Interaktionspartner zu identifizieren. Die Quervernetzung wurde eingesetzt, um Beteiligung von IEP32 am plastidären Proteinimport zu zeigen. Dafür wurden isolierte Chloroplasten mit radioaktiv markiertem Vorstufenprotein pSSU unter verschiedenen Bedingungen inkubiert:

- i) mit 3mM ATP, dunkel und auf Eis, das Vorstufenprotein sollte nur anbinden oder schon Importintermediate ausbilden, oder
- ii) 3mM ATP, dunkel; das Vorstufenprotein sollte vollständig importiert werden. Als Quervernetzer wurde Dithiobissuccinimidyl Propionat (DSP) eingesetzt.

Die Quervernetzung wurde mit Glycin abgestoppt, und eine Immunopräzipitation unter denaturierenden Bedingungen (0,1%SDS) wurde angeschlossen. Die Quervernetzung wurde durch  $\beta$ -Mercaptoethanol im SDS-Probenpuffer wieder gespalten. Antiseren gegen Toc75,

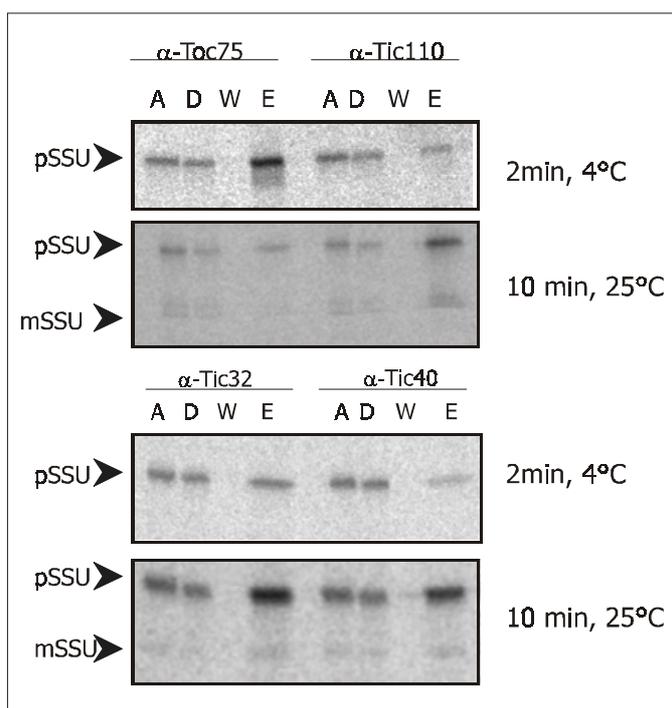
Tic110, Tic40 und IEP32 konnten das radioaktiv markierte Vorstufenprotein immunpräzipitieren (Abb. 18, Spuren E).



**Abb. 17: IEP32 ist mit Vorstufenproteinen assoziiert.** Importreaktionen wurden für 20min auf Eis in Anwesenheit von 3mM ATP durchgeführt. Nach dem Import wurden die Chloroplasten reisoliert, mit 0,5mM Dithiobissuccinimidylpropionat quervernetzt und hypertonic lysiert. Die Membranen wurden mit 1%SDS solubilisiert. Immunpräzipitationen wurden mit Prä-Immuneserum und Antikörpern gegen IEP32 durchgeführt (B). Antikörper gegen Oep24 dienten als Negativkontrolle (A). Die Quervernetzungen wurden mit  $\beta$ -Mercaptoethanol im SDS-Ladepuffer gespalten. Die Proben wurden mit SDS-PAGE analysiert. Gezeigt ist ein Autoradiogram. A: Auftrag; D: Durchfluß; W: Wasch; E: Elution

In Kontrollansätzen mit Prä-Immuneserum oder Antiserum gegen OEP24 konnte das Vorstufenprotein nicht gefällt werden (Abb. 17A,B). In der Anwesenheit von 3mM ATP konnte auch die mature Form des Vorstufenproteins, detektiert werden, wenn Antiserum gegen Tic110, Tic40 oder IEP32 zur Immunpräzipitation eingesetzt wurden (Abb. 18 E, 10 min, 25°C). Weniger mSSU wurde detektiert, wenn Antiserum gegen Toc75 für die Immunpräzipitation verwendet wurde (Abb. 18, Toc75 E; 10 min, 25°C). Die beschriebenen Experimente zeigen eine Beteiligung von IEP32 am plastidären Proteinimport über die innere

Hüllmembran und begründen eine Umbenennung in Tic32.



**Abb. 18: Tic32 spielt während eines späten Stadiums des Imports eine Rolle.** Importreaktionen in Anwesenheit von 3mM ATP wurden entweder für 2min auf Eis oder für 10 min bei 25°C durchgeführt, bevor Quervernetzungsexperimente und Immunpräzipitationen angeschlossen wurden (siehe Figur 5). Für die Immunpräzipitationen wurden Antikörper gegen Toc75, Tic110, Tic32 und Tic40 eingesetzt. Nach 2 min kann pSSU an jede Toc/Tic-Komponente quervernetzt werden, am meisten an Toc75. mSSU kann von allen Tic-Komponenten immunpräzipitiert werden.

## 4.5 Tic32 hat Dehydrogenaseeigenschaften

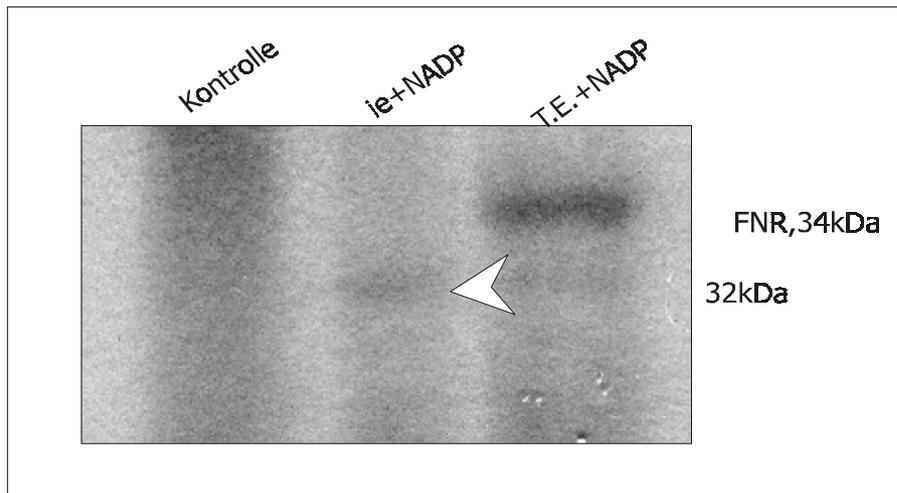
### 4.5.1 Tic32 bindet Nukleotide

Die Aminosäuresequenz von Tic32 enthält die für „short-chain“ Dehydrogenasen typischen konservierten Motive:

- i) GxxxGxG als NAD(P<sup>+</sup>) Bindestelle im N-Terminus
- ii) NNAG als Stabilisator des zentralen  $\beta$ -Faltblattes
- iii) und eine Tetrade aus N, S, Y und K als aktives Zentrum

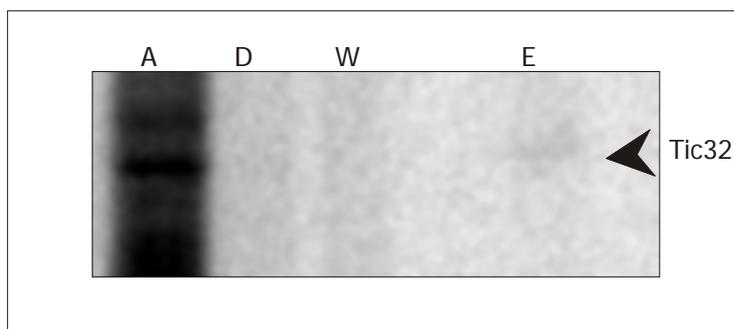
Verschiedene Experimente hatten zum Ziel, die Qualität und Spezifität der NAD(P<sup>+</sup>) Bindung von Tic32 zu untersuchen. Dafür wurden innere Chloroplastenhüllmembranen mit 2% Triton X-100 oder 2% SDS solubilisiert. Anschließend wurde <sup>32</sup>P-markiertes NAD<sup>+</sup> zu dem Ansatz gegeben und mit UV-Licht ( $\lambda=245\text{nm}$ ) bestrahlt. Die Ansätze wurden über SDS-Page aufgetrennt und radioaktiv markierte Produkte wurden auf einem Röntgenfilm detektiert. Mit NAD<sup>+</sup> ließ sich kein Produkt bei 32 kD detektieren (Ergebnis nicht gezeigt).

Radiokativ markiertes NAD(P)<sup>+</sup> musste zunächst in einer enzymatischen Reaktion aus <sup>32</sup>P-ATP und NAD<sup>+</sup> hergestellt werden. Dafür wurde NAD<sup>+</sup> mit <sup>32</sup>P-ATP und einer NAD-Kinase für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde freies ATP durch Inkubation mit Apyrase abgebaut. Als experimentelle Nullkontrolle diente ein Ansatz, in dem die Apyraseinkubation vor der Kinase-Reaktion stattfand und somit kein <sup>32</sup>P-ATP für die NADP<sup>+</sup>-Synthese zur Verfügung stand. Erfolg und Effizienz der NADP<sup>+</sup>-Synthese wurde mittels Dünnschichtchromatographie überprüft. Für die Anbindung wurden wieder solubilisierete Chloroplastenhüllmembranen mit dem synthetisierten NAD(P)<sup>+</sup> inkubiert und die Quervernetzung mit UV-Licht induziert. Als Positivkontrolle diente FNR (Ferredoxin-Oxidoreduktase). FNR ist ein NADPH-abhängiges Enzym und sollte in diesem Versuchsansatz das radioaktive NADP<sup>+</sup> binden. Im Röntgenfilm konnte neben der markierten FNR (34 kDa) eine schwache Bande unterhalb der FNR detektiert werden (Abb. 19). Als Negativkontrolle wurden innere Hüllmembranen mit dem Kontrollansatz inkubiert. Hier war kein Signal zu detektieren (Abb. 19, Spur Kontrolle).



**Abb. 19: Ein 32 kDa Protein der inneren Hüllmembran bindet NADP.** NADP wurde radioaktiv markiert und mit inneren chloroplastidären Hüllmembranen (ie+NADP) oder Thylakoidextrakt (T.E.+NADP) inkubiert und mit UV-Licht quervernetzt. Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiogramm analysiert. Im Kontrollansatz (Kontrolle) wurde das ATP vor der Kinase-Reaktion durch Apyrase abgebaut und somit kein NADP gebildet.

Um die Identität der bei 32kDa detektierten Bande eindeutig zu klären, wurde der experimentelle Ansatz wiederholt und eine Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen Tic32 angeschlossen. Im Gesamtansatz vor der Immunpräzipitation (Abb. 20, Spur A) war eine radioaktiv markierte Proteinbande bei 32kDa zu finden. Im Säulendurchfluß und in der Waschfraktion wurde das radioaktive Signal nicht detektiert (Abb. 20, Spur D, W). Die Eluatfraktion dagegen zeigte eine schwache Proteinbande bei 32 kDa (Abb. 20, Spur E). Das Experiment erwies, dass ein 32 kDa Protein sich mittels  $^{32}\text{P-NADP}^+$  radioaktiv markieren läßt und mit spezifischem Tic32 Antiserum immunpräzipitiert werden kann. Somit ist gezeigt, dass Tic32  $\text{NADP}^+$  bindet.



