

Calcium/Calmodulin Regulation des Proteinimports in Chloroplasten

Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilian-Universität München

vorgelegt von
Fatima Chigri

München
23.10.2006

Dissertation eingereicht am: 23.10.2006

Datum der mündlichen Prüfung: 22.11.2006

Erstgutachter: PD. Dr. Ute C. Vothknecht

Zweitgutachter: Prof. Dr. Jürgen Soll

Ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Beihilfe angefertigt ist.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation nicht einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist und dass ich mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg nicht unterzogen habe.

München, 23.10.2006

Fatima Chigri

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	IV
1. Einleitung	1
1.1. Proteinimport in Chloroplasten	1
1.2. Calcium/Calmodulin Regulation in Pflanzen	4
2. Material	6
2.1. Chemikalien und Saatgut	6
2.2. Enzyme, Peptide und Kits	6
2.3. Konstrukte	7
2.4. Bakterienstämme	8
2.5. Vektoren	8
2.6. Antiseren	8
3. Methoden	9
3.1. Allgemeine molekularbiologische Methoden	9
3.2. Polymerasekettenreaktion (PCR) und Klonierungsstrategie	9
3.3. Allgemeine biochemische Methoden	11
3.3.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	
3.3.2. Coomassie-Färbung	
3.3.3. Silberfärbung	
3.3.4. Western-Blot-Transfer und Immunodekoration von Proteinen	
3.3.5. Proteinbestimmung	
3.4. Isolierung intakter Chloroplasten, innerer und äußerer Hüllmembran von Erbsen	13

3.5. Isolierung von Stroma aus intakten Chloroplasten von Erbse	13
3.6. Heterologe Expression rekombinanter Proteine	14
3.7. Chromatographische Methoden	14
3.7.1. Aufreinigung heterolog exprimierter Proteine	
3.7.2. Affinitätschromatographie an Calmodulin-Agarose	
3.7.3. Affinitätschromatographie an Fluphenazin-Sepharose	
3.8. Calmodulin-Bindungsassay	15
3.9. Co-Immünpräzipitation von Proteinen	16
3.10. Quervernetzung von innerer Hüllmembran mit EDC	16
3.11. <i>In vitro</i> Transkription	17
3.12. <i>In vitro</i> Translation	17
3.13. <i>In vitro</i> Import in intakten Chloroplasten	18
3.13.1. Proteinimport in isolierten Chloroplasten	
3.13.2. Proteasebehandlung von Chloroplasten	
3.13.3. Alkalische Extraktion von Chloroplasten	
3.13.4. Fraktionierung der Chloroplasten	
3.13.5. ATP-Abhängigkeit des Protein-Importes in Chloroplasten	
3.13.6. Inhibitionsexperimente	
3.14. <i>in vitro</i> Phosphorylierung	20
3.15. Autoradiographie	20
3.16. Transiente Transformation von Protoplasten	21
3.17. Fluoreszenz-Mikroskopie	21
3.18. Computer-Analyse	21
4. Ergebnisse	22
4.1. Effekt von Calcium und Calmodulin auf den Proteinimport in Chloroplasten	22
4.1.1. Ophiobolin A beeinflusst den Import von pOE33 und pPC1	
4.1.2. Der Effekt von Ophiobolin A ist spezifisch für bestimmte Vorstufenproteine	

4.1.3. Hemmung des pSSU-Imports durch Ophiobolin A	
4.1.4. Effekt von Calcium-Ionophoren auf pSSU-Import	
4.1.5. Die Calcium/Calmodulin-Regulation des Proteinimports findet am Tic-Komplex statt	
4.2. Calcium/Calmodulin Regulation des Proteinimports wird durch Tic32 vermittelt	40
4.2.1. Identifizierung von Tic32 als Calmodulin-bindendes Protein an der inneren Hüllmembran des Chloroplasten	
4.2.2. Calmodulin bindet spezifisch an Tic32	
4.2.3. Identifizierung der Calmodulin-Bindungsdomäne von Tic32	
4.2.4. Calmodulin interagiert mit Tic32 an der inneren Hüllmembran der Chloroplasten	
4.2.5. Der Effekt von NADPH auf die Calmodulin-Bindung an Tic32	
4.2.6. Der Effekt von NADPH auf die Interaktion zwischen Tic32 und Tic110	
4.3. Identifizierung von chloroplastidären Calmodulin	54
4.3.1. Datensuche nach potentiell im Chloroplasten lokalisierten Calmodulinen	
4.3.2. Affinitätschromatographie an Fluphenazin-Sepharose	
4.3. Effekt von Ophiobolin A auf die <i>in vitro</i> Phosphorylierung der inneren Chloroplastenhüllmembran	58
5. Diskussion	61
6. Zusammenfassung	67
8. Abstract	68
9. Literatur	69

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
at	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintri-phosphat.
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
cDNA	komplementäre (copy-) DNA
CaM	Calmodulin
CaMBD	Calmodulin-Bindungsdomäne
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CTP	Cytidintri-phosphate
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DM	N-Decyl- β -D-Maltoside
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	1,4-Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDC	1-Ethyl-3-[3-Dimethylaminopropyl]Carbodiimid Hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis-(<i>l</i> -amino-ethylether)-tetraacetat.
FI	vollänge Konstrukte
FNR	Ferredoxin-NADP Oxidoreduktase
GFP	Green fluorescent protein
GDP	Guanisindiphosphat
GTP	Guanisintriphosphat
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IE	der inneren Chloroplastenhüllmembran
K	verkürzte Konstrukte

M	Proteingrößenstandard
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NADH	reduziertes Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NADPH	reduziertes Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
Ni ²⁺ -NTA	Nickel-Nitrolotriessigsäure
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
OG	N-Octylglucoside
os	<i>Oryza sativa</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
pI	Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ps	<i>Pisum sativum</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSU	kleine Untereinheit der RUBISCO (small subunit)
Sulfo-NHS	Sulfo-N-Hydroxysulfosuccinimide
Tab.	Tabelle
Tic	Translokon der inneren Chloroplastenhüllmembran
Tim4	Translokationsintermediat 4 von SSU
TL	Translationsprodukt
Toc	Translokon der äußeren Chloroplastenhüllmembran
Tricine	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UTP	Uridintriphosphate
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

1. Einleitung

1.1. Proteinimport in Chloroplasten

Chloroplasten sind charakteristische Organellen photosynthetisch aktiver, pflanzlicher Zellen. Chloroplasten sind, wie die Mitochondrien, nach der Endosymbiontentheorie Abkömmlinge prokaryontischer Organismen (Margulis, 1970; Mereschkowsky, 1905). Nach dieser Theorie stammen Chloroplasten von Vorläufern heutiger Cyanobakterien ab. Diese wurden durch Phagozytose in eine Wirtszelle aufgenommen und lebten mit dieser in Symbiose. Im Verlauf der Entwicklung vom Endosymbionten zum Zellorganell verloren sie ihre Autonomie, indem ein großer Teil ihrer genetischen Information in den Zellkern übertragen wurde (Maier *et al.*, 1996). Obwohl die Chloroplasten immer noch ein eigenes zirkuläres Genom besitzen, werden nur etwa 2-5% der chloroplastidären Proteine im Chloroplasten synthetisiert. Die Mehrzahl wird im Kern kodiert und muss nach ihrer Synthese an cytosolischen Ribosomen in die Plastiden importiert werden (Chua und Schmidt, 1979; Grossmann *et al.*, 1980). Der überwiegende Teil der chloroplastidären Proteine trägt ein N-terminales, abspaltbares Transitpeptid, auch Präsequenz genannt (Blobel *et al.*, 1979). Dieses Transitpeptid ist sowohl notwendig als auch ausreichend für den Transport der Proteine zum und in den Chloroplasten (Keegstra *et al.*, 1989). Solche Proteine werden auch Vorstufenproteine genannt und werden über einen „generellen Importweg“ bestehend aus den Proteintranslokationskomplexen in der äußeren (Toc-Komplex) und inneren (Tic-Komplex) Hüllmembran in den Chloroplasten transportiert (Übersichtsartikel: Vothknecht und Soll, 2003). Dagegen besitzen die meisten Proteine der äußeren Hüllmembran der Chloroplasten kein abspaltbares Transitpeptid und werden direkt vom Cytosol in die Membran inseriert (Schleiff und Klösgen, 2001). Inzwischen wurden auch Proteine der inneren Hüllmembran identifiziert, die ebenfalls ohne abspaltbares Transitpeptid importiert werden können, deren Importweg allerdings noch nicht bekannt ist (Nada und Soll, 2004).