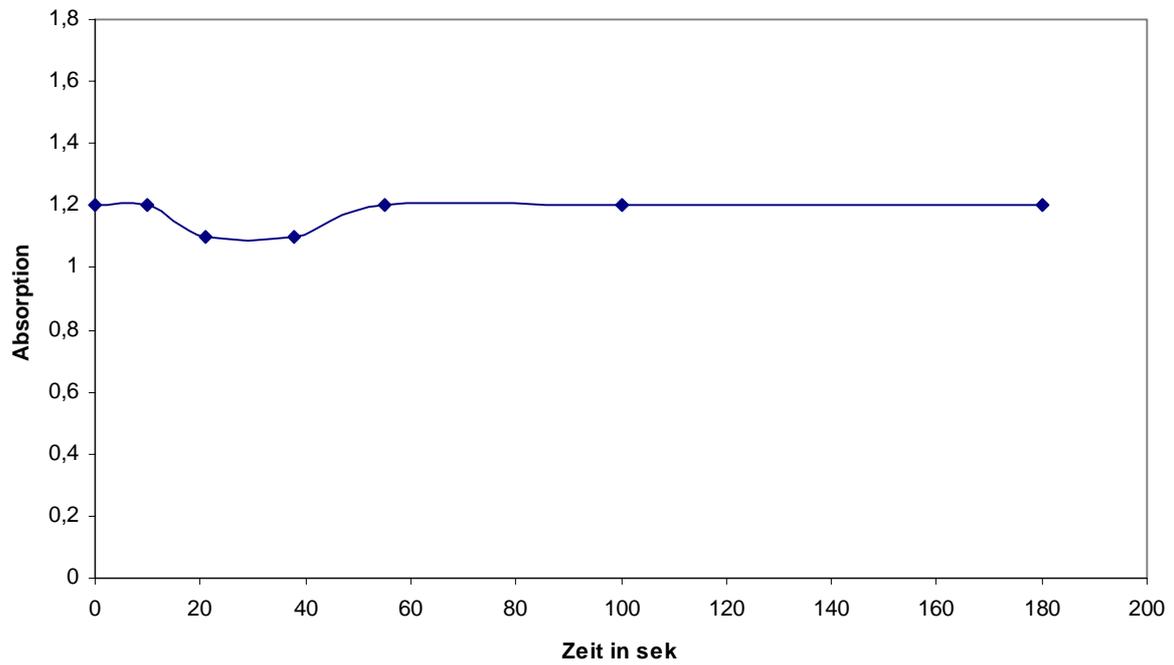
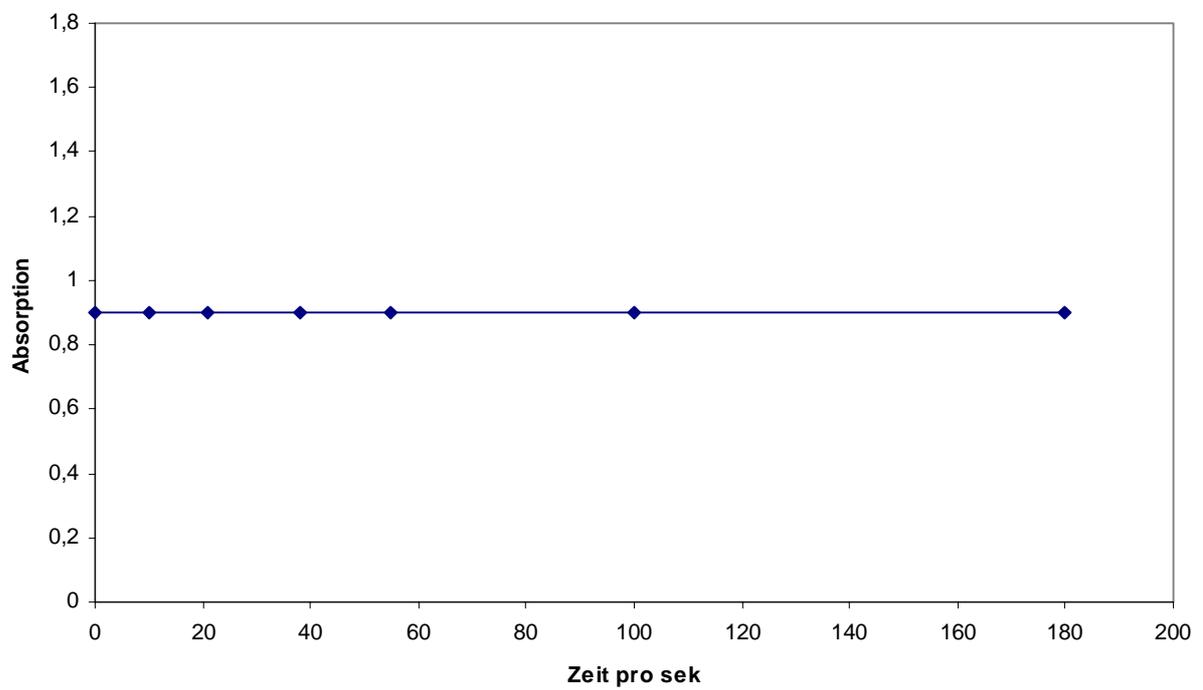
**Abb. 20: Tic32 bindet NADP.** Es wurden innere chloroplastidäre Hüllmembranen mit radioaktiv markiertem NADP inkubiert und mit UV-Licht quervernetzt. Nach Solubilisierung mit 1% SDS wurden Proteine mit Antiserum gegen Tic32 immunpräzipitiert. Die Proben wurden über SDS-PAGE und anschließende Autoradiographie analysiert. A: Auftrag; D: Durchfluß; W: Wasch; E: Elution

#### 4.5.2 Tic32 ist eine aktive Dehydrogenase

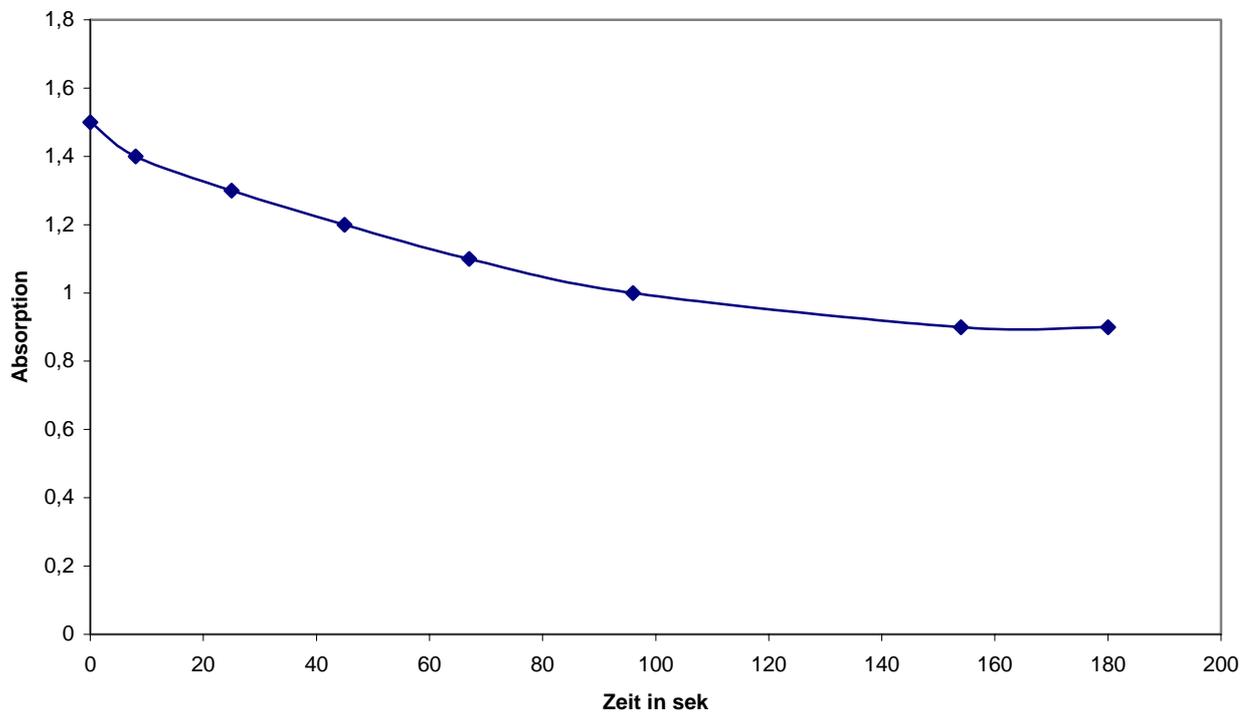
In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass Dehydrogenasen sich im Laufe der Zeit an unterschiedliche Bedürfnisse von Zellen angepasst haben und nicht mehr als Dehydrogenasen aktiv sind. Der Transkriptionsrepressor NmrA weist zwar noch die konservierten Domänen einer „short-chain“ Dehydrogenase auf, aber im aktiven Zentrum ist das Tyrosin zu einem Methionin mutiert, so dass NADH nicht mehr umgesetzt werden kann (Stammers et al., 2001). Das Tyrosin soll den Hydrid Transfer vom Substrat auf den C<sub>4</sub>-Ring des NAD(P)<sup>+</sup> katalysieren und ist essentiell für eine funktionelle Dehydrogenase (Jornvall et al., 1995). Das katalytische Zentrum von Tic32 beinhaltet weiterhin das Tyrosin in der Primärsequenz, womit von einer Aktivität von Tic32 als Dehydrogenase auszugehen ist. Für Tic32 ist bisher kein Substrat bekannt. Daher wurde mit K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] ein allgemeiner Elektronenakzeptor eingesetzt. Für eine Dehydrogenasereaktion wurden 80 μM NADH, 100 μM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] in Kaliumphosphatpuffer gegeben und die zu untersuchende Probe vor der Messung zugefügt. Dann wurde für 3min eine Abnahme von NADH bei 340nm beobachtet.

Gemessen wurden löslich überexprimiertes Tic32 und innere chloroplastidäre Hüllmembranen. Als Negativkontrolle wurde der Puffer mit NADH und K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] ohne Protein gemessen, sowie Tic32 mit K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] anstatt von K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]. K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] ist nicht mehr reduzierbar, das bedeutet, es sollte als Elektronenakzeptor untauglich sein und NADH<sub>2</sub> sollte nicht oxidiert werden können. Es wurden 20 μg lösliches Tic32 und chloroplastidäre innere Hüllmembranen entsprechend 20 μg Protein eingesetzt.

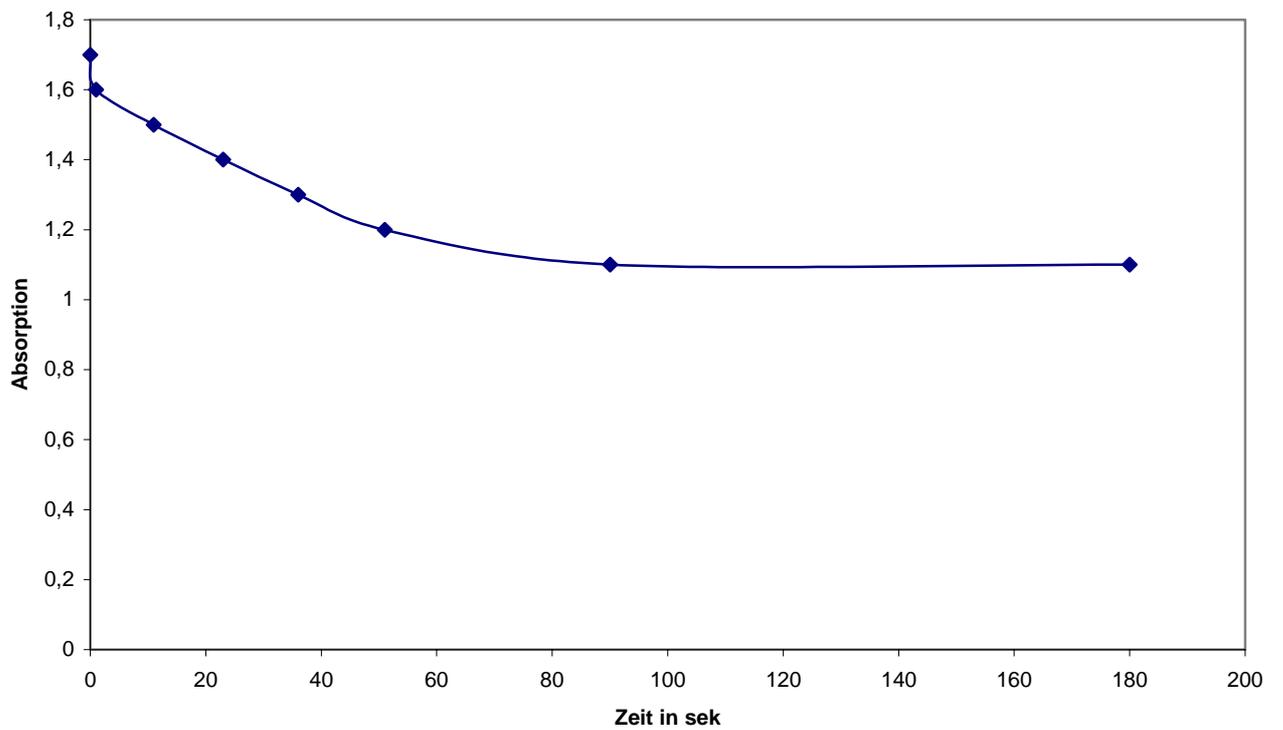
Tic32 Kontrolle

Tic32 mit  $K_4[Fe(CN)_6]$ 

## Innere Hüllmembranen



## Tic32



**Abb. 21: Tic32 zeigt Dehydrogenase-Aktivität.** Löslich überexprimiertes Tic32 und innere Chloroplastenhüllmembranen entsprechend 20µg Protein wurden mit NADH und Kaliumhexacyanoferrat inkubiert. Gemessen wurde die Abnahme der Extinktion von NADH bei 340nm. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Protein gemessen (Kontrolle Tic32) und ein Ansatz mit  $K_4[Fe(CN)_6]$  anstatt  $K_3[Fe(CN)_6]$  (Tic32 mit  $K_4[Fe(CN)_6]$ ).

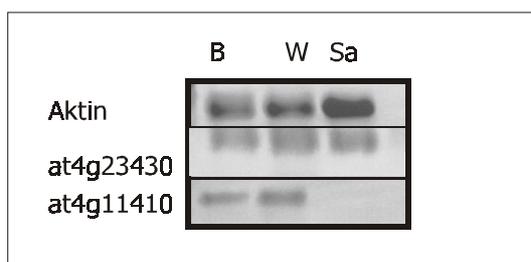
Sowohl in der Negativkontrolle ohne Protein als auch in der Negativkontrolle mit  $K_4[Fe(CN)_6]$  war keine Abnahme von NADPH zu sehen (Abb. 21, Tic32 Kontrolle und Tic32+  $K_4[Fe(CN)_6]$ ). Nach Zugabe von inneren chloroplastidären Hüllmembranen konnte eine Abnahme der Absorption, in dem Fall eine Abnahme von NADH beobachtet werden. Auch nach Zugabe von löslichem Tic32 wurde eine Abnahme von NADH festgestellt, allerdings war die Reaktion schneller zu Ende als in den Chloroplastenhüllmembranen und die Abnahme war auch nicht ganz so stark. Absolute Aktivitäten lassen sich nicht ermitteln, da nicht bekannt ist, wieviele verschiedene Dehydrogenasen in inneren chloroplastidären Hüllmembranen vorhanden sind sowie wie hoch der Anteil aktiver Dehydrogenasen im Vergleich zum Gesamtprotein ist.

## 4.6 Charakterisierung von T-DNA Insertionslinien des Tic32 in *Arabidopsis thaliana*

### 4.6.1 Tic32 Knock-out Pflanzen

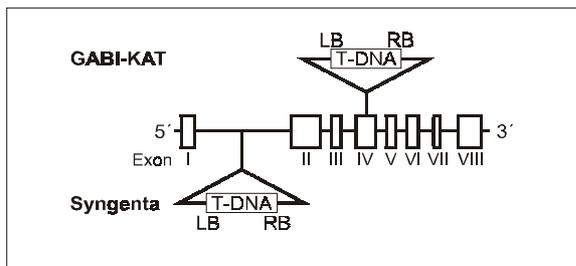
Ein Ansatz, der zur Klärung der Funktion eines Proteins beitragen kann, ist die Charakterisierung von T-DNA Insertionslinien in *Arabidopsis thaliana*. Das Gen, das für das zu untersuchende Protein codiert, wird durch die Insertion eines T-DNA-Fragmentes unterbrochen und wird somit nicht mehr exprimiert. Anhand des Phänotyps der Pflanze versucht man dann auf eine mögliche Funktion des Proteins zu schließen.