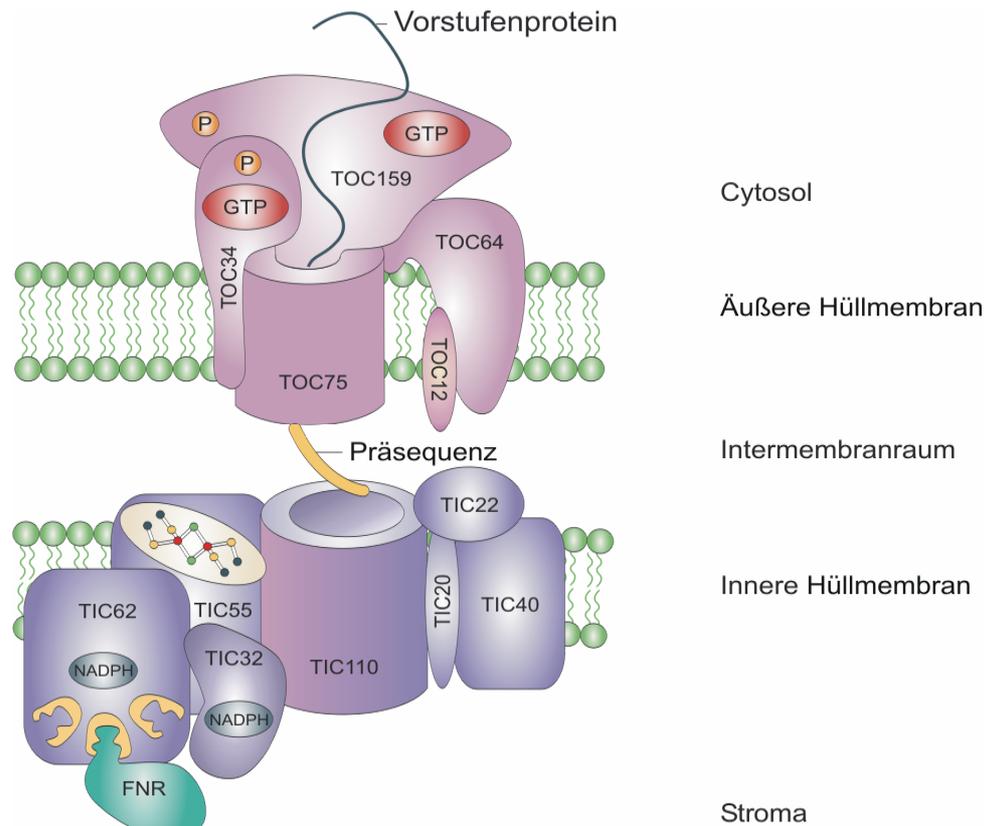


Abb. 1: Schematische Darstellung der chloroplastidären Translokationsmaschinerie

Kernkodierte Vorstufenproteine translozieren in Chloroplasten durch den Toc- und den Tic-Komplex. Die Zahlen geben das jeweilige Molekulargewicht der Komponenten an. FNR: Ferredoxin-NADP Oxidoreduktase. (modifiziert nach: Soll und Schleiff, 2004)

Der durch den Toc- und Tic-Komplex vermittelte Proteinimport in die Chloroplasten ist ein hoch regulierter Prozess. Die Translokation durch den Toc-Komplex wird sowohl durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung als auch durch GTP-Bindung bzw. Hydrolyse reguliert (Übersichtsartikel: Vothknecht und Soll, 2003). Die Translokation durch den Tic-Komplex hingegen wird durch Redoxreaktionen reguliert.

Bisher wurden fünf Komponenten des Toc-Komplexes, Toc159, Toc75, Toc34, Toc64 und Toc12 identifiziert (Abb. 1). Toc159 und Toc34 sind GTP-bindende Vorstufenproteinerezeptoren auf der cytosolischen Seite des Chloroplasten. Beide Proteine werden durch GTP/GDP-Zyklus sowie durch Phosphorylierung reguliert (Jelic *et al.*, 2001; Schleiff *et al.*, 2003). Die Vorstufenproteine binden zunächst an

mit GTP-beladenen Toc34. Diese Anbindung stimuliert die GTPase-Aktivität von Toc34, welches dann in den GDP-bindenden Zustand umgewandelt wird. Das Vorstufenprotein wird nun auf Toc159 übertragen. Toc34 kehrt durch einen Austausch zwischen GDP und GTP zum aktivierten Zustand zurück und kann wieder Vorstufenproteine binden. Darüber hinaus wird Toc34 ebenfalls durch Phosphorylierung reguliert. Die Phosphorylierung von Toc34 inhibiert die Bindung von GTP und damit das Erkennen von Vorstufenproteinen. Diese Hemmung wird durch Dephosphorylierung aufgehoben und der Rezeptor kann wieder GTP binden. Im GTP-beladenen Zustand übernimmt Toc159 das Vorstufenprotein von Toc34. Hier wiederum wird die GTP-Hydrolyse stimuliert, was zum Transport des Vorstufenproteins über die äußere Hüllmembran durch Toc75, die Translokationspore des Toc-Komplexes führt.

Zum Tic-Komplex gehören mindestens sieben Proteine: Tic110, Tic62, Tic55, Tic40, Tic32, Tic22 und Tic20 (Abb. 1). Sowohl Tic32, Tic62 als auch Tic55 weisen Charakteristika auf, die eine redoxabhängige Regulation nahelegt. Daher wurde eine Redoxregulation der Proteintranslokation durch den Tic-Komplex postuliert. Dies wurde durch Untersuchungen nahegelegt, die gezeigt haben, dass Tic62 NAD(P) sowie die Ferredoxin-NADP Oxidoreduktase (FNR) spezifisch binden kann (Küchler *et al.*, 2002). Tic55 besitzt ein Rieske-Typ Eisen-Schwefel-Zentrum und eine mononukleäre Eisen-Bindungsstelle und könnte somit als Redoxsensor funktionieren (Caliebe *et al.*, 1997). Außerdem besitzt Tic32 eine Bindungsstelle für NADPH, was eine redoxregulierte Funktion ebenfalls für dieses Protein nahelegt (Hörmann *et al.*, 2004). Die Frage, inwieweit Tic32, Tic62 und Tic55 zusammenreagieren, um den Proteinimport über die innere Chloroplasten-hüllmembran zu regulieren, ist noch nicht geklärt.

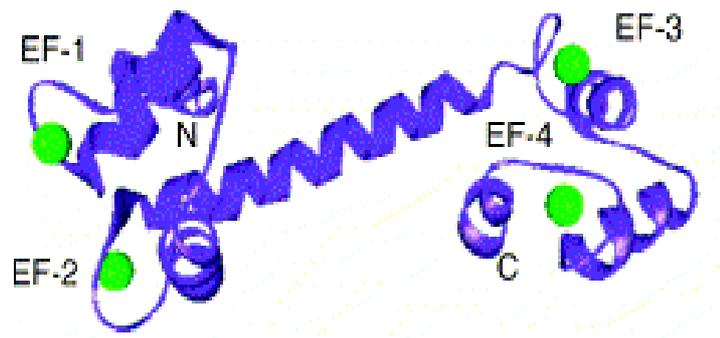


Abb. 2: Schematische Darstellung des Ca^{2+} -Calmodulin-Komplexes

Calmodulin besteht aus zwei globulären Lappen am C- und N-Terminus, die mit einer flexiblen α -Helix miteinander verbunden sind. Jeder Lappen hat zwei Calcium-Bindedomänen (EF-Hand Motiv). Grüne Punkte kennzeichnen das Calciumion. (von: Yang und Poovaiah, 2003)

1.2. Calcium/Calmodulin Regulation in Pflanzen

Pflanzen sind sich ständig wechselnden Umweltbedingungen ausgesetzt. Dabei reagieren sie sowohl auf abiotische Faktoren (z.B. Hitze, Kälte, hohe Salzkonzentrationen, Trockenheit und unterschiedliche Lichtintensitäten) als auch auf biotische Faktoren wie ein Pathogenbefall oder Verletzungen. Diese Faktoren lösen auf zellulärer Ebene eine Stress-Antwort aus, die häufig ein Einströmen von Calcium aus dem Apoplasten oder aus internen Speichern wie dem Endoplasmatischen Retikulum oder der Vakuole in das Cytosol verursacht. Calcium funktioniert dann als ein intrazellulärer Messenger vieler Signalübertragungswege (Berridge *et al.*, 2000; Yang und Poovaiah, 2003). Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentration können von verschiedenen Calcium-Sensoren wahrgenommen und in eine zelluläre Antwort umgewandelt werden. In höheren Pflanzen sind diese Sensoren meistens Calcium-abhängige Proteinkinasen, Calcineurin oder Calmodulin. Die Calcium-Sensoren können Calcium in einer spezifischen Domäne, der sogenannten „EF-Hand“ Motiv, binden. Nach Anbindung von Calcium sind die Calcium-Sensoren in der Lage, viele zelluläre Prozesse durch Interaktion mit ihren Zielproteinen zu regulieren. Das am

besten untersuchte Calcium-bindende Protein ist Calmodulin. Calmodulin ist ein kleines, saures Protein (16 kDa, pI 3,92), das ubiquitär in allen eukaryotischen Organismen vorkommt (Yang und Poovaiah, 2003). Es besteht aus zwei ähnlichen globulären Lappen, die durch eine lange α -Helix miteinander gebunden sind (Abb. 2). Jeder Lappen hat in der Regel zwei „EF-hand“ Motive. Bindung des Calciums führt zu Konformationsänderungen des Calmodulins, die dann die Interaktion von Calmodulin mit seinen Zielproteinen ermöglichen. Die von Calmodulin gebundenen Zielproteine sind äußerst vielfältig und auf alle Bereiche der zellulären Steuervorgänge verteilt (Yang und Poovaiah, 2003). In Chloroplasten wurde über die Existenz von Calmodulin-Regulation spekuliert, bisher konnte allerdings kein Calmodulin im Organell identifiziert werden. Es wurde bereits 1982 durch Jarrett *et al.* postuliert, dass Calmodulin die Photosynthese reguliert (Jarrett *et al.*, 1982). Durch eine Suche nach Calmodulin-Bindeproteine wurden PsaN, eine Komponente des Photosystems I, das Chaperonin Cpn10 und eine chloroplastidäre AAA-ATPase als potentielle Calmodulin-Bindeproteine identifiziert (Yang und Poovaiah, 2000).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist der Effekt von Calcium bzw. Calmodulin auf den Proteinimport in Chloroplasten zu untersuchen.