In *Arabidopsis thaliana* gibt es zwei Gene, die signifikante Homologien zu Tic32 zeigen: at4g23430 und at4g41140. Mit RT-PCR wurde gezeigt, dass nur at4g23430 in allen Geweben exprimiert ist (Abb. 22, Spur B, W und Sa).



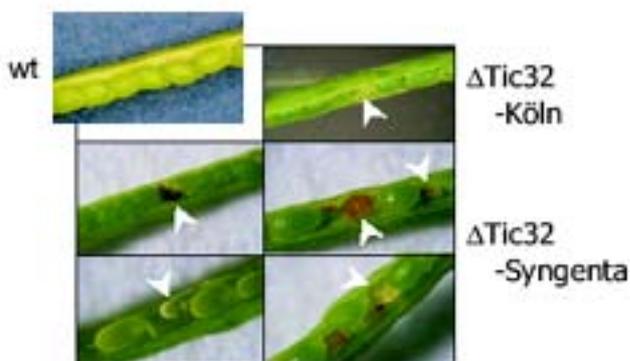
**Abb. 22: RT-PCR von at4g23430 und at4g11410.** Nur at4g23430 wird in allen getesteten Geweben exprimiert. At4g11410 wird nicht in Samen (S), sondern nur im Blatt (B) und in der Wurzel (W) exprimiert. Als Kontrolle diente Aktin (at5g09810)

Weiterhin wurde at4g23430 in einem Proteom-Projekt von chloroplastidären Hüllmembranen aus *Arabidopsis thaliana* (Ferro et al., 2003) identifiziert, so dass mit Insertionslinien für das Gen von at4g23430 weitergearbeitet wurde. Zwei unabhängige T-DNA Insertionslinien von at4g23430 von unterschiedlichen Pflanzenforschungszentren wurden analysiert: Die T-DNA Linie von Syngenta aus USA hatte die T-DNA Insertion in Intron I. Die T-DNA Linie von GABI aus Köln hatte die Insertion in Exon IV von Tic32 (Abb. 23).



**Abb. 23: Positionen der T-DNA Insertionen in den 2 Tic32 Mutanten von at4g23430.** In Garlic861 (Syngenta) ist die T-DNA im ersten Intron inseriert, in 117H08 (Max-Planck-Institut, Köln, Deutschland) ist die T-DNA in Exon4 inseriert.

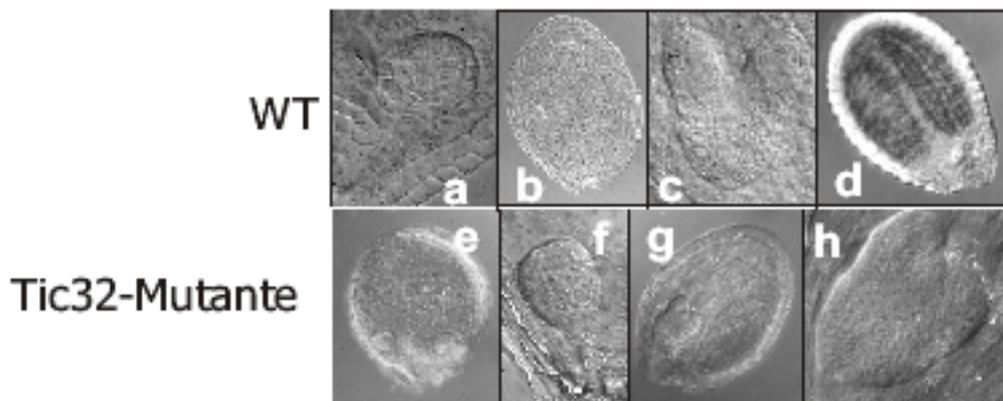
In beiden Linien war es nicht möglich, für die Mutation homozygote Pflanzen zu bekommen. Dieses deutete an, dass Tic32 für die Pflanze essentiell sein könnte. Als nächstes wurden die Schoten der Pflanzen untersucht: in den Schoten der Pflanzen, die für die Mutation heterozygot waren, fanden sich zahlreiche abgestorbene Samen, die im Wildtyp nicht vorkamen (Abb.24, Bilder 2-6).



**Abb. 24: Bilder von Schoten vom Wildtyp und den Tic32 Mutanten.** Abgestorbene Samen erscheinen in jüngeren Schoten weiß und in älteren Schoten bräunlich und schrumpelig (weißer Pfeil).

Um zu sehen, in welchem Stadium der Embryogenese die Entwicklung in  $\Delta$ -Tic32-Embryonen abbricht, wurden Samen der Mutante und des Wildtyp für einige Minuten in Hoyer's Lösung eingelegt und dann unter dem Mikroskop mit der Normarski-Technik analysiert. Hoyer's Lösung macht die Samenschale durchsichtig, so dass man den Embryo im Samen beobachten kann.

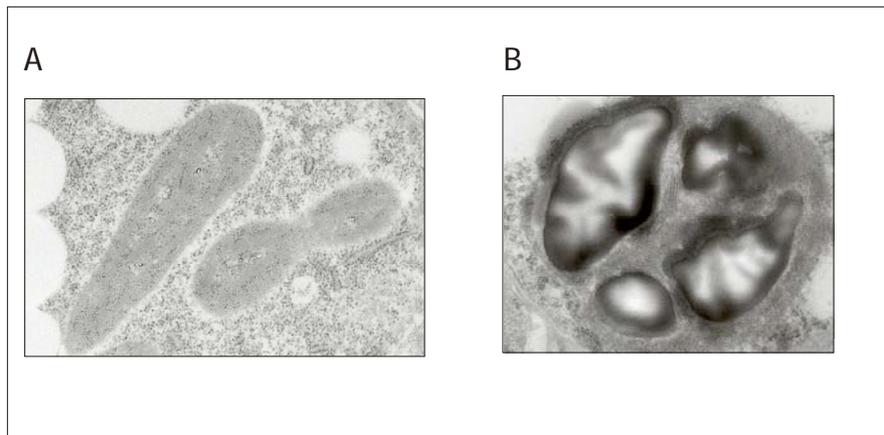
In den Wildtyp Samen ließ sich die Entwicklung vom globulären Stadium zum Torpedo Stadium nachvollziehen (Abb. 25, Bilder a-d). Die Embryonen der Mutanten erschienen im globulären Stadium noch normal (Abb. 13, Bilder e und f), im Herzstadium allerdings sahen die Embryonen deformiert aus, die Zellverteilung war nicht mehr symmetrisch (Abb. 25, Bilder g und h). Bereits das Torpedo Stadium wurde von den Mutanten Embryonen nicht erreicht, was darauf hindeutet, dass Tic32 essentiell für die Embryogenese ist.



**Abb. 25: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Embryonen des Wildtyp und der Tic32 Mutante.** In den Wildtypsamen lässt sich die Embryonalentwicklung vom globulären Stadium (A) zum Herzstadium (B,C) und zum Torpedostadium (D) nachvollziehen. Die Mutanten Embryonen zeigen eine davon abweichende Entwicklung (E-H). Es kann kein weiteres Entwicklungsstadium nach dem Herzstadium detektiert werden.

#### 4.6.2 Elektronenmikroskopie von Chloroplasten der Tic32 Mutante

Da die Entwicklung der Chloroplasten in den Samen der Tic32 Mutanten gestört ist, wurde versucht, mit elektronenmikroskopischen Bildern zu zeigen, dass die Plastiden tatsächlich Fehlbildungen aufzeigen. In den Plastiden der Wildtypsamen ist ein intaktes Thylakoidsystem vorhanden (Abb. 26). In den Plastiden der Mutanten hingegen sind nur wenig Thylakoide vorhanden und das Stroma enthält große Einschlusskörperchen (Abb. 26).



**Abb. 26: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Plastiden aus Embryonen von *Arabidopsis thaliana* Wildtyp und Mutante.** Gezeigt sind jeweils Plastiden aus einem Wildtypembryo (A) und einem Embryo der Tic32-Mutante (B). Während die Wildtypplastiden normale Thylakoidmembranen ausbilden, sind in den Plastiden der Mutante nur wenig Thylakoide erkennbar, dafür aber große Einschlusskörperchen.

## 4.7 Proteinimportstudien

### 4.7.1 Der Import von FNR-Isologen in den Chloroplasten lässt sich durch die Gabe von deamino-NAD und HAR beeinflussen.

Mit Tic32 wurde nach Tic55 und Tic62 die dritte Tic-Komponente identifiziert, die als potentieller Elektronenüberträger dienen kann. Tic55 hat ein Eisen-Schwefel-Zentrum und eine mononukleare Eisenbindestelle (Caliebe et al., 1997) während Tic62 ähnlich wie Tic32 Homologien zu Dehydrogenasen aufweist (Kuchler et al., 2002). Zusätzlich hat Tic62 im C-terminalen Bereich eine repetitive Aminosäuresequenz, die FNR (Ferredoxin-Oxidoreduktase) binden kann. Normalerweise ist die FNR mit der stromalen Seite der Thylakoidmembran assoziiert und katalysiert den Elektronentransfer zwischen Ferredoxin und  $\text{NADP}^+$ . Die Identifizierung dieser drei Komponenten deutet auf eine mögliche Redox-Regulation des Proteinimports in Chloroplasten hin.

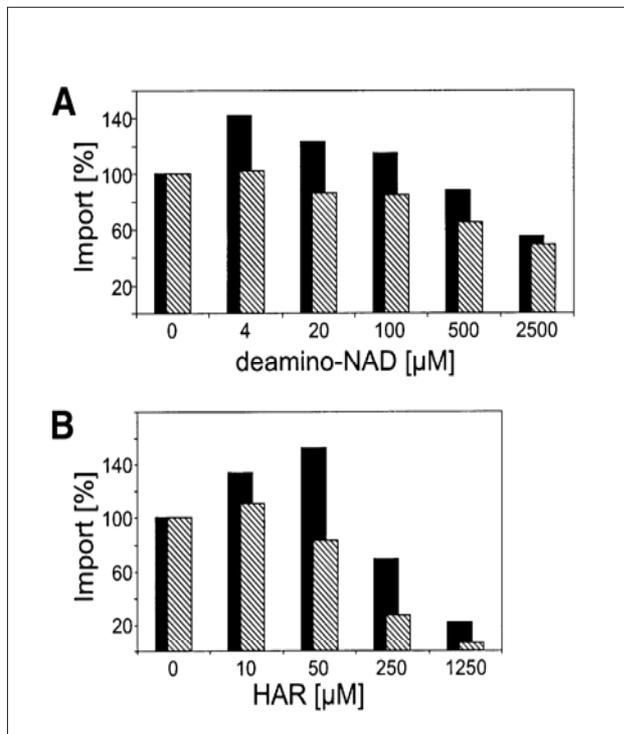
Arbeiten von Hirohashi und Mitarbeitern (2001) zeigten, dass unterschiedliche Ferredoxin-Isologe in Licht und im Dunkel unterschiedliche Importverhalten zeigten. Während Ferredoxin I im Licht und im Dunkel gleich gut importierte, wurde Ferredoxin III im Licht in den Intermembranraum fehlimportiert. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit FNR-Isoformen erzielt. Um den Zusammenhang zwischen Import von unterschiedlichen Isoformen von Proteinen und einem bestimmten metabolischen Zustand des Chloroplasten aufzuzeigen, wurden weitere Versuchen durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst der Einfluss von deamino-NAD und Hexaminruthenium Trichlorid (HAR) auf den Import verschiedener FNR-Isoformen aus *Arabidopsis thaliana* untersucht. HAR ist ein wasserlöslicher Elektronenakzeptor, der Pyridinnukleotide oxidiert, also Bedingungen schafft,

die im Chloroplasten bei Dunkelheit vorliegen (Zickermann et al., 2000). Deamino-NAD bindet irreversibel an NAD-Bindestellen, kann dann aber nicht vom Enzym umgesetzt werden. Das bedeutet, dass kein NAD(P)H mehr umgesetzt wird. In einer Serie von Experimenten wurden die isolierten Chloroplasten mit dem NAD<sup>+</sup>-Kompetitor deamino-NAD 15min vor der Importreaktion inkubiert.

Der Import von FNR-L1 wurde bei niedrigen deamino-NAD Konzentrationen von 4-20 $\mu$ M um ungefähr 40% gesteigert (Abb. 27A). Erst eine Konzentration von mehr als 500 $\mu$ M deamino-NAD ließ die Importrate von FNR-L1 sinken.

Die Importrate von FNR-L2 hingegen wurde schon bei einer deamino-NAD Konzentration von 20 $\mu$ M um ungefähr 50% gehemmt. Wurden die Chloroplasten vor der Importreaktion mit HAR inkubiert, war der Import von FNR-L2 stark inhibiert und bei einer HAR Konzentration von 1.25mM war der Import vollständig gehemmt (Abb. 27B). Der Import von FNR-L1 hingegen wurde in der Anwesenheit von geringen Konzentrationen HAR (bis 50 $\mu$ M) wieder 50-60% gesteigert (Abb. 27B).

Eine Hemmung des FNR-L1 Imports wurde erst wieder bei höheren HAR Konzentrationen erreicht. Allerdings wurde der Import von FNR-L1 im Gegensatz zum Import von FNR-L2



**Abb. 27: Verschiedene FNR-Isoformen zeigen unterschiedliches Importverhalten.** Gezeigt ist der Import der Vorstufenproteine von FNR-L1 (dunkle Balken) und FNR-L2 (gestrichelte Balken) in isolierte Chloroplasten, die vor der Importreaktion für 15 min mit deamino-NAD (A) oder HAR (B) inkubiert wurden. Die Importreaktionen wurden für 4 min bei 25°C im Dunkeln durchgeführt. Es wurden jeweils fünf unabhängige Experimente analysiert.

nie ganz gehemmt (Abb. 27B). Der unterschiedliche Effekt von HAR auf den FNR-Import könnte durch eine zweiphasige Inhibierung zustande kommen.

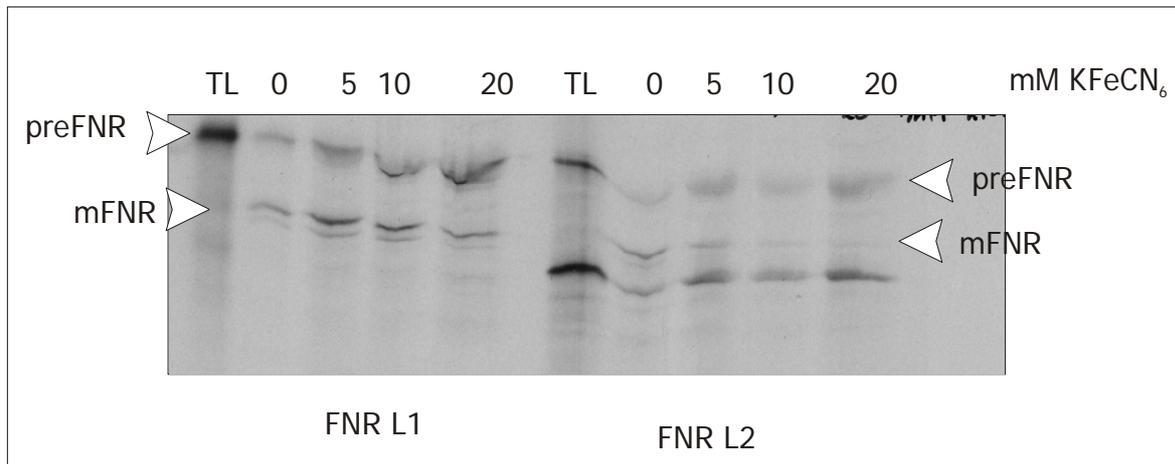
Bei niedrigen Konzentrationen oxidiert HAR den NAD(P)H-Pool im Stroma. Dieser selektive Effekt bewirkt ein Ansteigen der Importrate von FNR-L1 bei einem hohen NAD(P<sup>+</sup>)/NAD(P)H Verhältnis. Höhere Konzentrationen von HAR könnten auch unspezifisch andere Redoxkomponenten im Chloroplasten wie z.B. Glutathion oder Thioredoxin oxidieren und das führt dann zu einer nicht-spezifischen Inhibierung des Imports von sowohl FNR-L1 und FNR-L2.

Der stimulierende Effekt, den sowohl HAR als auch deamino-NAD auf den Import von FNR-L1 haben, deutet darauf hin, dass FNR-L1 vorzugsweise bei einem hohen NAD(P<sup>+</sup>)/NAD(P)H Verhältnis importiert wird, also beispielsweise im Dunkeln.

#### **4.7.2 Der Redoxzustand des Chloroplasten beeinflusst den Proteinimport von FNR-und Fd-Isologen**

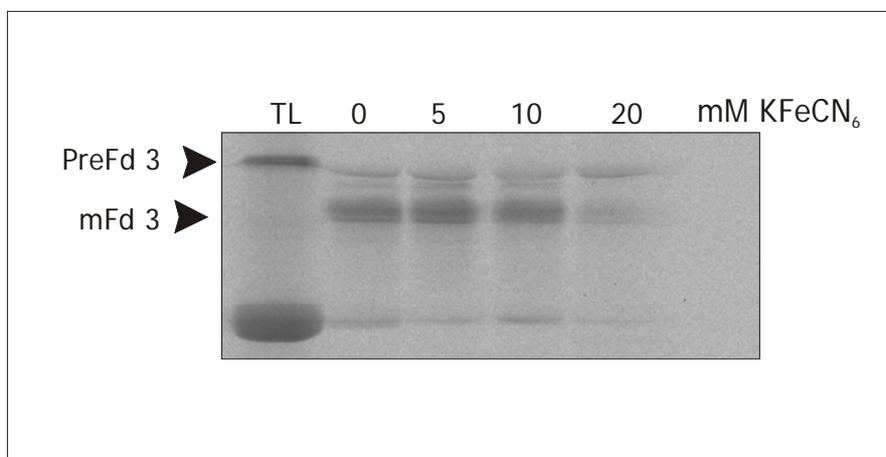
In weiteren Versuchansätzen wurde in den Elektronentransport der Photosynthese eingegriffen, und zwar am Photosystem I. Unter Lichteinstrahlung erhält das Photosystem I Elektronen vom reduzierten Plastocyanin, die dann weiter auf ein Ferredoxin übertragen werden. Das Ferredoxin liefert dann die Elektronen für die Reduktion von NADP<sup>+</sup> zu NADPH<sub>2</sub>, welche von der Ferredoxin- NADP<sup>+</sup>-Oxidoreduktase katalysiert wird. In diesem Versuchsansatz wurden die Chloroplasten 10 min vor dem Import mit K(FeCN)<sub>6</sub> inkubiert, ein Oxidationsmittel, welches die Elektronen am Photosystem I übernimmt, und diese somit nicht mehr zur Reduktion des NADP<sup>+</sup> zur Verfügung stehen.

Der Import von FNR-L1 wurde durch die Gabe von 5mM K(FeCN)<sub>6</sub> gesteigert, durch die Gabe von 10mM oder 20mM jedoch nicht weiter beeinflusst (Abb. 28, Spur 5mM). Die Importrate von FNR-L2 dagegen wurde schon bei einer Konzentration von 5mM K(FeCN)<sub>6</sub> deutlich gehemmt (Abb. 28, Spur 5mM), bei höheren Konzentrationen wurde der Import weiter inhibiert (Abb. 28, Spur 10 und 20mM).



**Abb. 28: Einfluss von Kaliumhexacyanoferrat auf den Import von FNR-L1 und -L2.** Vor der Importreaktion wurden isolierte Chloroplasten mit verschiedenen Konzentrationen KFeCN<sub>6</sub> (0; 5; 10; 20mM) für 10 min im Dunkeln inkubiert. Der Import wurde für 10 min bei 25°C im Dunkeln durchgeführt. Bei einer K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] Konzentration von 1mM verringert sich die Importrate von FNR-L2 (Spur 1; FNR-L2), während FNR-L1 bei allen KFeCN<sub>6</sub> Konzentrationen gleiches Importverhalten aufweist.

Die Importraten von Ferredoxin 1 und 2 wurden durch die Gabe von K(FeCN)<sub>6</sub> nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt), der Import von Ferredoxin 3 wurde erst bei einer K(FeCN)<sub>6</sub> Konzentration von 20mM gehemmt (Abb. 29, Spur 20mM).

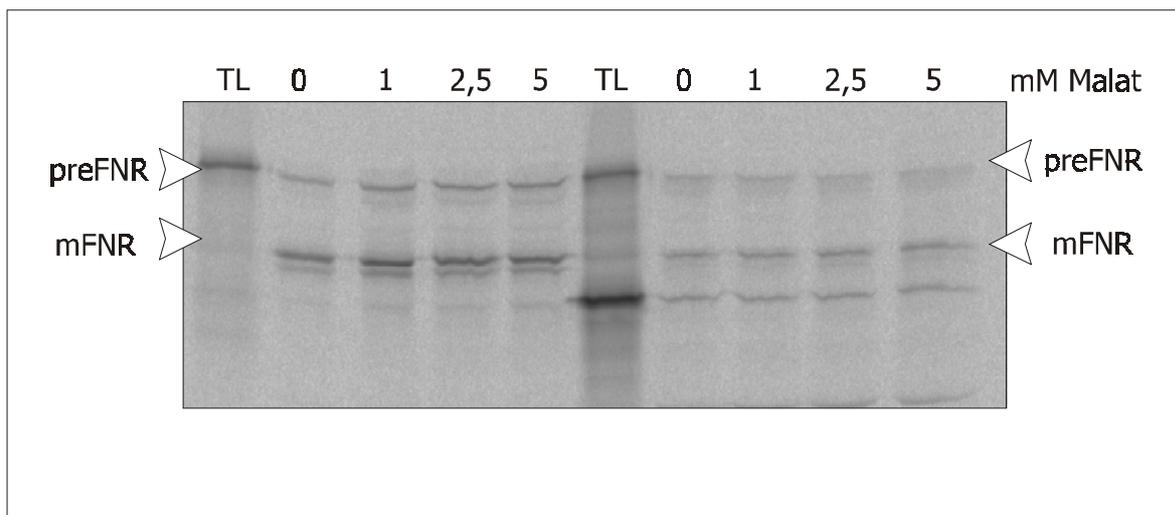


**Abb. 29: Einfluss von Kaliumhexacyanoferrat auf den Import von Ferredoxin 3.** Vor der Importreaktion wurden isolierte Chloroplasten mit verschiedenen Konzentrationen KFeCN<sub>6</sub> (0; 5; 10; 20mM) für 10 min im Dunkeln inkubiert. Der Import wurde für 10 min bei 25°C im Dunkeln durchgeführt. Erst bei einer K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] Konzentration von 20mM verringert sich die Importrate von Ferredoxin 3 (Spur 20mM).

Auch der Austausch von Kohlenhydraten zwischen dem Chloroplasten und dem Cytosol kann den Redoxstatus des Chloroplasten vermitteln. Ein Beispiel für ein solches Redox „Ventil“, das durch Kohlenhydratstoffwechsel kontrolliert wird, ist der Malat-Oxalacetat-Transporter (Heineke et al., 1991). In weiteren Importversuchen sollte also dieses Ventil genutzt werden, den NAD(P)H Vorrat im Chloroplasten zu oxidieren oder zu reduzieren. Dafür wurden die

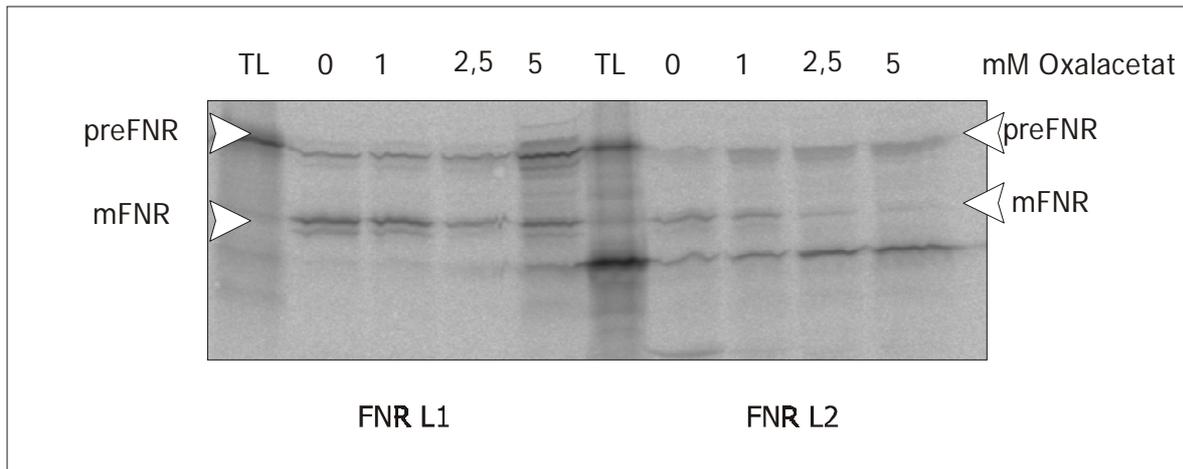
Chloroplasten 10 min vor dem Import zunächst mit verschiedenen Konzentrationen Malat inkubiert. Malat kann in den Chloroplasten transportiert werden und wird dort durch die  $\text{NADP}^+$ -spezifische Malat-Dehydrogenase in Oxalacetat umgebaut. Dabei entsteht NADPH, was bedeutet, dass das Stroma des Chloroplasten stark reduziert wird.

Malat hat in den Importansätzen keinen Einfluss auf den Import, beide FNR-Isoformen, sowie beide Ferredoxin-Isoformen, scheinen mit und ohne Malatinkubation gleich gut importiert zu werden (Abb. 30).



**Abb. 30: Einfluss von Malat auf den Import von FNR-L1 und -L2.** Vor der Importreaktion wurden isolierte Chloroplasten mit verschiedenen Konzentrationen Malat (0; 1; 2,5; 5mM) für 10 min im Dunkeln inkubiert. Malat hat keinen Einfluss auf den Import beider FNR Formen.

Ein anderes Bild ergibt sich aber, wenn die Chloroplasten vor dem Import mit Oxalacetat inkubiert werden. Oxalacetat wird über den Malat-Oxalacetat Transporter in den Chloroplasten transportiert, wo es dann mit Hilfe der Malat-Dehydrogenase in Malat umgesetzt wird, wobei  $\text{NADPH}$  zu  $\text{NADP}^+$  oxidiert wird. Während die FNR-L1 bei allen Oxalacetat-Konzentrationen gleich gut importiert (Abb. 31) wird der Import der FNR-L2 schon bei einer Oxalacetat Konzentration von 1mM deutlich reduziert (Abb. 31, Spur 1mM).



**Abb. 31: Einfluss von Oxalacetat auf den Import von FNR-L1 und -L2.** Vor der Importreaktion wurden isolierte Chloroplasten mit verschiedenen Konzentrationen Oxalacetat (0; 1; 2,5; 5mM) für 10 min im Dunkeln inkubiert. Der Import wurde für 10 min bei 25°C im Dunkeln durchgeführt. Oxalacetat scheint einen Einfluss auf den Import der FNR-L2 zu haben. Bei einer Konzentration von 2,5mM Oxalacetat verringert sich die Importrate der L2 Form (Spur 2,5; FNR-L2) während die FNR-L1 Form bei allen Oxalacetat Konzentrationen gleiches Importverhalten aufweist.

Die Ferredoxine 1 und 3 zeigen keine Veränderung im Importverhalten nach Inkubation mit Oxalacetat (Ergebnis nicht gezeigt).