2. Material

2.1. Chemikalien und Saatgut

Spezielle Chemikalien wurden von folgender Firmen bezogen: Ophiobolin A und Fluphenazin Dihydrochlorid von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland). A23187 und Ionomycin von Merk (Schwallbach, Deutschland). Diethylpyrocarbonate (DEPC) von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland). N-Decyl- β -D-Maltoside (DM) von Glycon GmbH (Luckenwalde, Deutschland). N-Octylglucoside (OG) von Roche (Mannheim, Deutschland). Die Quervernetzungsreagenze 1-Ethyl-3-[3-Dimethylaminopropyl]Carbodiimid Hydrochlorid (EDC) und Sulfo-N-Hydroxysulfosuccinimide (Sulfo-NHS) von Pierce (Bonn, Deutschland). Radioaktiv markierten Aminosäuren und Nukleotide von der Firma Du Pont NEN (Dreieich, Deutschland). Alle anderen Chemikalien waren p.A. oder von höchst-möglicher Qualität.

Erbsen (*Pisum sativum*. L., cultivar "Arvika") wurden von Praha (Czech Republik) bezogen.

2.2. Enzyme, Peptide und Kits

Thermolysine und DNase I stammen von Roche (Mannheim, Deutschland), Streptavidin-Peroxidase Konjugate von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland); Restriktionsenzyme von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) und T4-DNA Ligase von Eppendorf (Hamburg, Deutschland).

Für DNA Aufreinigung in kleinen Mengen wurde der Kit FastPlasmidTM Mini von Eppendorf (Hamburg, Deutschland) verwendet. Aufreinigung größerer Mengen DNA wurde mit Nucleobond^R AX von Macherey-Nagel Kit (Düren, Deutschland) durchgeführt. DNA-Extraktion von Agarose-Gelen erfolgte mit Nucleospin^R Extract Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland).

Microcystin LR, Rinderhirn Calmodulin und biotinyliertes Rinderhirn Calmodulin wurden von Alexis.Deutschland (Grüneberg, Deutschland) bezogen.

2.3. Konstrukte

In **Tabelle1** sind Konstrukte aufgelistet, die nicht im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden.

Tab. 1: Liste mit den verwendeten Konstrukten. p: Vorstufenprotein

Konstrukt	Vektor	Verwendung	Organism	Origin
pSSU	pSP65	Transkription/ Translation	<i>P. sativum</i>	Waegemann und Soll, 1996
pTic110	pET21d	Transkription / Translation	<i>P. sativum</i>	Lübeck <i>et al.</i> , 1996
pTic110	pET21d	Expression	<i>P. sativum</i>	Lübeck <i>et al.</i> , 1996
Tic32	pET21d	Expression	<i>P. sativum</i>	Hörmann <i>et al.</i> , 2004
Tic32	pSP65	Transkription/ Translation	<i>P. sativum</i>	Nada und Soll, 2004
Tic32 Δ C (T ₁₋₁₉₃)	pET21d	Expression	<i>P. sativum</i>	D. Sveshnikov, Dissertation
pOE33	pGEM4Z	Transkription/ Translation	<i>P. sativum</i>	Geschenk von C. Robinson
pOE33	pET3c	Expression	<i>P. sativum</i>	Waegemann und Soll, 1996
pOE23	pET3c	Expression	<i>P. sativum</i>	Waegemann und Soll, 1996
pPC1	pSP65	Transkription/ Translation	<i>P. sativum</i>	Geschenk von C. Robinson
pVIPP1	pSP65	Transkription/ Translation	<i>P. sativum</i>	Li <i>et al.</i> , 1994
pVIPP1	pDEST17	Expression	<i>A. thaliana</i>	Aseeva <i>et al.</i> , 2004
Alb4	pET21d	Expression	<i>A. thaliana</i>	Gerdes <i>et al.</i> , 2006
Toc34	pET21d	Transkription/ Translation	<i>P. sativum</i>	May und Soll, 1998
Toc64	pET21d	Expression	<i>P. sativum</i>	Sohrt und Soll, 2000
pTic22	pET21d	Transkription/ Translation	<i>A. thaliana</i>	Heins <i>et al.</i> , 2002

2.4. Bakterienstämme

JM-109	New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland)
BL21(DE3)	Novagen (Madison, USA)
Top10	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)

2.5. Vektoren

pSP64	Promega (Madison,USA)
pGEM 5Z(f+)	(Madison,USA)
pET21d	Stratagene (La Jolla, USA)
pOL-LP (GFP)	Geschenk von Dr. Meurer

2.6. Antiseren

Die polyklonalen Antikörper α -Tic110, α -Tic32, α -Tic40, α -Tic55, α -Tic62 wurden gegen heterolog expremierte Proteine von *Pisum sativum* aus immunisierten Kaninchen gewonnen.

3. Methoden

3.1. Allgemeine molekularbiologische Methoden

Die Anzucht von Bakterienkulturen, das Anlegen von Stammkulturen, die Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA sowie deren Präzipitation mit Ethanol oder Isopropanol wurden nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Die Herstellung kompetenter *E.coli* erfolgte nach Hanakan et al. (1985). Restriktion, Ligation, Transformation von Bakterien sowie die Aufreinigung von Plasmid-DNA, PCR-Produkten und DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgten nach Standardmethoden oder Angaben des Herstellers der Enzyme oder Kits.

3.2. Polymerasekettenreaktion (PCR) und Klonierungsstrategie

Schnittstellen für Restriktionsenzyme, die eine Subklonierung entsprechender DNA-Fragmente ermöglichen, wurden mittels PCR eingefügt (Saiki et al. 1988). Die PCR-Reaktion wurde nach Herstellerangaben (TripleMaster PCR System, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

Für die Erzeugung von verkürzten Tic32-Konstrukten wurde das Volllänge-Tic32 aus Erbse (Hörmann *et al.*, 2004) als Template mit vorwärts und rückwärts Primern, die die Schnittstellen für NcoI bzw. XhoI enthielten, verwendet (siehe Tabelle 2). Die Konstrukte wurden in den pET21d Vektor, in Leserahmen mit dem C-terminalen 6xHis-Tag, kloniert.

Zur Klonierung von Calmodulin-Homologe und ihren verkürzten Konstrukten wurden vorwärts und rückwärts Primern, die Schnittstellen für SpeI bzw. KpnI enthielten, verwendet (siehe Tabelle 2). Als Template wurde die *Arabidopsis* cDNA Bibliothek verwendet. Die Konstrukte wurden in pOL-LP Vektor (GFP am C-Terminus) kloniert.

Die Authentizität der Klone wurde durch DNA-Sequenzierung (SeqLab, Göttingen, Deutschland) überprüft.

Tab. 2: Liste der im Zuge dieser Arbeit hergestellten Konstrukte. T: Tic32-Konstrukte, die Zahlen bezeichnen die Position der Aminosäuren (as). cal: Calmodulin-Homologe, Fl: volllänge Konstrukte, K: verkürzte Konstrukte, die Zahlen bezeichnen die Position der Basenpaare (bp).

Konstrukt	Vektor	Verwendung	Organism
T _{1-289as}	pET21d	Expression	<i>Pisum sativum</i>
T _{1-272as}	pET21d	Expression	<i>Pisum sativum</i>
T _{1-153as}	pET21d	Expression	<i>Pisum sativum</i>
T _{155-316as}	pET21d	Expression	<i>Pisum sativum</i>
At3g10190 (cal1): Fl: 1-627bp K: 1-288bp	pOL-LP (GFP)	Protoplasten- Transformation	<i>Arabidopsis thaliana</i>
At2g41410 (cal2) Fl: 1-647bp K: 1-273bp	pOL-LP (GFP)	Protoplasten- Transformation	<i>Arabidopsis thaliana</i>
At3g50770 (cal3) Fl: 1-615bp K: 1-264bp	pOL-LP (GFP)	Protoplasten- Transformation	<i>Arabidopsis thaliana</i>
At2g15680 (cal4) Fl: 1-561bp K: 1-213bp	pOL-LP (GFP)	Protoplasten- Transformation	<i>Arabidopsis thaliana</i>
At1g76650 (cal5) Fl: 1-531bp K: 1-192bp	pOL-LP (GFP)	Protoplasten- Transformation	<i>Arabidopsis thaliana</i>
At5g42380 (cal6) Fl: 1-555bp K: 1-231bp	pOL-LP (GFP)	Protoplasten- Transformation	<i>Arabidopsis thaliana</i>
At2g43290 (cal7) Fl: 1-644 bp	pOL-LP (GFP)	Protoplasten- Transformation	<i>Arabidopsis thaliana</i>
At5g44460 (cal9) Fl: 1-543 bp	pOL-LP (GFP)	Protoplasten- Transformation	<i>Arabidopsis thaliana</i>

3.3. Allgemeine biochemische Methoden

3.3.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen wurde mittels denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt. Die Proteine wurden in SDS-Solubilisierungspuffer (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% (v/v) β -Mercaptoethanol, 20% (v/v) Glycerin, 4% (w/v) SDS und 0,01% Bromphenol) aufgenommen, 2 min bei 96°C denaturiert und in 10-15 %igen Polyacrylamidgelen mit einem Verhältnis von Acrylamid zu N,N'-Methylen-Bisacrylamid von 30:0,8 aufgetrennt.

3.3.2. Coomassie-Färbung

Nach der Elektrophorese wurde das Gel 15-20 min in Färbelösung (50% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure, 0,18% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250) inkubiert und dann solange in 40% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure und 3% (v/v) Glycerin entfärbt, bis der Hintergrund farblos und die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren.