## 5. Diskussion

### 5.1 Tic110

#### 5.1.1 Topologie und Struktur von Tic110

Tic110 ist die einzige Komponente, deren Zugehörigkeit zum Tic-Komplex von allen Arbeitsgruppen akzeptiert wird. Mit Quervernetzungsexperimenten, Immunopräzipitation und Affinitätschromatographie wurde Tic110 zusammen mit einem translozierenden Präprotein und Toc-Komponenten gefunden (Akita et al., 1997; Lubeck et al., 1996). Die Funktion und die Topologie von Tic110 ist aber immer noch umstritten. Zum Einen kann es an der Ausbildung von Translokationsverbindungen zwischen dem Toc- und Tic-Komplex beteiligt sein, da es in Quervernetzungsexperimenten zusammen mit Toc75 und einem Vorstufenprotein gefunden wurde. Zum Anderen könnte es auf der stromalen Seite die für die Translokation erforderlichen Chaperone wie cpn60 und ClpC rekrutieren. Eine dritte mögliche Funktion von Tic110 wurde von Heins und Mitarbeitern gezeigt (Heins et al., 2002). Rekombinantes Tic110 bildete in elektrophysiologischen Messungen einen Kationen selektiven Kanal, daraus wurde geschlossen, dass Tic110 einen Teil der Proteinimportpore des Tic Komplexes bildet. Auch die Topologie des Proteins ist nicht klar. Laut Computervorhersagen liegen im N-Terminus 2 hydrophobe Transmembranhelizes und der C-Terminus bildet eine globuläre Domäne. Die kann zum einen ins Stroma ragen, wo dann Chaperone rekrutiert werden könnten oder in den Intermembranraum, wo eine Verbindung zwischen Tic und Toc gebildet wird. Heins und Mitarbeiter beschreiben, basierend auf CD-Daten, im C-Terminus  $\beta$ -Faltblätter, die die Pore bilden.

Auf Grund der kontroversen Diskussion um Tic110 wurde in dieser Arbeit ein CD-Spektrum mit überexprimiertem, denaturiertem und rückgefaltetem Protein durchgeführt. Im Gegensatz zu dem Ergebnis von Heins und Mitarbeitern zeigte das CD-Spektrum eine vorwiegend  $\alpha$ -helikale Struktur für Tic110 an. Im Hinblick darauf, dass Tic110 ein Protein der inneren Hüllmembran von Chloroplasten ist, und diese sich von der Plasmamembran des eingewanderten Cyanobakteriums ableitet, erscheint die Struktur wahrscheinlicher. Bis heute wird in der Literatur kein Protein einer inneren bakteriellen Membran beschrieben, welches  $\beta$ -Faltblätter ausbildet. Die  $\beta$ -Faltblattstruktur, die im CD fälschlicherweise gemessen wurde, kann dadurch zustande kommen, dass zuviel Detergenz (hier: Mega-9) für die Messung eingesetzt wurde.

Der proteolytische Verdau von inneren Chloroplastenhüllmembranen sollte Aufschluss über die Topologie von Tic110 geben. Die eingesetzte Protease Trypsin ist unter den gewählten

Versuchsbedingungen nicht membranpermeabel und es werden nur Peptide abgespalten, die auf der Aussenseite der Vesikel sitzen. Als Kontrollprotein wurde Tic40 eingesetzt. Tic40 ließ sich nicht von Trypsin verdauen, da es ein integrales Membranprotein ist, das ins Stroma ragt. Der Verdau von Tic110 ergibt mehrere Fragmenten, was bedeuten muß, dass das Protein die Membran eventuell mehrfach durchspannt und somit mehrere Teile des Proteins der Protease zugänglich sind. Die Fragmente sind teilweise schon in der Probe ohne Protease zu erkennen. Das liegt an internen Proteasen, die während der Aufarbeitung der inneren Hüllmembranen freigesetzt werden. Da aber die Orientierung der Vesikel nicht eindeutig geklärt werden konnte („right-side-out“, „inside-out“, beides zusammen), wurde der Versuch an ganzen Chloroplasten wiederholt. Toc34 und Tic22 sind schon nach einer Minute Inkubation mit der Protease fast vollständig abgebaut, während Tic40 und Tic62 auch nach 10 min noch intakt waren. Das bedeutet, dass die Protease die äussere Hüllmembran schon passiert hatte, aber die innere Hüllmembran noch nicht und somit sind Proteine, die ins Stroma ragen, noch geschützt. Tic110 wird mit steigender Inkubationszeit abgebaut, was bedeutet, dass es einen Teil des Proteins geben muß, der auf der Aussenseite der inneren Hüllmembran exponiert ist. Da im Thermolysinverdau mehrere Fragmente entstehen, ist es unwahrscheinlich, dass eine C-terminale globuläre Domäne in den Intermembranraum zeigt; viel mehr ist vorstellbar, dass der C-Terminus tatsächlich mit mehreren Membranhelizes die innere Membran durchspannt und somit einige Fragmente vor der Protease geschützt werden. Hydrophobe Helizes werden von gängigen Vorhersageprogrammen nicht vorhergesagt, allerdings wäre die Ausbildung von amphiphilen Helizes möglich.

In einem anderen Experiment, das zur Klärung der Topologie von Tic110 durchgeführt wurde, wurde Affinitätschromatographie angewendet. In der Literatur ist beschrieben, dass der C-Terminus von Tic110 Chaperone rekrutiert, die für die vollständige Translokation von Vorstufenproteinen zuständig sind (Inaba et al., 2003; Jackson et al., 1998). Zwei unterschiedliche Fragmente des C-Terminus von Tic110 wurden an Ni-NTA gekoppelt und mit dem Überstand lysierter Chloroplasten inkubiert. Sowohl in den Eluatfraktionen des längeren C-terminus (AS 178-985) als auch des verkürzten Fragments (As 851-985) wurden HSP93 und HSP70 gefunden, ein Zeichen dafür, dass ein Teil des C-Terminus in jedem Fall in das Stroma ragen muß. Um auszuschließen, dass die Tic110-Domänen an der Säule nicht richtig rückgefaltet wurde und die HSP Proteine deshalb an Tic110 gebunden hatten, wurden Kontrollsäulen gemacht: zum einen wurde eine Nickelsäule ohne Protein eingesetzt und zum anderen eine Nickel-Säule, an die überexprimiertes Tic32 gekoppelt und rückgefaltet wurde. In beiden Fällen konnte in den Eluatfraktionen weder HSP70 noch HSP93 detektiert werden.

Ein Protein des Intermembranraums wie Tic22 wurde nicht detektiert. Es wird postuliert, dass Tic22 eine Komponente des sogenannten Intermembranraumkomplexes ist, der Vorstufenproteine am Toc Komplex entgegennimmt und zum Tic Komplex führt. In diesem Experiment kann Tic22 eventuell nicht nachgewiesen werden, da der Anteil an Intermembranraum gegenüber dem Stroma sehr gering ist.

Abschließend lässt sich leider keine eindeutige Aussage über Topologie und Funktion von Tic110 treffen. Andere Arbeitsgruppen favorisieren Tic20 als Pore (Rassow et al., 1999). Vergleicht man allerdings die Proteinmengen von Tic20 und Tic110 im Vergleich zu der Proteinmenge der Pore der äusseren Hüllmembran, kann man feststellen, dass Tic20 nicht in Coomassie färbbaren Mengen in der Membran vorliegt. Tic110 ist in ähnlich großen Mengen vorhanden, wie Toc75. Zu beachten ist weiterhin, dass ein Tic20 Protein nicht ausreicht, um eine Pore zu bilden. Man bräuchte mindestens zwei bis drei Tic20 Proteine. Wenn man also davon ausgeht, dass der größte Teil von Toc75 als funktionelle Pore in der äußeren Membran vorliegt, müsste es einen „Proteinstau“ im Intermembranraum geben, wenn Tic20 die Pore der inneren Hüllmembran bildet. Desweiteren untersuchten Vojta und Mitarbeiter (2004) die Transkriptionsraten aller bekannten Toc- und Tic Komponenten. Dabei stellte sich heraus, dass Tic20IV in grünen Blättern gar nicht exprimiert wird und das Toc75-Protein in einem 10fachen molaren Überschuss gegenüber Tic20 vorliegt. Das Verhältnis von Toc75 zu Tic110 beträgt nur 1,4.

Zwei weitere Möglichkeiten gäbe es die Pore der inneren Hüllmembran zu bilden. Zum Einen könnte die Pore gemeinsam von Tic20 und Tic110 gebildet werden. Zum Anderen könnte es aber auch unterschiedlich zusammengesetzte Tic Komplexe geben, die je nach der zu importierenden Proteinfamilie, aus unterschiedlichen Tic Komponenten dynamisch zusammengesetzt werden. Da könnten sowohl Tic20 als auch Tic110 als Pore eine Rolle spielen.

## **5.2 Charakterisierung von IEP32**

### **5.2.1 IEP32 interagiert mit dem N-Terminus von Tic110**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zugehörigkeit von IEP32 zum Tic Komplex gezeigt und als neue Tic Komponente charakterisiert. Zusammen mit Tic62 und Tic55 könnte IEP32 ein Redoxregulationssystem der Proteintranslokation an der inneren Hüllmembran darstellen.

In Vorarbeiten wurden Interaktionspartner für den N-Terminus von Tic110 gesucht. Zu diesem Zweck wurde der N-Terminus von Tic110 überexprimiert und an eine Ni-NTA Säule gekoppelt. Innere chloroplastidäre Hüllmembranen wurden mit Decylmaltosid solubilisiert und über die Tic110 Säule gegeben. Nach Elution mit steigender Salzkonzentration konnte im

Silbergel nur ein Protein detektiert werden. Entsprechend seines apparenten Molekulargewichts wurde es IEP32 genannt. Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Zugehörigkeit von IEP32 zum Tic Komplex zu zeigen und eine mögliche Funktion als Redoxregulator zu untersuchen. Eine Wiederholung des oben beschriebenen Experiments ergab ein ähnliches Ergebnis, auch hier war IEP32 das einzige Protein, dass von der Säule mit steigender Salzkonzentration eluiert werden konnte, was auf eine starke Interaktion zwischen IEP32 und Tic110 hindeutet. Homologievergleiche von IEP32 mit der Proteindatenbank lassen darauf schließen, dass IEP32 zu den sogenannten „short-chain“ Dehydrogenasen (SDR) gehört. SDRs sind evolutiv stark konservierte Proteine, die an einer Vielzahl unterschiedlicher Prozesse beteiligt sein können. Sie werden in allen Organismen gefunden. Charakteristische Merkmale sind zum einen eine durchschnittliche Größe von 250 AA und zum anderen drei unterschiedliche Sequenzmotive: (i) am N-Terminus TGXXXGXXG, das für die Bindung des Coenzym NAD(P<sup>+</sup>) verantwortlich ist, (ii) NNAG, ein hoch konserviertes Motiv, das für die Stabilisierung des zentralen  $\beta$ -Faltblattes sorgt, (iii) und das aktive Zentrum YXXXG (Kallberg et al., 2002a; Oppermann et al., 2003). Short-Chain Dehydrogenasen sind an einer Vielzahl von Prozessen in der Zelle beteiligt, einige Beispiele sind der Fettsäure- und Kohlenhydrat Metabolismus, Transkriptionsregulation und Apoptose (Chang et al., 2003; Cheng et al., 2002; Kim et al., 2003; Oppermann et al., 2003; Rylott et al., 2003; Stammers et al., 2001). Einige SDR Enzyme sind ständig membrangebunden und bilden Komplexe mit anderen Membranproteinen, wie zum Beispiel die Retinol Dehydrogenase (RDH) (Simon et al., 1995; Simon et al., 1999). IEP32 ist ein Ortholog eines kürzlich beschriebenen SDR-Clusters, der bei einem Vergleich unterschiedlicher Spezies gefunden wurde, wie in Figur 1 zu sehen (Kallberg et al., 2002b). Die molekulare Funktion dieses Clusters wurde bei *Homo sapiens* detailliert untersucht, wie zum Beispiel an der WWOX Reduktase, ein Onkogen, das mit den Signalmolekülen JNK1 oder p53 interagiert und so an der Stress-Signalleitung beteiligt ist. Eine Substratspezifität ist nicht bekannt. IEP32 weist zwar keine WW Domäne auf, ist aber ähnlich zu anderen Mitgliedern des Clusters, den humanen Retinol Dehydrogenasen RDH11 und RDH13. Sie weisen keine Transmembrandomänen auf, sind aber sehr hydrophob und sind an die ER Membran gebunden.

Da eine Assoziation von IEP32 mit Tic110 nicht zwangsläufig bedeutet, dass IEP32 am Proteinimport beteiligt ist, wurde die Zugehörigkeit von IEP32 zum Tic Komplex mit Hilfe von Co-Immunopräzipitationen untersucht. Mit Antiseren gegen IEP32 und Tic110 konnten alle anderen Tic Komponenten, wie Tic110, Tic62, Tic40, IEP32 und Tic22 präzipitiert werden. In einem zweiten Schritt wurde getestet, ob IEP32 mit Vorstufenproteinen während

der Translokation interagiert. Zu diesem Zweck wurde die chemische Quervernetzung mit Dithiobissuccinylpropionat während eines *in vitro* Importversuchs eingesetzt (Akita et al., 1997; Chou et al., 2003). pSSU konnte vom Antiserum gegen IEP32 immunpräzipitiert werden, sogar die mature Form, ein Zeichen dafür, dass IEP32 eventuell eine Rolle in einem späteren Stadium des Imports spielt (Chou et al., 2003). Die Zugehörigkeit von IEP32 zum Tic Komplex war somit erfolgreich gezeigt und IEP32 wurde in Tic32 umbenannt.

Um die mögliche Rolle von Tic32 während des Proteinimports näher zu untersuchen, wurde zunächst getestet, ob Tic32 NADH<sub>2</sub> oder NAD(P)H bindet. Dafür wurden solubilisierte innere chloroplastidäre Hüllmembranen mit <sup>32</sup>P-NADH bzw. <sup>32</sup>P-NAD(P)H inkubiert. Nur mit NAD(P)H konnte ein radioaktives Signal auf Höhe von Tic32 detektiert werden. Das radioaktiv markierte Protein konnte mit Antikörpern gegen Tic32 gefällt werden, wenn auch nur schwach. Allerdings ist die Effizienz bei der Herstellung von radioaktivem NAD(P)H wahrscheinlich recht gering und davon ausgehend, dass man sowohl in der Bindungsreaktion als auch in der Immunpräzipitation Verlust von NAD(P)H<sub>2</sub> hat, ist ein schwaches Signal nicht unwahrscheinlich. Man kann aber an Hand dieses Experiments sagen, dass Tic32 NAD(P)H besser zu binden scheint als NADH.