3.3.3. Silberfärbung

SDS-Polyacrylamidgele wurden zunächst für mindestens eine Stunde in Fixierer (40% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure und 3% (v/v) Glycerin) gelegt und anschließend nach der Methode von Blum *et al.* (1987), wie unten beschrieben, gefärbt:

- 3 x 20 min mit 50%igem Ethanol (v/v) waschen
- 1 min in Vorbehandler (0,02% (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in Aqua bidest)
- 3 x 20 sec mit Aqua bidest waschen
- 20 min unter Schütteln im Dunkeln in Imprägnierlösung (0,2% (w/v) AgNO_3 , 0,028% (v/v) Formaldehyd in Aqua bidest) inkubieren
- 2 x 10 sec mit Aqua bidest waschen

- Gel in 37,5% (w/v) Na_2CO_3 , 0,028% Formaldehyd und 0,0075% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ entwickeln bis Proteinbanden deutlich sichtbar sind
- Färbung durch 10 min Inkubation in Fixier stoppen
- mit Aqua bidest waschen

3.3.4. Western-Blot-Transfer und Immunodekoration von Proteinen

Der Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf Nitrozellulose (Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland) bzw. PVDF-Membran (Immobilon, Millipore, USA) erfolgte durch den „semi-dry-blot“ nach Khyse-Anderson (1984). PVDF-Membranen wurden nach Instruktion des Herstellers vorbehandelt. Der Transfer erfolgte für 1 Std. bei einer Stromstärke von $0,8 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$.

Spezifische Antigenidentifizierung erfolgte durch Reaktion der Proteine mit polyklonalen Antikörpern und anschließender Detektion mit Hilfe eines enzymgekoppelten Sekundärantikörpers (alkalische Phosphatase [AP] gekoppelt an Anti-Kaninchen-IgG). Die Nitrozellulose-Membran wurde nach dem Proteintransfer für 1 Std in Magermilchpuffer (1% (w/v) Magermilchpulver, 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl und 0,01% (v/v) Tween 20) abgesättigt und 1-16 Std. mit dem entsprechenden spezifischen Antiserum inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min in Magermilchpuffer gewaschen und mit dem sekundären Antikörper (1:30 000 Verdünnung in Magermilchpuffer) für 1 Std inkubiert. Nicht gebundene Phosphatase-Konjugat-Antikörper wurden durch dreimalige Waschen für 10 min mit Magermilchpuffer entfernt und die Protein-Antikörper-Bindung wurde durch die Färbereaktion sichtbar gemacht. Dazu wurde die Membran kurz in Färbepuffer (100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 100 mM Tris-HCl pH 9,5) äquilibriert und anschließend in Färbepuffer zusammen mit 0,003% (w/v) Nitrotetrazoliumchlorid Blauhydrat und 0,017% (w/v) 5-Brom-4-chloro-indolylphosphat bei Raumtemperatur inkubiert. Die Farbentwicklung wurde durch Überführen in Wasser / EDTA gestoppt.

3.3.5. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgt nach der Methode von Bradford (1979) unter Verwendung eines Protein Essay Kits der Firma Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland). Aliquots der zu bestimmenden Proteinlösungen wurden nach Herstellerangaben mit der Testlösung gemischt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wurde die Absorption bei 595 nm gegen einen Blindwert gemessen. Der Proteingehalt wurde anhand einer mit Rinder-Serumalbumin erstellten Eichkurve bestimmt.

3.4. Isolierung intakter Chloroplasten, innerer und äußerer Hüllmembran von Erbse

Intakte Chloroplasten wurden aus 10-12 Tage alten Erbsenblättern isoliert. Die Anzucht der Erbsen (*Pisum sativum* L., cultivar Arvika) erfolgt in einem Licht/Dunkel-Rhythmus von 16/8 Std. bei einer Lichtstärke von 250 $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$.

Die Isolation der Chloroplasten erfolgte nach der Methode von Waegemann und Soll (1991). Die intakte Chloroplasten wurden in wenig Puffer (330 mM Sorbit, 3 mM MgCl_2 und 50 mM Hepes/KOH pH7,6) resuspendiert und im Dunkeln auf Eis bis zur weiteren Verwendungen aufbewahrt. Die Chlorophyllkonzentration von isolierten Chloroplasten wurde nach der Methode von Arnon (1949) bestimmt.

Die Isolierung von getrennten äußeren und inneren Hüllmembranen aus intakten Chloroplasten von Erbse erfolgte nach der Methode von Waegemann und Soll (1992).

3.5. Isolierung von Stroma aus intakten Chloroplasten von Erbse

Intakte Chloroplasten wurden, wie unter 3.4 beschrieben, isoliert, in 10 mM Tricine-KOH pH 7,9, 1 mM EDTA resuspendiert und durch Homogenisieren auf Eis lysiert. Die Chloroplastensuspension wurde danach für 10 min bei 1500 g zentrifugiert, um die Thylakoide zu pelletieren. Der Überstand wurde erneut bei

100 000 g für 60 min zentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde als Stroma von Erbse bezeichnet.

3.6. Heterologe Expression rekombinanter Proteine

Die Expression aller Konstrukte erfolgte in *E.coli* BL21(DE3). Ampicillin wurde als Selektionsantibiotikum in einer Konzentration von 0,1 mg/ml verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Die Bakterien wurden bis zu einer $OD_{600} = 0,8-1$ angezogen und die Expression von Proteinen durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Expression erfolgte für 3 Std. bei 37°C.

3.7. Chromatographische Methoden

3.7.1. Aufreinigung heterolog exprimierter Proteine

Alle Konstrukte waren mit einem C-terminalen 6xHis-Tag versehen, über die sie mittels Affinitätschromatographie an Ni^{2+} -NTA Agarose (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt werden können. Dazu wurden die Proteine aus den Bakterien (siehe 3.6) unter denaturierende Bedingungen (8 M Harnstoff) nach Angaben von Qiagen aufgereinigt. Die Elution der gebundenen Proteine von der Säule erfolgte durch Erniedrigung des pH-Wertes.

3.7.2. Affinitätschromatographie an Calmodulin-Agarose

Innere Hüllmembranvesikel von Erbsenchloroplasten (siehe 3.4), äquivalent zu 1 mg Protein, wurden in 750 μ l Calmodulin-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) mit 0,1 mM $CaCl_2$ oder 5 mM EGTA resuspendiert und durch Zugabe von 1% Decylmaltoside (DM) solubilisiert. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurde die Suspensionen bei 21 000 g für 15 min, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit entsprechendem Puffer bis zu einer DM-Endkonzentration von 0,1 % verdünnt und anschließend mit 100 μ l Calmodulin-Agarose (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) gemischt und über Nacht bei 4°C unter Schütteln

inkubiert. Die Agarosematrix wurde zuvor mit Calmodulin-Puffer äquilibriert. Nach Transfer der Matrix in eine Säule wurden unspezifisch gebundene Proteine durch Waschen der Säulenmatrix zuerst mit 10 ml Calmodulin-Puffer und dann mit 10 ml Calmodulin-Puffer + 500 mM NaCl entfernt. Spezifisch gebundene Proteine wurden mit 100 µl Calmodulin-Puffer + 20 µM Calmodulin (Alexis, Grüneberg, Deutschland) eluiert. Hierbei wurde der Elutionspuffer 15 min mit der Säulenmatrix inkubiert, bevor das Eluat gesammelt wurde. Die verschiedenen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE und anschließende Silber-Färbung analysiert.

3.7.3. Affinitätschromatographie an Fluphenazin-Sepharose

Die Fluphenazin-Sepharose wurde nach Angaben des Herstellers durch Kopplung von Fluphenazin Dihydrochlorid an „Epoxy-activated“ Sepharose™ 6B (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) hergestellt.

Das Stroma wurde, wie unter 3.5. beschrieben, aus intakten Chloroplasten (200-300 mg Chlorophyll) isoliert, auf 5 mM CaCl₂ eingestellt und auf 3 ml Fluphenazin-Sepharose beladen. Die Sepharose-Matrix wurde zuvor in Puffer A (10 mM Tricine/KOH pH 7,9, 5 mM CaCl₂) äquilibriert. Das Säulenmaterial wurde zunächst mit 200 ml Puffer A und dann mit 200 ml Puffer A + 0,5 M NaCl gewaschen, um nichtbindende Proteine zu entfernen. Die Elution erfolgte mit 8 ml 10 mM Tricine/KOH pH 7,9, 150 mM NaCl und 5 mM EGTA. Es wurden 0,5 ml-Fractionen gesammelt. Die Eluate wurden lyophilisiert und anschließend durch SDS-PAGE und Silber-Färbung analysiert.

3.8. Calmodulin-Bindungsassay

Heterolog exprimierte und aufgereinigte Proteine (siehe 3.7.1.) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und dann auf PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde für 16 Std. bei 4°C unter leichtem Schütteln in Assay-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH7,5, 150 mM NaCl, 1% (w/v) BSA, 1% (v/v) Brij35 und 1 mM CaCl₂) inkubiert, um die Proteine auf der Membran zu renaturieren. Für Kontroll-Assays wurde CaCl₂ durch 5 mM EGTA ersetzt. Die Membran wurde danach mit 0,1 µg/ml

biotinyliertes Calmodulin (Alexis, Grüneberg, Deutschland) in Assay-Puffer für 3 Std. bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach dem Waschen für 3x10 min mit Assay-Puffer wurde die Membran mit Streptavidin-Peroxidase Konjugat (1 µg/ml in Assay-Puffer) für 1 Std. bei RT inkubiert. Nach dem Waschen wurde das gebundene Calmodulin mittels „ECL detection system“ (Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland) nach Herstellerangaben detektiert.

3.9. Co-Immunpräzipitation von Proteinen

Innere Hüllmembranvesikel (siehe 3.4), äquivalent zu 30 µg Protein, wurden in IP-Puffer (50 mM HEPES/KOH pH 7,5, 0,05% (w/v) Egg Albumin und 0,1 mM CaCl₂) resuspendiert und durch Zugabe von 1% (w/v) N-Octylglucosid für 10 min auf Eis solubilisiert. Nicht solubilisierte Bestandteile wurden durch Zentrifugieren bei 50 000 g für 15 min bei 4°C pelletiert. Zu dem Überstand wurden entweder 5 µM Calmodulin, 500 µM NADPH, 500 µM NADP oder 500 µM NADH zugegeben. Der Ansatz wurde dann mit 5 µl des polyklonalen Antiserums gegen Tic110 für 60 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit Protein A-Sepharose 4Fast Flow (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) für 60 min bei RT. Die Sepharose wurde zuvor in IP-Puffer äquilibriert. Das Material wurde mehrfach mit IP-Puffer ohne Egg Albumin gewaschen und anschließend die gebundenen Proteine durch Zugabe von SDS-Solubilisierungspuffer und Erhitzen bei 96°C für 5 min von der Sepharose eluiert. Die Analyse der Fraktionen erfolgte über SDS-PAGE und Immundekoration nach dem Western-Blot.

3.10. Quervernetzung von innerer Hüllmembran mit EDC

Isolierte innere Hüllmembranvesikel von Erbsenchloroplasten (siehe 3.4), äquivalent zu 30 µg Protein, wurden in Anwesenheit oder Abwesenheit von 5 µM Calmodulin in 50 mM HEPES/KOH pH 7,5 und 0,1 mM CaCl₂ mit 1% (w/v) N-Octylglucosid für 60 min bei 4°C solubilisiert. Die Quervernetzung erfolgte anschließend nach der Methode von Arazi et al. (1995). In Kürze: die Ansätze wurden mit 2 mM EDC und 5 mM Sulfo-NHS für 30 min bei RT inkubiert. Die

Reaktion wurde durch Zugabe von SDS-Solubilisierungspuffer gestoppt. Die Reaktionsprodukte wurden anschließend durch SDS-PAGE und Immundekoration nach dem Western-Blot analysiert.

Um den Einfluss von NADPH auf die Tic32-Calmodulin Interaktion zu untersuchen, wurde die innere Hüllmembran mit verschiedenen NADPH-Konzentrationen für 20 min bei 4°C vorbehandelt, bevor 5 µM Calmodulin zugegen und für 40 min weiter inkubiert. Die Quervernetzungsreaktion erfolgte anschließend wie oben beschrieben.

3.11. *In vitro* Transkription

Die *in vitro* Transkription klonierter DNA-Fragmente erfolgte mittels Vektoren mit Promotorsequenzen für die T7- oder SP6-RNA-Polymerase. Die Plasmid-DNA wurde zuerst mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease linearisiert, mit Phenol/Chloroform extrahiert, präzipitiert und in Wasser zurückgelöst.

Die *in vitro* Transkription erfolgte nach Angaben des Herstellers in einem Reaktionsansatz von 50 µl mit 2-3 µg linearisiertem Plasmid-DNA, 50 U Rnase-Inhibitor, 100 U RNA-Polymerase, 10 mM DTT, 0,05 (w/v) BSA, 0,5 mM P1-5'-(7-Methyl)-Guanosin-P-5'Guanosin und je 0,5 mM ATP, CTP und UTP. Nach 15 min bei 37°C wurde dem Ansatz 1,2 mM GTP zugegeben und weiter für 75 min inkubiert. Aliquots des Translationsansatzes (mRNA) wurden anschließend entweder direkt für die *in vitro* Translation eingesetzt oder bei -80°C eingelagert.

3.12. *In vitro* Translation

Die *in vitro* synthetisierte mRNA (siehe 3.11) wurde für die *in vitro* Translation in zellfreien Kaninchen-Reticulocytenlysate (Roche, Mannheim, Deutschland) eingesetzt. Dies erfolgte nach Herstellerangaben für 60 min bei 30°C in einem 50-100 µl Reaktionsansatz. Der Ansatz enthielt Reticulocytenlysate, Translationsmix sowie 150 µCi ³⁵S-markiertes Methionin/Cystein-Gemisch. Die optimale Konzentration an Kaliumacetat (1-100 mM) sowie mRNA wurden durch Test-Translationsansätze ermittelt.

3.13. *In vitro* Import in intakten Chloroplasten

3.13.1. Proteinimport in isolierten Chloroplasten

Der *in vitro* Import von ³⁵S-markiertem Vorstufenproteinen erfolgte in einer Standard-Reaktion mit intakten isolierten Chloroplasten äquivalent zu 20µg Chlorophyll in 100 µl Import-Puffer (330 mM Sorbit; 50 mM Hepes/KOH pH 7,6; 3 mM MgSO₄; 10 mM Methionin; 10 mM Cystein; 20 mM Kaliumglukonat; 10 mM NaHCO₃; 0,2% (w/v) BSA, und 3 mM ATP). Die Translokation wurde durch die Zugabe von 1-5% (v/v) Translationsprodukt gestartet und für 5-20 min bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden die Chloroplasten durch Zentrifugation (5 min, 3 000 g, 4°C) über ein 40% Percollkissen (40% Percoll in 330 mM Sorbit; 50 mM Hepes/KOH pH 7,6) re-isoliert und in Waschmedium (330 mM Sorbit; 50 mM Hepes/NaOH pH 7,6; 3 mM MgCl₂) gewaschen. Die Chloroplasten wurden danach entweder in SDS-Solubilisierungspuffer oder zur anschließenden Nachbehandlung in entsprechendem Puffer aufgenommen.

Detektion und Analyse der ³⁵S-markierten Proteine erfolgte durch SDS-PAGE und anschließende Autoradiographie (siehe 3.15).

3.13.2. Proteasebehandlung von Chloroplasten

Nach der Import-Reaktion wurden die Chloroplasten zunächst in 330 mM Sorbit; 50 mM Hepes/KOH pH 7,6; 0,5 mM CaCl₂ resuspendiert und dann mit Thermolysin zu einer Konzentration von 100 µg/ml für 20 min auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10 mM EDTA gestoppt. Die Chloroplasten wurden anschließend pelletiert (5 min, 4 492 g, 4°C) und in 330 mM Sorbit; 50 mM Hepes/KOH pH 7,6; 5 mM EDTA gewaschen.

3.13.3. Alkalische Extraktion von Chloroplasten

Alkalische Extraktion erfolgte durch Inkubation der Chloroplasten nach den Protein-Importexperimenten mit 100 mM Na₂CO₃ pH 11,4 für 30 min auf Eis. Nach einer Zentrifugation für 15 min bei 170 000 g, 4°C wurde die Membranfraktion

(Pellet) in SDS-Solubilisierungspuffer aufgenommen und durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

3.13.4. Fraktionierung der Chloroplasten

Um die Lokalisierung der Import-Intermediate zu untersuchen, wurden die Chloroplasten nach der Importreaktion in lösliche und nichtlösliche (Membran) Fraktion aufgeteilt. Dafür wurden die Chloroplasten in 10 mM Hepes/KOH pH 7,6 für 30 min auf Eis lysiert und anschließend bei 170 000 g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE und anschließende Autoradiographie analysiert.

3.13.5. ATP-Abhängigkeit des Protein-Importes in Chloroplasten

Für die Durchführung ATP-abhängigem Import-Prozess in den Chloroplasten, wurden die radioaktiv-markierten Vorstufenproteine in Nitrozellulose Filter VSWP02500 (Millipore, Bedford, MA, USA) für 1-2 Std. gegen 50 mM Hepes/KOH pH 7,6 dialysiert, um ATP von der *in vitro* Translation-Reaktion zu entfernen. Die Chloroplasten für den Import wurden von Erbsen, die zuvor mindestens 12 Std im Dunkeln gestanden hatten, isoliert, um das in den Organellen enthaltene ATP abzubauen. Die Import-Reaktion wurde mit von außen zugegebenem ATP durchgeführt. Dazu wurden verschiedene ATP-Konzentrationen (0-3 mM) zum Import-Ansatz zugegeben. Zusätzlich wurden die Reaktion und die anschließende Proteasebehandlung im Dunkeln durchgeführt.

3.13.6. Inhibitionsexperimente

Für die Inhibitionsuntersuchungen wurden entweder Ophiobolin A, Microcystin LR, DEPC, A23187 oder Ionomycin in angegebenen Konzentrationen zu der Importreaktionen zugegen und 20 min vorinkubiert, bevor das Translationsprodukt zugegeben wurde. Die Vorinkubation mit DEPC, Ophiobolin A und Microcystin LR

erfolgte bei 25°C während die Vorinkubation mit A23187 und Ionomycin auf Eis erfolgte.

3.14. *in vitro* Phosphorylierung

Die *in vitro* Phosphorylierung von isolierten äußeren und inneren Hüllmembranvesikeln sowie gesamte Chloroplasten aus Erbse (je äquivalent zu 20 µg Protein) erfolgte in einem 30 µl Reaktionsvolumen in 20 mM Tricine-KOH pH 7,6, 5 mM MgCl₂, 0,5 mM MnCl₂ und 10 µM ATP in Anwesenheit oder Abwesenheit von 150 µM Ophiobolin A. Die Reaktionsansätze wurden zuerst für 25 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor 1 µCi γ³²P-ATP zugegeben wurde. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit SDS-Solubilisierungspuffer gestoppt. Die Ansätze wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert

3.15. Autoradiographie

Zum Nachweis von radioaktiven Signalen wurden die Gele nach der PAGE mit Coomassie gefärbt, getrocknet und anschließend auf Phosphoimager-Platten für 1-12 Std. exponiert. Die radioaktiven Signale wurden mittels eines Phosphoimagers von Fuji FLA-3000 (Japan) detektiert und durch das Programm AIDA Version 3.52-046 quantifiziert.

3.16. Transiente Transformation von Protoplasten

Transiente Transformation von Tabak (*Nicotiana tabacum*) oder *Arabidopsis thaliana* Protoplasten mit den verschiedenen Calmodulin-Homologen (siehe Tabelle 2) erfolgte nach der Methode von Koop *et al.* (1996).