Nachdem für Tic32 eine Nukleotidbindung gezeigt war, wurde getestet, ob Tic32 als Dehydrogenase aktiv ist. Ein Beispiel einer nicht mehr aktiven Dehydrogenase ist der Transkriptionsfaktor NmrA. Das aktive Zentrum ist so mutiert, dass NADH<sub>2</sub> nicht mehr umgesetzt wird. Für eine Aktivitätsmessung wurde K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] als Elektronenakzeptor eingesetzt, da für Tic32 kein Substrat bekannt ist. Verglichen mit den Negativkontrollen zeigen sowohl die inneren chloroplastidären Hüllmembranen als auch Tic32 Dehydrogenaseaktivität, wobei die Abnahme der NADH<sub>2</sub>- Extinktion in dem Ansatz mit inneren Chloroplastenhüllmembranen stärker ist als für aufgereinigtes Tic32. Die Vermutung liegt nahe, dass in inneren chloroplastidären Hüllmembranen weitere funktionelle Dehydrogenasen vorhanden sind, die zur höheren Gesamtaktivität beitragen. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität von Tic32 müsste nun eine bekannte Dehydrogenase parallel gemessen und die Substratumsätze verglichen werden. Weiterhin ist für Tic32 kein Substrat bekannt und somit können keine optimalen Aktivitätsbedingungen geschaffen werden. Obwohl der Bindungstest ergeben hat, dass Tic32 eher NAD(P)H bindet als NADH, ergaben die Aktivitätsmessungen mit NADH eindeutiger Ergebnisse. Auch das kann darauf zurückzuführen sein, dass Tic32 weder in der optimalen „Umgebung“ vorliegt, noch das optimale Substrat vorhanden ist. Dieses Experiment zeigt, dass Tic32 wahrscheinlich als

Dehydrogenase aktiv ist, aber wie dieses Dehydrogenaseaktivität die Aktivität des Tic-Komplexes beeinflusst, muss mit weiteren Experimenten gezeigt werden.

### 5.2.2 Tic32 T-DNA Insertionslinien sind Embryo-letal

Zur Klärung der Funktion von Tic32 wurden zwei unabhängige T-DNA Insertionslinien von dem *Arabidopsis thaliana* Homolog at4g23430 analysiert. Es gibt noch ein zweites Gen, das sehr homolog zum *Pisum sativum* Tic32 ist, at4g11410, aber die Homologie zu at4g23430 ist höher als zu at4g11410. Ausserdem wird at4g23430 in allen Geweben exprimiert, während at4g11410 nicht in Samen exprimiert wurde (Abb.). Des Weiteren wurde at4g23430 in einem Proteom-Projekt als Protein der inneren Hüllmembran von Chloroplasten identifiziert (Ferro et al., 2003). Bei einer Insertionslinie lag die T-DNA im Intron 1 integriert vor (Syngenta, USA), während die Insertionslinie aus Köln die Insertion in Exon IV aufwies. Überraschenderweise konnten keine für die Mutation homozygoten Pflanzen regeneriert werden, was darauf hindeutete, dass die Mutation für die Pflanzen Embryo-letal ist. Diese Vermutung wurde durch die Analyse der Schoten bestätigt. Ungefähr 20% der Samen waren abgestorben. In jüngeren Schoten erschienen die abgestorbenen Samen weiß, während in älteren Schoten die Samen braun und vertrocknet waren. Diese abgestorbenen Samen keimten auch nicht mehr auf saccharosehaltigen Agarplatten. Mikroskopische Bilder von den Embryonen zeigten, dass die Entwicklung auf Höhe des Herzstadiums stehenblieb. Solch ein drastischer Phänotyp wurde bis jetzt für nur für atTic110 Mutanten beschrieben (Kovacheva et al., 2005). Auch bei dieser Mutante keimten 25% der Samen nicht, und mikroskopische Aufnahmen der Embryonen zeigten, dass die Entwicklung im Proembryo oder globulären Stadium stoppte. T-DNA Insertionslinien von atToc159 (*ppi2*) sind auf Murashige und Skoog Medium lebensfähig aber nicht auf Erde, das bedeutet, dass sie Keimling-letal sind (Bauer et al., 2000; Bauer et al., 2001). Nähere Analyse dieser Mutante zeigte, dass der Gehalt an photosynthetischen Proteinen reduziert war, nicht aber der Gehalt an nicht-photosynthetischen Proteinen. Thylakoidmembranen wurden nicht ausgebildet, die Plastiden sahen aus wie Proplastiden. T-DNA Mutanten von atToc33 (*ppi1*) waren ebenfalls in ihrem Gehalt an photosynthetischen Proteinen reduziert, allerdings waren die Pflanzen lebensfähig (Kubis et al., 2003). Vor allem der Import von pSSU und pOE33 waren betroffen. Es konnte gezeigt werden, dass insbesondere die Anbindung von pSSU an den Toc-Komplex reduziert war. Von Toc64 sind bis jetzt nur Mutanten von *Physcomitrella patens* charakterisiert worden. Selbst die Mutante von beiden Toc64- Isologen zeigte keinen ausgeprägten Phänotyp und die Importraten sind ähnlich wie die Importraten vom Wildtyp. Allerdings ist die Form der Chloroplasten leicht verändert. Die Autoren schließen daraus, dass Toc64 nicht am Import

beteiligt ist (Hofmann und Theg, 2005). Die Tatsache, dass das Protein für den Chloroplasten nicht essentiell zu sein scheint, ist allerdings kein Beweis dafür, dass Toc64 nicht am Import beteiligt ist. *Tic40* null Mutanten waren blass und zeigten eine reduzierte Importrate, aber waren lebensfähig auf Erde (Chou et al., 2003), ähnlich wie Antisense Linien von *atTic20* (Chen et al., 2002a). Da *Tic32* null Mutanten einen solch drastischen Phänotyp aufweisen, muß es eine essentielle Funktion in der Plastidenentwicklung während der Embryogenese haben. Die enge Assoziation mit *Tic110*, und die Tatsache, dass *Tic110* als Pore des Tic Komplexes diskutiert wird, könnten ein Hinweis darauf sein, dass *Tic32* die Öffnung von *Tic110* kontrolliert, ähnlich wie  $\beta$ -Untereinheiten von Kalium-Kanälen. Dort inaktiviert die  $Kv\beta$  Oxidoreduktase den Kaliumkanal *Kv* über Redoxregulation (Bähring et al., 2001). Es gibt ausserdem Überlegungen, dass *Tic110* sich aus einem Kaliumkanal entwickelt haben könnte. Kaliumkanäle haben hochkonservierte Motive, unter anderem das Porenmotiv, welches TXXTTVGYG lautet (Tempel et al., 1987). Im N-Terminus von *Tic110* findet man Reste von diesem Motiv, und zwar 87-VAGYG-90.

In Säugetieren gibt es sogenannte ASICs (Acid-sensing ion channels), die ihre Öffnung über den Redoxzustand des sie umgebenden Gewebes regulieren (Andrey et al., 2005). Da mit *Tic55* und *Tic62* noch zwei weitere Proteine des Tic Komplexes Charakteristika von Redoxkomponenten aufweisen, liegt die Vermutung nahe, dass diese drei Komponenten zusammenwirken und die Funktion des Tic Komplexes über Redoxreaktionen regulieren. Im Chloroplasten sind viele Prozesse über Redoxreaktionen reguliert: Zum einen ist die Photosynthese eine Abfolge von Elektronentransfer und Redoxreaktionen (Allen et al., 1995). Der Status des Plastoquinonpools ist maßgeblich an der Regulation der Transkription verschiedener Photosynthesegene beteiligt, wie *psbA*, *psaB* und *psaAB* (Pfannschmidt et al., 1999; Tullberg et al., 2000). Des Weiteren kontrolliert der Status des Plastoquinonpools auch die Expression der *cab*-Gene im Kern, die für einige Untereinheiten des LichtsammelkomplexesII (LHCII) codieren (Escoubas et al., 1995). In diesem System werden Proteinkinasen durch Licht oder reduzierende Konditionen aktiviert und phosphorylieren Membranproteine vom LHCII Komplex (Vener et al., 1998). Es wird diskutiert, dass dieser phosphorylierte Zustand die Expression der *cab*-Gene im Kern reguliert (Rintamaki et al., 2000). Wie das Redoxsignal vom Chloroplasten zum Kern gelangt, ist noch nicht geklärt.

Ein weiteres System im Chloroplasten, welches sich Redoxzustände des Chloroplasten zu Nutze macht, ist das Thioredoxin-Ferredoxin System. Im Chloroplasten gibt es vier Thioredoxin-Isoformen, nämlich m, f, x und y (Collin et al., 2003; Lemaire et al., 2003; Schurmann und Jacquot, 2000). Die Thioredoxine erhalten die benötigten Elektronen aus der

Photosynthese vom Ferredoxin. Die Thioredoxine m und f regulieren vor allem die Enzyme des Calvin-Zyklus, also Fructose-1,6-bisphosphatase und NADH-Malat Dehydrogenase (Schurmann und Jacquot, 2000). Das 2-Cys Peroxiredoxin wird über das Thioredoxin x reguliert (Collin et al., 2003). Erst kürzlich wurde das Thioredoxin y charakterisiert (Lemaire et al., 2003). Bis jetzt ist darüber nicht viel bekannt; alle Enzyme, die durch die Thioredoxine m, f oder x reguliert werden, werden von Thioredoxin y nicht beeinflusst. Ein möglicher Kandidat für ein durch Thioredoxin y reguliertes Enzym ist Peroxidoxin Q. Weitere Prozesse, die im Chloroplasten redoxreguliert sind, sind die RNA-Degradation (Salvador und Klein, 1999) und –Prozessierung (Deshpande et al., 1997; Liere und Link, 1997), die Translation (Danon und Mayfield, 1994) und der Proteinabbau (Garciaferris und Moreno, 1994). Auch in anderen Organismen ist die Redoxkontrolle bekannt. In *E.coli* gibt es einen Transkriptionsfaktor, SoxR, der über ein Eisen-Schwefel-Zentrum als Redoxsensor funktioniert (Hidalgo et al., 1997). Im Hinblick auf die zahlreichen essentiellen Reaktionen im Chloroplasten, die redoxreguliert sind, erscheint eine Regulation eines so wichtigen Prozesses wie der Proteinimport mittels Redoxkomponenten naheliegend.

### **5.2.3 Der Import von FNR- und Ferredoxin-Isologen lässt sich über den Redoxzustand des Chloroplasten beeinflussen**

Hirohashi und Mitarbeiter konnten erst kürzlich zeigen, dass Licht, und somit der Redoxstatus des Chloroplasten, den Proteinimport *in vitro* beeinflusst (Hirohashi et al., 2001). Im Licht wurde die stromale Ferredoxin Isoform III (FdIII) in den Intermembranraum fehltransportiert. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächstmal der Einfluss von Pyridinnukleotid-bindenden Proteinen wie Tic62 oder Tic32 auf die Importreaktion *in vitro* getestet. Dafür wurden die Chloroplasten vor der Importreaktion mit deamino-NAD oder HAR inkubiert. HAR ist ein wasserlöslicher Elektronenakzeptor, der Pyridinnukleotide oxidiert (Zickermann et al., 2000). Deamino-NAD bindet irreversibel an die NAD-Bindestellen und kann nicht umgesetzt werden. Der Import von FNR-L1 wurde bei geringen Konzentrationen von HAR gesteigert, während bei höheren Konzentrationen die Importrate abnahm. Dieser Effekt beruht wahrscheinlich auf einer zunächst selektiven Oxidation des NAD(P)H-Pools, die noch keine Auswirkung auf den Import hat. Bei höheren Konzentrationen ist die oxidative Wirkung des HAR vorherrschend und verursacht so eine Abnahme der Importrate. Im Gegensatz zu FNR-L2 wird aber der Import von FNR-L1 nie ganz gehemmt, was darauf hinweist, dass beide Proteine unterschiedlich importiert werden. Bei Gabe von deamino-NAD, wurde der Import von FNR-L1 bei Konzentrationen unter 100µM stimuliert. Der Import von FNR-L2 wurde von deamino-NAD nicht beeinflusst. Aus dem Ergebnis kann gefolgert werden, dass ein

hohes NAD(P)/NAD(P)H Verhältnis den Import von FNR-L1 steigert, während der Import von FNR-L2 nicht auf Veränderungen des NAD(P)/NAD(P)H Verhältnisses reagiert. Es konnte nicht gezeigt werden, dass der Effekt von HAR oder deamino-NAD direkt einen Einfluß auf den Redoxstatus des Tic62 oder Tic32 hat. Deshalb wurden weitere Experimente entwickelt, um zu zeigen, dass der Tic Komplex über bestimmte NAD(P)/NAD(P)H Verhältnisse reguliert wird. Denkbar wären auch verschiedene Tic Subkomplexe, die unterschiedliche regulatorische Mechanismen aufweisen.

Im nächsten Experiment wurde der Elektronentransport der Photosynthese hinter dem Photosystem I unterbrochen. Dazu wurden die Chloroplasten vor dem Import mit  $K(FeCN)_6$  inkubiert.  $K(FeCN)_6$  ist ein Elektronenakzeptor und übernimmt die Elektronen am Photosystem I. Diese stehen dann nicht mehr zur Synthese von NAD(P)H zur Verfügung, der NAD(P)H-Pool wird oxidiert. Die Importrate von FNR-L1 wurde durch 5mM  $K_3[Fe(CN)_6]$  gesteigert, höhere Konzentrationen zeigten keine Veränderungen. Der Import von FNR-L2 wurde schon bei einer Konzentration von 5mM  $K_3[Fe(CN)_6]$  deutlich inhibiert. Der Import von zwei Ferredoxin-Isologen, Fd1 und Fd2 wurde nicht weiter beeinflusst, während der Import von Fd3 bei 20mM  $K_3[Fe(CN)_6]$  gehemmt wurde. Weiterhin wurde der Redoxstatus des Chloroplasten über den Kohlenhydratstoffwechsel verändert. Chloroplasten wurden entweder mit Malat oder Oxalacetat inkubiert. Malat scheint keinen Einfluß auf den Import beider FNR-Isoformen und der drei Ferredoxin-Isoformen zu haben. Inkubiert man die Chloroplasten mit Oxalacetat, ergibt sich folgendes Bild: Der Import der FNR-L2 wird ähnlich wie bei den mit  $K_3[Fe(CN)_6]$  inkubierten Chloroplasten schon bei Konzentrationen von 1mM Oxalacetat deutlich reduziert. Auf den Import der FNR-L1 hat Oxalacetat keinen Einfluß. Auch die Ferredoxine 1 und 3 zeigen kein verändertes Importverhalten. Oxalacetat wird über den Malat-Oxalacetat-Transporter in den Chloroplasten transportiert, wo es dann mit Hilfe der Malatdehydrogenase in Malat umgesetzt wird, wobei NAD(P)H zu  $NAD(P)^+$  oxidiert wird. Das würde bedeuten, dass der NAD(P)H-Pool stark oxidiert wird, eine Situation, die in den Pflanzen im Dunkeln vorliegt.

Offensichtlich wird also der Transport von Proteinen, die selbst an Redoxvorgängen im Chloroplasten beteiligt sind, ebenfalls über die „Wahrnehmung“ des Redoxstatus reguliert. Ein „Fühler“ könnten die Tic Komponenten Tic32, Tic55 und Tic62 darstellen, die aufgrund ihrer Dehydrogenaseeigenschaften und des Eisen-Schwefelzentrums in Abhängigkeit des Reduktionsstatus des Chloroplasten die Aktivität des Tic Komplexes ändern könnten. Zur Bestätigung dieser Hypothese sind weitere Experimente notwendig.

## 6. Zusammenfassung

Die Zusammensetzung und Arbeitsweise des Tic-Komplexes ist noch ungeklärt. Tic110 ist die einzige von sieben Komponenten, die allgemein akzeptiert ist. Die Funktion und genaue Topologie des Proteins ist aber noch umstritten (Abb. 3). Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Experimente zur Klärung der Topologie und Funktion des Proteins durchgeführt. Zum Einen wurde über ein CD-Spektrum eine  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur für Tic110 gezeigt. Proteasebehandlung sowohl von Vesikeln der inneren Hüllmembran als auch von intakten Chloroplasten lassen vermuten, dass Bereiche von Tic110 in den Intermembranraum zeigen. Auf der anderen Seite weisen Affinitätschromatographieversuche mit dem C-Terminus von Tic110 darauf hin, dass das Protein im Stroma mit HSP93 und HSP70 interagiert. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass ein Teil des C-Terminus in den Intermembranraum ragt und ein anderer Teil ins Stroma. Ob im C-Terminus amphiphile Helices ausgebildet werden können, muss geklärt werden. Mengenmäßig ist Tic110 prominenter in der inneren chloroplastidären Hüllmembran vorhanden als Tic20, der andere „Kandidat“ für die Pore des Tic Komplexes. Im Vergleich zur Menge von Toc75, der Pore der äußeren Hüllmembran, ist Tic110 in ähnlichen Mengen vorhanden. Tic110 ist also ein geeigneter Kandidat, an der Porenbildung beteiligt zu sein.

Desweiteren wurden Interaktionspartner vom N-Terminus von Tic110 gesucht. Dabei wurde ein 32 kDa Protein gefunden, das große Homologien zu sogenannten „short-chain“ Dehydrogenasen aufweist. In der vorliegenden Arbeit wurde über Importversuche und Immunpräzipitationsexperimente eine Zugehörigkeit des Proteins zum Tic-Komplex gezeigt. Die Komponente wurde Tic32 genannt. Tic32 ist eine funktionelle Dehydrogenase, deren Beteiligung während des Importprozesses noch zu klären bleibt. T-DNA Insertionslinien von Tic32 ergaben, dass das Protein für die Plastidenentwicklung essentiell ist. Da mit Tic32 neben Tic55 und Tic62 nun schon die dritte Tic Komponente gefunden wurde, die Redox-Charakteristika aufweist, wurden verschiedene Importexperimente durchgeführt. Dafür wurden zwei chloroplastidäre FNR-Isologe und zwei chloroplastidäre Fd-Isologe in Chloroplasten importiert, deren Redoxzustand vor der Importreaktion mit verschiedenen Metaboliten oder Redoxkomponenten beeinflusst wurde. Sowohl nach Behandlung der Chloroplasten mit HAR, deamino-NAD, Oxalacetat und Kaliumhexacyanoferrat nimmt die Importeffizienz der FNR L2 Form stark ab. Auch für die Ferredoxin-Isologe ließ sich ein unterschiedliches Importverhalten feststellen, wenn auch nicht so eindeutig wie für die FNR-Isologe. Dieser Regulationsmechanismus muß nun in weiteren Experimenten genauer untersucht werden.

## 7. Literatur

- Abdallah,F., Salamini,F., and Leister,D. (2000) A prediction of the size and evolutionary origin of the proteome of chloroplasts of Arabidopsis *Trends in Plant Science*, **5**, 141-142.
- Akita,M., Nielsen,E., and Keegstra,K. (10-3-1997) Identification of protein transport complexes in the chloroplastic envelope membranes via chemical cross-linking *J Cell Biol.*, **136**, 983-994.
- Alefsen,H., Waagemann,K., and Soll,J. (1994) Analysis of the Chloroplast Protein Import Machinery *Journal of Plant Physiology*, **144**, 339-345.
- Allen,J.F., Alexciev,K., and Hakansson,G. (1-8-1995) Photosynthesis - Regulation by Redox Signaling *Current Biology*, **5**, 869-872.
- Andrey,F., Tsintsadze,T., Volkova,T., Lozovaya,N., and Krishtal,O. (15-8-2005) Acid sensing ionic channels: Modulation by redox reagents *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, **1745**, 1-6.
- Ansorge,W. (1985) Fast and sensitive detection of protein and DNA bands by treatment with potassium permanganate *J Biochem Biophys Methods*, **11**, 13-20.
- Arnon,D.I. (1949) Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts - Polyphenoloxidase in Beta-Vulgaris *Plant Physiology*, **24**, 1-15.
- Bahring,R., Milligan,C.J., Vardanyan,V., Engeland,B., Young,B.A., Dannenberg,J., Waldschutz,R., Edwards,J.P., Wray,D., and Pongs,O. (22-6-2001) Coupling of voltage-dependent potassium channel inactivation and oxidoreductase active site of K $\nu$ beta subunits *J Biol. Chem.*, **276**, 22923-22929.
- Bauer,J., Chen,K., Hiltbunner,A., Wehrli,E., Eugster,M., Schnell,D., and Kessler,F. (13-1-2000) The major protein import receptor of plastids is essential for chloroplast biogenesis *Nature*, **403**, 203-207.
- Bauer,J., Hiltbrunner,A., and Kessler,F. (2001) Molecular biology of chloroplast biogenesis: gene expression, protein import and intraorganellar sorting *Cell Mol. Life Sci.*, **58**, 420-433.
- Becker,T., Hritz,J., Vogel,M., Caliebe,A., Bukau,B., Soll,J., and Schleiff,E. (2004) Toc12, a novel subunit of the intermembrane space preprotein translocon of chloroplasts *Molecular Biology of the Cell*, **15**, 5130-5144.
- Blobel,G. (1979) Synthesis and Transfer of Proteins Across Membranes *Hoppe-Seylers Zeitschrift fur Physiologische Chemie*, **360**, 493.
- Bruce,B.D. (12-12-2001) The paradox of plastid transit peptides: conservation of function despite divergence in primary structure *Biochim. Biophys. Acta*, **1541**, 2-21.
- Caffrey,M. (2003) Membrane protein crystallization *Journal of Structural Biology*, **142**, 108-132.

- Caliebe,A., Grimm,R., Kaiser,G., Lubeck,J., Soll,J., and Heins,L. (15-12-1997) The chloroplastic protein import machinery contains a Rieske-type iron-sulfur cluster and a mononuclear iron-binding protein *EMBO J*, **16**, 7342-7350.
- Chang,N.S., Doherty,J., Ensign,A., Lewis,J., Heath,J., Schultz,L., Chen,S.T., and Oppermann,U. (15-10-2003) Molecular mechanisms underlying WOX1 activation during apoptotic and stress responses *Biochem Pharmacol.*, **66**, 1347-1354.
- Chen,X., Smith,M.D., Fitzpatrick,L., and Schnell,D.J. (2002a) In vivo analysis of the role of atTic20 in protein import into chloroplasts *Plant Cell*, **14**, 641-654.
- Chen,X.J., Smith,M.D., Fitzpatrick,L., and Schnell,D.J. (2002b) In vivo analysis of the role of atTic20 in protein import into chloroplasts *Plant Cell*, **14**, 641-654.
- Cheng,W.H., Endo,A., Zhou,L., Penney,J., Chen,H.C., Arroyo,A., Leon,P., Nambara,E., Asami,T., Seo,M., Koshiba,T., and Sheen,J. (2002) A unique short-chain dehydrogenase/reductase in Arabidopsis glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions *Plant Cell*, **14**, 2723-2743.
- Chou,M.L., Fitzpatrick,L.M., Tu,S.L., Budziszewski,G., Potter-Lewis,S., Akita,M., Levin,J.Z., Keegstra,K., and Li,H.M. (16-6-2003) Tic40, a membrane-anchored co-chaperone homolog in the chloroplast protein translocon *EMBO J*, **22**, 2970-2980.
- Collin,V., Issakidis-Bourguet,E., Marchand,C., Hirasawa,M., Lancelin,J.M., Knaff,D.B., and Miginiac-Maslow,M. (27-6-2003) The Arabidopsis plastidial thioredoxins - New functions and new insights into specificity *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 23747-23752.
- Corsi,A.K. and Schekman,R. (30-6-1997) The luminal domain of Sec63p stimulates the ATPase activity of BiP and mediates BiP recruitment to the translocon in *Saccharomyces cerevisiae* *Journal of Cell Biology*, **137**, 1483-1493.
- Danon,A. and Mayfield,S.P. (9-12-1994) Light-Regulated Translation of Chloroplast Messenger-Rnas Through Redox Potential *Science*, **266**, 1717-1719.
- Deshpande,N.N., Bao,Y.J., and Herrin,D.L. (1997) Evidence for light/redox-regulated splicing of psbA pre-RNAs in *Chlamydomonas* chloroplasts *Rna-A Publication of the Rna Society*, **3**, 37-48.
- Escoubas,J.M., Lomas,M., LaRoche,J., and Falkowski,P.G. (24-10-1995) Light-Intensity Regulation of Cab Gene-Transcription Is Signaled by the Redox State of the Plastoquinone Pool *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 10237-10241.
- Ferro,M., Salvi,D., Brugiére,S., Miras,S., Kowalski,S., Louwagie,M., Garin,J., Joyard,J., and Rolland,N. (2003) Proteomics of the Chloroplast Envelope Membranes from *Arabidopsis thaliana* *Mol. Cell Proteomics.*, **2**, 325-345.
- Garciaferris,C. and Moreno,J. (1994) Oxidative Modification and Breakdown of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase Oxygenase Induced in *Euglena-Gracilis* by Nitrogen Starvation *Planta*, **193**, 208-215.

- Heineke,D., Riens,B., Grosse,H., Hoferichter,P., Peter,U., Flugge,U.I., and Heldt,H.W. (1991) Redox Transfer Across the Inner Chloroplast Envelope Membrane *Plant Physiology*, **95**, 1131-1137.
- Heins,L., Mehrle,A., Hemmler,R., Wagner,R., Kuchler,M., Hormann,F., Sveshnikov,D., and Soll,J. (3-6-2002) The preprotein conducting channel at the inner envelope membrane of plastids *EMBO J*, **21**, 2616-2625.
- Hidalgo,E., Ding,H.G., and Demple,B. (1997) Redox signal transduction via iron-sulfur clusters in the SoxR transcription activator *Trends in Biochemical Sciences*, **22**, 207-210.
- Hiltbrunner,A., Bauer,J., Alvarez-Huerta,M., and Kessler,F. (2001) Protein translocon at the Arabidopsis outer chloroplast membrane *Biochem Cell Biol.*, **79**, 629-635.
- Hinnah,S.C., Wagner,R., Sveshnikova,N., Harrer,R., and Soll,J. (2002) The chloroplast protein import channel Toc75: pore properties and interaction with transit peptides *Biophys J*, **83**, 899-911.
- Hirohashi,T., Hase,T., and Nakai,M. (2001) Maize non-photosynthetic ferredoxin precursor is mis-sorted to the intermembrane space of chloroplasts in the presence of light *Plant Physiol*, **125**, 2154-2163.
- Hofmann,N.R. and Theg,S.M. (2005) Toc64 is not required for import of proteins into chloroplasts in the moss *Physcomitrella patens* *Plant Journal*, **43**, 675-687.
- Hormann,F., Kuchler,M., Sveshnikov,D., Oppermann,U., Li,Y., and Soll,J. (13-8-2004) Tic32, an essential component in chloroplast biogenesis *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 34756-34762.
- Inaba,T., Li,M., Alvarez-Huerta,M., Kessler,F., and Schnell,D.J. (3-10-2003) atTic110 functions as a scaffold for coordinating the stromal events of protein import into chloroplasts *J Biol. Chem.*, **278**, 38617-38627.
- Jackson,D.T., Froehlich,J.E., and Keegstra,K. (26-6-1998) The hydrophilic domain of Tic110, an inner envelope membrane component of the chloroplastic protein translocation apparatus, faces the stromal compartment *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 16583-16588.
- Jelic,M., Sveshnikova,N., Motzkus,M., Horth,P., Soll,J., and Schleiff,E. (2002) The chloroplast import receptor Toc34 functions as preprotein-regulated GTPase *Biol. Chem.*, **383**, 1875-1883.
- Jornvall,H., Persson,B., Krook,M., Atrian,S., Gonzalezduarte,R., Jeffery,J., and Ghosh,D. (9-5-1995) Short-Chain Dehydrogenases Reductases (Sdr) *Biochemistry*, **34**, 6003-6013.
- Kallberg,Y., Oppermann,U., Jornvall,H., and Persson,B. (2002a) Short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) relationships: a large family with eight clusters common to human, animal, and plant genomes *Protein Sci.*, **11**, 636-641.
- Kallberg,Y., Oppermann,U., Jornvall,H., and Persson,B. (2002b) Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs) *Eur J Biochem*, **269**, 4409-4417.