Pro Transformationsansatz wurden ca. 50 µg DNA eingesetzt. Die Transformationsansätze wurden im Dunkeln für 24-72 Stunden inkubiert.

Fluoreszenz-Signale wurden mittels Fluoreszenz-Mikroskop detektiert. Alle Transformationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.17. Fluoreszenz-Mikroskopie

Die Detektierung von Fluoreszenz-Signalen erfolgte mittel des epi-Fluoreszenz Mikroskop (Polychrome IV System, Till Photonics GmbH, München, Deutschland) mit GFP-, FITC-, und Rhodamin-Filtern.

3.18. Computer-Analyse

Die Arabidopsis Datenbank MIPS (<http://mips.gsf.de/proj/thal/db/index.html>) und Tigr (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1>) wurden verwendet, um Calmodulin und seine Homologe zu identifizieren. Die Programme TargetP (Emanuelsson et al., 2000) und PCLR (<http://apicoplast.cis.upenn.edu/pclr>) wurden verwendet, um die intrazelluläre Lokalisierung der Proteine vorherzusagen. Für den Abgleich von Proteinsequenzen wurde das Programm Clustal W (Jeanmougin et al., 1998) verwendet. Um die Calmodulin-Bindungsmotive zu identifizieren, wurden Programme der Calcium Datenbank: (http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/pub_pages/search/index.html) verwendet. Die Zeichnung der α -Helices wurde mittels des Programms „Helical Wheel Applet“ (<http://cti.itc.virginia.edu/~cmg/Demo/wheelApp.html>) ermöglicht.

4. Ergebnisse

4.1. Effekt von Calcium und Calmodulin auf den Proteinimport in Chloroplasten

Transport via Membranvesikel ist ein System eukaryotischen Ursprungs, das auch in Chloroplasten der Landpflanzen vorkommt (Westphal *et al.*, 2001, 2003). Wie bei der homotypischen Vakuolenfusion in Hefe wird die Membranfusion der Vesikel in Chloroplasten durch Calmodulin und die Protein Phosphatase 1 reguliert (Peters und Mayer, 1998; Peters *et al.*, 1999; Westphal *et al.*, 2001). Es wurde spekuliert, dass dieses System möglicherweise kernkodierte Proteine in die Thylakoidmembran oder das Thylakoidlumen transportiert. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde der Einfluss von Calmodulin- und Protein Phosphatase 1-Inhibitoren auf die Translokation thylakoidärer Proteine untersucht.

4.1.1. Ophiobolin A beeinflusst den Import von pOE33 und pPC1

Als Beispiel für Proteine, die im Kern kodiert und nach ihrer Synthese an cytosolischen Ribosomen in die Thylakoide des Chloroplasten transportiert müssen, wurden sowohl die 33 kDa Untereinheit des Wasserspaltungsapparats (OE33) als auch Plastocyanin (PC1) ausgesucht. OE33 und PC1 werden bei ihrer Synthese im Cytosol mit einer zweiteiligen, N-terminalen Extension (Präsequenz) versehen (Cline *et al.*, 1993). Diese Proteine werden als Vorstufenproteine pOE33 und pPC1 bezeichnet. Nach dem Import ins Stroma des Chloroplasten wird der N-proximale Teil der Präsequenz durch die stromale Prozessierungspeptidase (SPP) abgespalten, so dass die löslichen Intermediate, iOE33 und iPC1, entstehen. Diese Intermediate werden anschließend durch die Thylakoidmembran zum Lumen transportiert, wo auch der zweite Teil der Präsequenz durch eine Prozessierungspeptidase abgespalten wird. Es entstehen die maturen Formen mOE33 und mPC1.

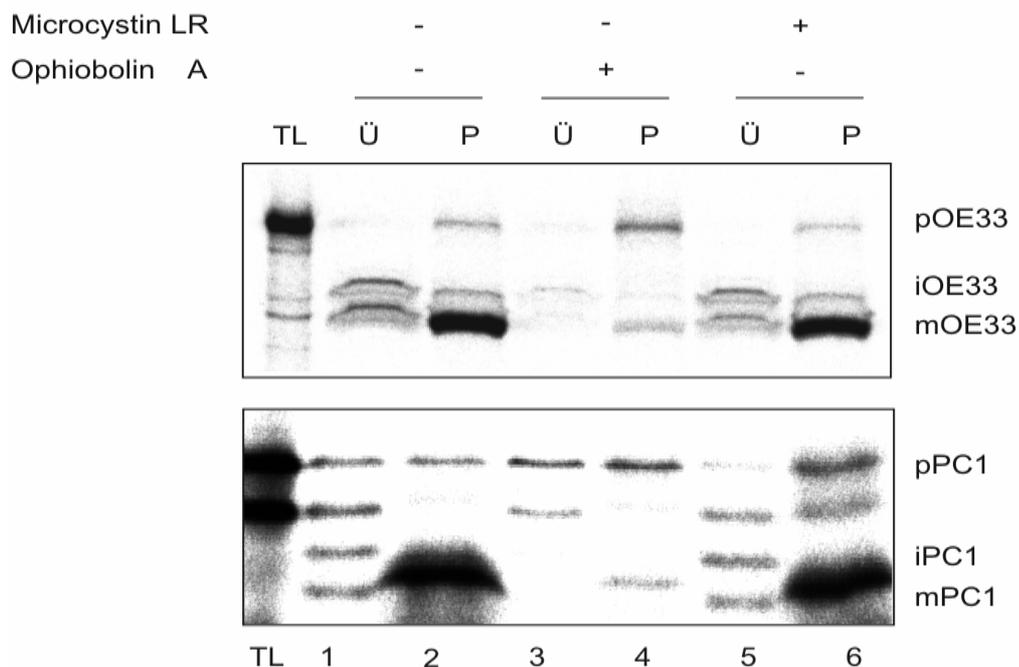


Abb. 3: Effekt von Ophiobolin A und Microcystin LR auf die Translokation von pOE33 und pPC1

Isolierte Chloroplasten (20 µg Chlorophyll) wurden mit 100 µM Ophiobolin A oder 100 µM Microcystin LR für 20 min bei 25°C vorbehandelt und in Translokationsexperimenten mit ³⁵S-markiertem pOE33 und pPC1 eingesetzt. Die Translokation erfolgte bei Standardbedingungen (3 mM ATP, 25°C) für 15 min. Nach Reisolierung der Chloroplasten wurden diese in 10 mM Hepes-KOH pH 7,6 lysiert und durch Ultrazentrifugation in membrangebundene (P) und lösliche (Ü) Fraktion aufgeteilt. Die Reaktionsansätze wurden durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. TL: 10% des eingesetzten Translationsproduktes, pOE33 und pPC1: Vorstufenproteine, iOE33 und iPC1: lösliche stromale Intermediate, mOE33 und mPC1: mature, thylakoidassoziierte Formen.

Die ³⁵S-markierten Vorstufenproteine pOE33 bzw. pPC1 wurden, wie unter 3.14.1 beschrieben, für Importexperimente in isolierte Chloroplasten eingesetzt (Abb. 3). Nach dem Import wurden die Chloroplasten lysiert und in lösliche (Ü) und membrangebundene (P) Fraktion getrennt (siehe 3.14.4). Die Intermediate iOE33 und iPC1 unterscheiden sich dabei von den maturen Formen mOE33 und mPC1 hinsichtlich ihrer Größe. Darüberhinaus sind sie entsprechend in der löslichen (Ü) bzw. in der membrangebundene (P) Fraktion zu finden (Abb. 3, Spur 1 und 2). Zusätzlich wurden isolierte Chloroplasten mit 100 µM Ophiobolin A (Abb.3, Spur 3

und 4) oder 100 μ M Microcystin LR (Abb. 3, Spur 5 und 6) vorbehandelt, bevor die Importreaktion durchgeführt wurde. Ophiobolin A ist ein spezifischer Inhibitor für Calmodulin (Leung *et al.*, 1984). Er ist membran-durchlässig, bindet im aktiven Zentrum von Calmodulin und inhibiert dadurch die Bindung zwischen Calmodulin und seinen Interaktionspartnern. Microcystin LR ist ein kleines zirkuläres Peptid mit einer Größe von ca. 1 kDa. Es wird durch das Cyanobakterium *Microcystis aeruginosa* synthetisiert und inhibiert die eukaryotische Protein Phosphatase 1 (Honkanen *et al.*, 1990). Beide Komponenten inhibieren den Vesikeltransport im Chloroplasten auf der Stufe der Fusion der Vesikel mit der Thylakoidmembran (Westphal *et al.*, 2001). Dies bedeutet, dass es beim Import beider Proteine in mit Ophiobolin A oder Microcystin LR vorbehandelten Chloroplasten zur Akkumulation der stromalen, löslichen Intermediate (iOE33 und iPC1) und zur Abnahme der muren Formen (mOE33 und mPC1) kommen sollte, wenn OE33 und PC1 tatsächlich den Vesikeltransport für ihre Translokation in das Thylakoidlumen benötigen. Im Fall von Microcystin LR konnte kein Unterschied zwischen unbehandelten und behandelten Chloroplasten beobachtet werden (Abb. 3, Spur 5 und 6). Im Gegensatz dazu führte die Vorbehandlung der Chloroplasten mit 100 μ M Ophiobolin A zu einem fast vollständigen Verschwinden sowohl der stromalen Intermediate als auch der muren Formen von OE33 und PC1 (Abb.3, Spur 3 und 4). Dies deutet darauf hin, dass Ophiobolin A bereits einen spezifischen Effekt auf den Import dieser Proteine in den Chloroplasten hat.

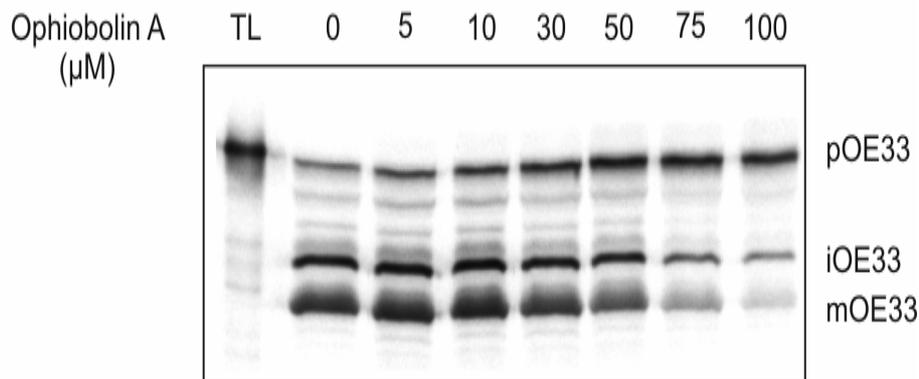


Abb. 4: Effekt von Ophiobolin A auf die Translokation von pOE33

³⁵S-markiertes Translationsprodukt von pOE33 wurde in intakte Chloroplasten importiert, die zuvor mit steigenden Konzentrationen von Ophiobolin A für 20 min bei 25°C vorbehandelt waren. Die Versuchsansätze wurden durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. TL: 10% des eingesetzten Translationsproduktes, pOE33: Vorstufenprotein, iOE33: lösliche stromale Intermediat, mOE33: mature thylakoidassoziierte Form.

Um den Effekt von Ophiobolin A genauer zu untersuchen, wurde der Import von pOE33 mit Chloroplasten durchgeführt, die mit ansteigenden Konzentrationen von Ophiobolin A vorinkubiert waren (Abb. 4). Der Versuch ergab die Abnahme sowohl von iOE33 als auch von mOE33 mit steigender Inhibitor-Konzentration. Die Inhibierung setzte bei einer Ophiobolin A-Konzentration von 30 μM ein. Bei 100 μM Ophiobolin A war der Import von pOE33 fast vollständig gehemmt. Dieses Experiment untermauert das vorherige Ergebnis, dass Ophiobolin A bereits den Import von pOE33 in den Chloroplasten beeinflusst. Dabei konnte beobachtet werden, dass im Gegensatz zu iOE33 und mOE33 die Menge an pOE33 mit steigender Konzentration des Inhibitors anstieg. Diese Bande (pOE33) repräsentiert das Vorstufenprotein von OE33, welches an die Rezeptoren des Proteintranslokationskomplexes der äußeren Hüllmembran der Chloroplasten (Toc-Komplex) gebunden ist, aber nicht importiert wurde. Diese Beobachtungen legen nahe, dass Ophiobolin A die Translokation der Vorstufenproteine über die Chloroplastenmembrane, nicht jedoch deren Bindung an die äußere Hüllmembran, hemmt.

4.1.2. Der Effekt von Ophiobolin A ist spezifisch für bestimmte Vorstufenproteine

Die Ergebnisse in 4.1.1 legen nahe, dass Ophiobolin A den Proteinimport auf Höhe des Toc- und/oder des Tic-Komplexes hemmt. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass Ophiobolin A eventuell den weiteren Transport der Proteine in die Thylakoide unterbindet, was wiederum rückwirkend zur Hemmung der Translokation dieser Proteine in Chloroplasten führt. Um diese Möglichkeiten zu untersuchen, wurden Versuche mit Proteinen, die nicht weiter in die Thylakoide transportiert müssen, unter Bedingungen durchgeführt, bei denen der Import von pOE33 fast vollständig gehemmt ist (Abb.5a und b). Die verwendeten Proteine unterscheiden sich zum Einen hinsichtlich ihrer Lokalisierung im Chloroplasten und zum Anderen darin, ob sie für die Translokation eine Präsequenz verwenden. Vipp1 (**vesicle-inducing protein of plastids 1**) und SSU (kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase / Oxygenase) sind innerhalb der Chloroplasten lokalisiert und mit einer N-terminalen, abspaltbaren Präsequenz versehen (Schnell und Blobel, 1993; Li *et al.*, 1994). Diese Proteine werden über die Proteintranslokationskomplexe in der äußeren (Toc-Komplex) und inneren (Tic-Komplex) Hüllmembran importiert. Als Proteine der inneren Hüllmembran wurden für diese Untersuchung Tic32 und Tic110 verwendet. Beide Proteine sind Komponenten des Tic-Komplexes, benutzen aber verschiedene Wege für ihren Import in Chloroplasten. Tic110 besitzt eine N-terminale Präsequenz und verwendet den allgemeinen Proteinimportweg über die Toc- und Tic-Komplexe (Lübeck *et al.*, 1996). Tic32 hingegen besitzt keine Präsequenz und verwendet einen noch nicht bekannten Weg für seinen Import in die innere Hüllmembran (Nada und Soll, 2004). Darüber hinaus wurde auch das Verhalten des äußeren Hüllmembranproteins Toc34 getestet. Dieses Protein besitzt keine Präsequenz und wird direkt vom Cytosol in die Membran inseriert (May und Soll, 1998; Qbadou *et al.*, 2003).

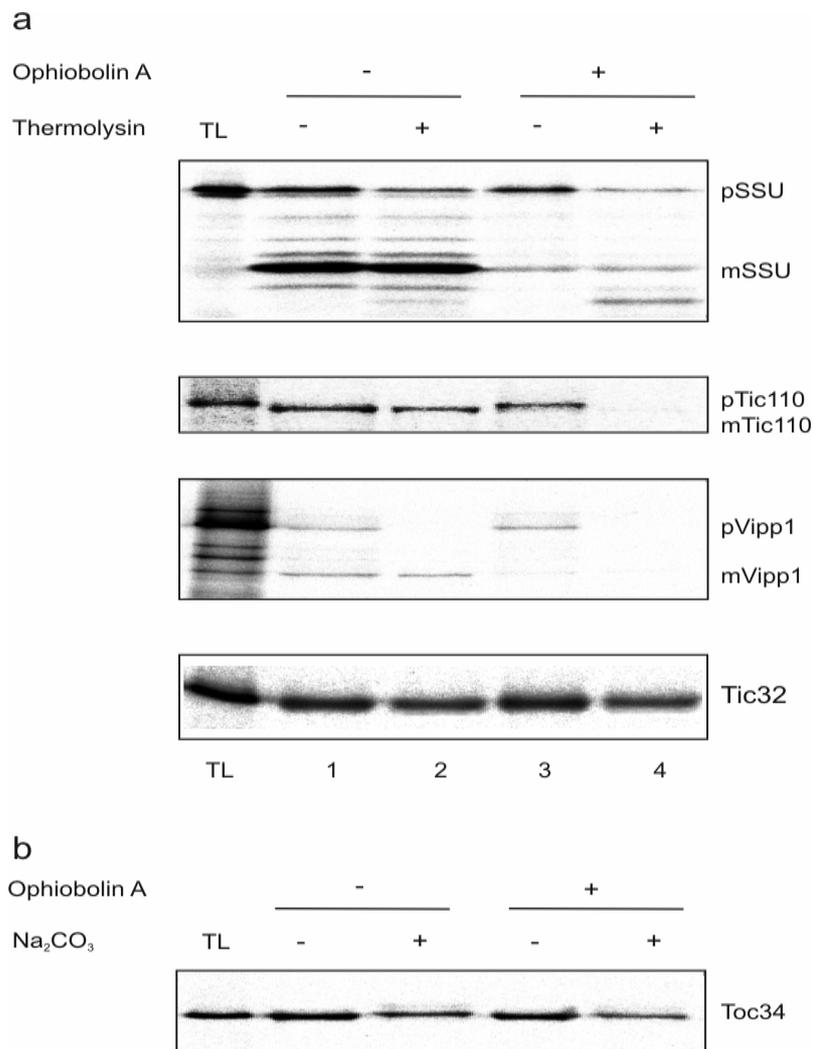


Abb. 5: Die Hemmung des Chloroplastenimports durch Ophiobolin A abhängig von Vorstufenproteinen

³⁵S-markiertes Translationsprodukt (TL: 10% des eingesetzten Translationsproduktes) von pSSU, pTic110, pVipp1, Tic32 und Toc34 wurde in Standardimportreaktionen (3 mM ATP, 25°C, 5 min) in intakte Chloroplasten (entsprechend 20 µg Chlorophyll) eingesetzt. Die Chloroplasten wurden zuvor bei 25°C für 20 min mit 100 µM Ophiobolin A behandelt. Anschließend wurden die Ansätze in zwei gleiche Aliquots geteilt. Ein Teil wurde nicht weiter behandelt und der andere wurde, wie angegeben, entweder **(a)** mit Thermolysin behandelt oder **(b)** mit 0,1 M Na₂CO₃ bei pH 11,4 extrahiert. Die Analyse der Proben erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie.