- Keegstra, K., Olsen, L.J., and Theg, S.M. (1989) Chloroplastic Precursors and Their Transport Across the Envelope Membranes Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, **40**, 471-501.
- Kessler, F. and Blobel, G. (23-7-1996) Interaction of the protein import and folding machineries of the chloroplast Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, **93**, 7684-7689.
- Kim, J., Kang, H.G., Jun, S.H., Lee, J., Yim, J., and An, G. (2003) CvADH1, a member of short-chain alcohol dehydrogenase family, is inducible by gibberellin and sucrose in developing watermelon seeds Plant Cell Physiol, **44**, 85-92.
- Ko, K., Budd, D., Wu, C.B., Seibert, F., Kourtz, L., and Ko, Z.W. (1-12-1995) Isolation and Characterization of A Cdna Clone Encoding A Member of the Com44/Cim44 Envelope Components of the Chloroplast Protein Import Apparatus Journal of Biological Chemistry, **270**, 28601-28608.
- Kouranov, A., Chen, X., Fuks, B., and Schnell, D.J. (16-11-1998) Tic20 and Tic22 are new components of the protein import apparatus at the chloroplast inner envelope membrane J Cell Biol., **143**, 991-1002.
- Kovacheva, S., Bedard, J., Patel, R., Dudley, P., Twell, D., Rios, G., Koncz, C., and Jarvis, P. (2005) In vivo studies on the roles of Tic110, Tic40 and Hsp93 during chloroplast protein import Plant Journal, **41**, 412-428.
- Kubis, S., Baldwin, A., Patel, R., Razzaq, A., Dupree, P., Lilley, K., Kurth, J., Leister, D., and Jarvis, P. (2003) The Arabidopsis *ppi1* mutant is specifically defective in the expression, chloroplast import, and accumulation of photosynthetic proteins Plant Cell, **15**, 1859-1871.
- Kuchler, M., Decker, S., Hormann, F., Soll, J., and Heins, L. (15-11-2002) Protein import into chloroplasts involves redox-regulated proteins EMBO J, **21**, 6136-6145.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4 Nature, **227**, 680-&.
- Lemaire, S.D., Collin, V., Keryer, E., Quesada, A., and Miginiac-Maslow, M. (22-5-2003) Characterization of thioredoxin y, a new type of thioredoxin identified in the genome of *Chlamydomonas reinhardtii* Febs Letters, **543**, 87-92.
- Liere, K. and Link, G. (15-6-1997) Chloroplast endoribonuclease p54 involved in RNA 3'-end processing is regulated by phosphorylation and redox state Nucleic Acids Research, **25**, 2403-2408.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent Journal of Biological Chemistry, **193**, 265-275.
- Lubeck, J., Soll, J., Akita, M., Nielsen, E., and Keegstra, K. (15-8-1996) Topology of IEP110, a component of the chloroplastic protein import machinery present in the inner envelope membrane EMBO J, **15**, 4230-4238.
- Martin, W. and Herrmann, R.G. (1998) Gene transfer from organelles to the nucleus: How much, what happens, and why? Plant Physiology, **118**, 9-17.

- Mason, H. S., Guerro, D, Boyer, J. S., and Mullet, J. E. Proteins homologues to leaf glycoproteins are abundant in stems of darkgrown seedlings. Analysis of proteins and cDNAs. *Plant Mol.Biol.* **11**, 845-856. 1988.  
Ref Type: Journal (Full)
- Mason,J.R. and Cammack,R. (1992) The Electron-Transport Proteins of Hydroxylating Bacterial Dioxygenases *Annual Review of Microbiology*, **46**, 277-305.
- May,T. and Soll,J. (2000) 14-3-3 proteins form a guidance complex with chloroplast precursor proteins in plants *Plant Cell*, **12**, 53-63.
- Nada,A. and Soll,J. (1-8-2004) Inner envelope protein 32 is imported into chloroplasts by a novel pathway *Journal of Cell Science*, **117**, 3975-3982.
- Nielsen,E., Akita,M., Davila-Aponte,J., and Keegstra,K. (3-3-1997) Stable association of chloroplastic precursors with protein translocation complexes that contain proteins from both envelope membranes and a stromal Hsp100 molecular chaperone *EMBO J*, **16**, 935-946.
- Oppermann,U., Filling,C., Hult,M., Shafqat,N., Wu,X., Lindh,M., Shafqat,J., Nordling,E., Kallberg,Y., Persson,B., and Jornvall,H. (1-2-2003) Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update *Chem. Biol. Interact.*, **143-144**, 247-253.
- Paulsen,H., Rumler,U., and Rudiger,W. (1990) Reconstitution of Pigment-Containing Complexes from Light-Harvesting Chlorophyll-A/B-Binding Protein Overexpressed in *Escherichia-Coli* *Planta*, **181**, 204-211.
- Pfannschmidt,T., Nilsson,A., Tullberg,A., Link,G., and Allen,J.F. (1999) Direct transcriptional control of the chloroplast genes *psbA* and *psaAB* adjusts photosynthesis to light energy distribution in plants *Iubmb Life*, **48**, 271-276.
- Rassow,J., Dekker,P.J., van Wilpe,S., Meijer,M., and Soll,J. (12-2-1999) The preprotein translocase of the mitochondrial inner membrane: function and evolution *J Mol. Biol.*, **286**, 105-120.
- Rehling,P., Brandner,K., and Pfanner,N. (2004) Mitochondrial import and the twin-pore translocase *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **5**, 519-530.
- Rintamaki,E., Martinsuo,P., Pursiheimo,S., and Aro,E.M. (10-10-2000) Cooperative regulation of light-harvesting complex II phosphorylation via the plastoquinol and ferredoxin-thioredoxin system in chloroplasts *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 11644-11649.
- Rylott,E.L., Rogers,C.A., Gilday,A.D., Edgell,T., Larson,T.R., and Graham,I.A. (13-6-2003) *Arabidopsis* mutants in short- and medium-chain acyl-CoA oxidase activities accumulate acyl-CoAs and reveal that fatty acid beta-oxidation is essential for embryo development *J Biol. Chem.*, **278**, 21370-21377.
- Salvador,M.L. and Klein,U. (1999) The redox state regulates RNA degradation in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* *Plant Physiology*, **121**, 1367-1374.

- Schindler,C. and Soll,J. (1987) Protein-Transport Into Intact Purified Plastids - Atp Is Prerequisite Biological Chemistry Hoppe-Seyler, **368**, 1105.
- Schleiff,E., Jelic,M., and Soll,J. (15-4-2003) A GTP-driven motor moves proteins across the outer envelope of chloroplasts Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, **100**, 4604-4609.
- Schleiff,E. and Soll,J. (2000) Travelling of proteins through membranes: translocation into chloroplasts Planta, **211**, 449-456.
- Schnell,D.J. and Blobel,G. (1993) Identification of Intermediates in the Pathway of Protein Import Into Chloroplasts and Their Localization to Envelope Contact Sites Journal of Cell Biology, **120**, 103-115.
- Schurmann,P. and Jacquot,J.P. (2000) Plant thioredoxin systems revisited Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, **51**, 371-400.
- Schwartz,R.M. and Dayhoff,M.O. (1978) Origins of Prokaryotes, Eukaryotes, Mitochondria, and Chloroplasts Science, **199**, 395-403.
- Simon,A., Hellman,U., Wernstedt,C., and Eriksson,U. (20-1-1995) The retinal pigment epithelial-specific 11-cis retinol dehydrogenase belongs to the family of short chain alcohol dehydrogenases J Biol. Chem., **270**, 1107-1112.
- Simon,A., Romert,A., Gustafson,A.L., and McCaffery,J.M.a.E.U. (1999) Intracellular localization and membrane topology of 11-cis retinol dehydrogenase in the retinal pigment epithelium suggest a compartmentalized synthesis of 11-cis retinaldehyde. J. Cell Sci., **148**, 549-558.
- Sohrt,K. and Soll,J. (20-3-2000) Toc64, a new component of the protein translocon of chloroplasts Journal of Cell Biology, **148**, 1213-1221.
- Soll,J. and Schleiff,E. (2004) Protein import into chloroplasts Nature Reviews Molecular Cell Biology, **5**, 198-208.
- Soll,J. and Tien,R. (1998) Protein translocation into and across the chloroplastic envelope membranes Plant Molecular Biology, **38**, 191-207.
- Stahl,T., Glockmann,C., Soll,J., and Heins,L. (24-12-1999) Tic40, a new "old" subunit of the chloroplast protein import translocon J Biol. Chem., **274**, 37467-37472.
- Stammers,D.K., Ren,J., Leslie,K., Nichols,C.E., Lamb,H.K., Cocklin,S., Dodds,A., and Hawkins,A.R. (3-12-2001) The structure of the negative transcriptional regulator NmrA reveals a structural superfamily which includes the short-chain dehydrogenase/reductases EMBO J, **20**, 6619-6626.
- Sveshnikova,N., Grimm,R., Soll,J., and Schleiff,E. (2000a) Topology studies of the chloroplast protein import channel Toc75 Biol. Chem., **381**, 687-693.
- Sveshnikova,N., Soll,J., and Schleiff,E. (25-4-2000b) Toc34 is a preprotein receptor regulated by GTP and phosphorylation Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, **97**, 4973-4978.

- 
- Tempel,B.L., Papazian,D.M., Schwarz,T.L., Jan,Y.N., and Jan,L.Y. (14-8-1987) Sequence of A Probable Potassium Channel Component Encoded at Shaker Locus of *Drosophila* Science, **237**, 770-775.
- Towbin,H., Staehelin,T., and Gordon,J. (1979) Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets - Procedure and Some Applications Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **76**, 4350-4354.
- Tullberg,A., Alexciev,K., Pfannschmidt,T., and Allen,J.F. (2000) Photosynthetic electron flow regulates transcription of the *psaB* gene in pea (*Pisum sativum* L.) chloroplasts through the redox state of the plastoquinone pool Plant and Cell Physiology, **41**, 1045-1054.
- Vener,A.V., Ohad,I., and Andersson,B. (1998) Protein phosphorylation and redox sensing in chloroplast thylakoids Current Opinion in Plant Biology, **1**, 217-223.
- Waagemann,K., Eichacker,S., and Soll,J. (1992) Outer Envelope Membranes from Chloroplasts Are Isolated As Right-Side-Out Vesicles Planta, **187**, 89-94.
- Waagemann,K. and Soll,J. (15-3-1996) Phosphorylation of the transit sequence of chloroplast precursor proteins J Biol. Chem., **271**, 6545-6554.
- Zhou,C., Yang,Y.J., and Jong,A.Y. (1990) Mini-Prep in 10 Minutes Biotechniques, **8**, 172-173.
- Zickermann,V., Kurki,S., Kervinen,M., Hassinen,I., and Finel,M. (20-7-2000) The NADH oxidation domain of Complex I: do bacterial and mitochondrial enzymes catalyze ferricyanide reduction similarly? Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics, **1459**, 61-68.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
at	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat-p-Toludinsalz
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
cDNA	komplementäre (copy-) DNA
CD	Circulardichroismus
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DSP	Dithiobis(Succinimidyl)Propionat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fd	Ferredoxin
FNR	Ferredoxin-NADP <sup>+</sup> Oxidoreduktase
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure
HIP	“heat shock induced protein”
HSP	Hitzeschock-Protein (“heat shock protein”)
IEP	Protein der inneren Chloroplastenhüllmembran (inner envelope protein)
LSU	große Untereinheit der RUBISCO („large subunit“)
M9ZB	Medium zur Anzucht von Bakterien (Überexpression)
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
NAD	Nikotinsäureamid-adenin-dinukleotid
NADP	Nikotinsäureamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NBT	4-Nitrotetrazoliumchloridblau-Hydrat
Ni-NTA	Nickel-Nitrolotriessigsäure
N-Terminus	Amino-Terminus
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion („Polymerase chain reaction“)

---

PMSF	Phenylmethylsulfonylchlorid
ps	<i>Pisum sativum</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RUBISCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPP	stromale Prozessierungspeptidase
SSU	kleine Untereinheit der RUBISCO („small subunit“)
TCA	Trichloressigsäure
Tic	Translokon an der inneren chloroplastidären Hüllmembran
Tim	Translokon an der inneren mitochondriellen Membran
Toc	Translokon an der äusseren chloroplastidären Hüllmembran
TP	Transitpeptid
TPR	34-Aminosäure-Wiederholung („tetratricopeptide repeat“)
Tricin	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

## 8.2 Aminosäuren

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

## 8.3 Nukleoside und Nukleotide

A	Adenosin	N	A,C,G,T,U
C	Cytosin	dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
G	Guanin	NMP	Nukleosidmonophosphat
T	Thymidin	NDP	Nukleosiddiphosphat
U	Uracil	NTP	Nukleosidtriphosphat

## 8.4 Einheiten

A	Ampere	$\lambda$	Wellenlänge
Å	Angström	m	Meter
bp	Basenpaare	M	Mol
°C	Grad Celcius	min	Minute
Ci	Curie	sek	Sekunde
c	Konzentration	U	Unit/Einheit
Da	Dalton	V	Volt
xg	x-faches der Erdbeschleunigung		
g	Gramm		
h	Stunde		
l	Liter		



## Veröffentlichungen

- 1) Heins L, Mehrle A, Hemmler R, Wagner R, Kuchler M, Hörmann F, Shveshnikov D and Soll J, The EMBO Journal 2002, 21, 2616-2625 The preprotein conducting channel at the inner envelope membrane of plastids.
- 2) Kuchler M, Decker S, Hörmann F, Soll J and Heins L, The EMBO Journal 2002, 21, 6136-6145 Protein import into chloroplasts involves redox-regulated proteins
- 3) Hörmann F, Kuchler M, Shveshnikov D, Oppermann U, Li Y and Soll J, J.Biol Chem 2004, 33, 34756-62 Tic32, an essential component in chloroplast biogenesis.
- 4) Vojta A., Alavi M., Becker T., Hörmann F., Kuchler M., Thomson R. and Schleiff E., J. Biol. Chem. 2004, 20, 21401-05 The protein translocon of the plastid envelopes.
- 5) Hörmann, F., Gerdes L. und Soll J. Tic and Toc-or how to get proteins into the chloroplast. Review in: Recent Research Developments in Molecular and Cellular Biology, Vol 3, 2002, PartII