Die *in vitro* synthetisierten, ^{35}S -markierten Translationsprodukte (siehe 3.11 und 3.12) wurden in Import-Experimenten mit Chloroplasten eingesetzt, die zuvor mit 100 μM Ophiobolin A vorbehandelt waren. Nach dem Import wurde die Hälfte des Reaktionsansatzes (außer Toc34) mit Thermolysin behandelt (siehe 3.14.2 und 3.14.3). Für Toc34 wurden die Chloroplasten nach der Importreaktion mit Na_2CO_3 pH 11,4 extrahiert. Diese zusätzlichen Behandlungen entfernen die Proteine, die an der Oberfläche der Chloroplasten gebunden, jedoch nicht die transloziert oder in die äußere Hüllmembran inseriert sind. Auf diese Weise werden nur vollständig translozierte Proteine nachgewiesen. Die Vorstufenproteine pSSU, pVipp1 und pTic110 tragen eine N-terminale Präsequenz, die nach dem Import im Stroma abgespalten wird. Dadurch entstehen die kleineren, maturen Formen mSSU, mVipp1 und mTic110 (Abb. 5a, Spur 1+2). Die Vorbehandlung der Chloroplasten mit Ophiobolin A führte, wie bereits bei pOE33 und pPC1 beobachtet (Abb. 3), zu einem fast vollständigen Ausbleiben der maturen Formen (Abb 5a, Spur 3+4), was darauf hin deutet, dass Ophiobolin A den Import dieser Vorstufenproteine in Chloroplasten hemmt. Der Import von Tic32 (Abb.5a) und Toc34 (Abb. 5b), die keine Präsequenz besitzen, hingegen wurde nicht durch Zugabe von Ophiobolin A beeinflusst. Diese Resultate lassen darauf schließen, dass Ophiobolin A einen hemmenden Effekt nur auf den Import derjenigen Proteine ausübt, die eine N-terminale, abspaltbare Präsequenz tragen und über den Toc- und Tic-Komplex in Chloroplasten importiert werden.

4.1.3. Hemmung des pSSU-Imports durch Ophiobolin A

Der Import von pSSU in Chloroplasten ist sehr gut untersucht. Um die Ursache für die Inhibierung durch Ophiobolin A auf den chloroplastidären Import besser zu verstehen, wurden daher weitergehende Studien mit pSSU durchgeführt. Dazu wurde zuerst das ^{35}S -markierte Vorstufenprotein pSSU in Chloroplasten importiert, die zuvor mit steigender Konzentration von Ophiobolin A inkubiert wurden (Abb.6a und b). Nach der Importreaktion wurde die Hälfte des Ansatzes mit Thermolysin behandelt, um an die Oberfläche der Chloroplasten gebundenes pSSU zu entfernen. Steigende Konzentrationen von Ophiobolin A führten zur Abnahme der maturen Form (mSSU) innerhalb der Chloroplasten. Wie zuvor für pOE33

beobachtet, setzt die Inhibierung bei einer Konzentration von etwa 25 μM Ophiobolin A ein und erreichte bei 100 μM ihr Maximum. Eine Analyse mehrerer unabhängiger Importexperimente konnte zeigen, dass eine Inhibierung des Imports von über 80% erreicht wurde (Abb. 6b).

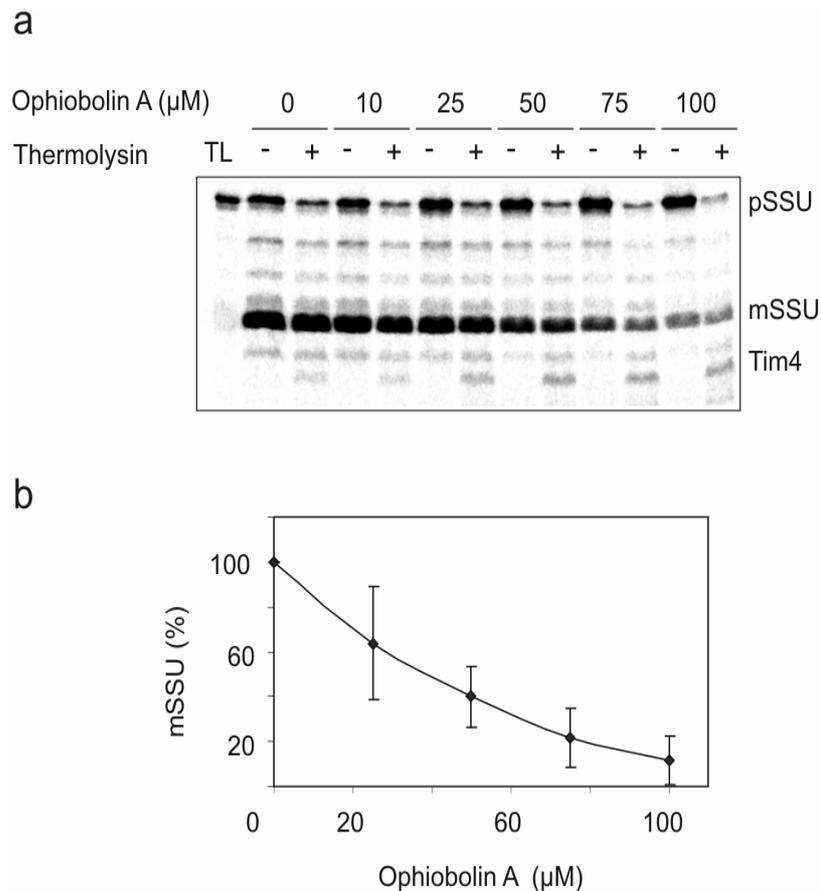


Abb. 6: Hemmung des pSSU-Imports in Chloroplasten durch Ophiobolin A.

(a) ^{35}S -markiertes Translationsprodukt von pSSU (TL: 10% des eingesetzten Produkts) wurde in Standardimportreaktionen (3 mM ATP, 25°C, 5 min) mit Chloroplasten eingesetzt, die zuvor mit steigender Konzentration von Ophiobolin A inkubiert worden. Die Organellen wurden reisoliert und mit Thermolysin behandelt. Die Proben wurden anschließend durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Die Position des Vorstufenproteins (pSSU), der muren Form (mSSU) und des Translokationsintermediates (Tim4) ist gekennzeichnet. **(b)** Die Importeffizienz wurde als Menge des prozessierten, muren Proteins mSSU ermittelt. Die Menge von mSSU in der Anwesenheit von Ophiobolin A wurde mit der unter Kontrollbedingungen ohne Ophiobolin A verglichen und ist als Prozentangabe dargestellt. Gezeigt ist der Durchschnitt von sechs unabhängigen Experimenten.

Dieses Experiment untermauert das in 4.1.2 erhaltene Ergebnis, dass die Hemmung des Imports durch Ophiobolin A konzentrationsabhängig ist. Gleichzeitig konnte beobachtet werden, dass die Menge gebundenen pSSUs (Abb. 6a, nicht mit Thermolysin behandelte Proben) mit steigender Konzentration des Inhibitors zunahm. Interessanterweise kommt es parallel zur Abnahme von mSSU auch zu einem Anstieg der Menge des Importintermediates Tim4 (Abb. 6a, mit Thermolysin behandelten Proben). Tim4 (Translocation intermediat 4 of SSU) entsteht durch proteolytische Degradation des Vorstufenproteins pSSU an dessen C-Terminus (Waegemann und Soll, 1991 und 1996; Caliebe *et al.*, 1997). Der N-Terminus ist in den Translokationsapparat inseriert, wodurch er partiell gegen Proteolyse geschützt und als ein Peptid von etwa 12 kDa nachweisbar ist (Abb. 6a, Tim4). Das Auftauchen von Tim4 legt nahe, dass die Inhibierung durch Ophiobolin A erst einsetzt, wenn pSSU bereits partiell in den Importapparat inseriert ist (Siehe 4.1.5).

Ophiobolin A ist ein bekannter, spezifischer Inhibitor für Calmodulin (Leung *et al.*, 1984). Dies lässt darauf schließen, dass die Inhibierung des Proteinimports in Chloroplasten durch Ophiobolin A auf dessen spezifischen Bindung an Calmodulin zurückzuführen ist. Um diese Vermutung zu prüfen, wurden die Chloroplasten mit 100 μ M Ophiobolin A in der Anwesenheit steigender Calmodulin-Konzentration behandelt, bevor die Importreaktion durchgeführt wurde (Abb. 7). Die Zugabe von 50 μ M Calmodulin führte bereits zu fast vollständiger Wiederherstellung des pSSU-Imports. Dies zeigte sich durch die Zunahme des mSSU und Abnahme des Importintermediates Tim4. Dieses Experiment zeigt, dass der Effekt von Ophiobolin A auf den Proteinimport durch exogenes Calmodulin aufgehoben werden kann.

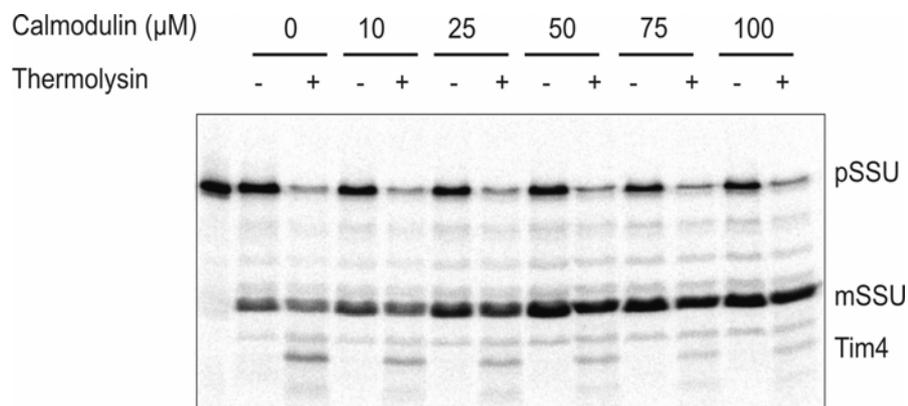


Abb. 7: Hemmung des pSSU-Imports durch Ophiobolin A wird durch Zugabe von externem Calmodulin aufgehoben.

Isolierte Chloroplasten (20 μg Chlorophyll) wurden mit 100 μM Ophiobolin A sowie ansteigender Konzentration Calmodulins für 20 min bei 25°C vorbehandelt und nachfolgend in Translokationsexperimenten mit ^{35}S -markiertem pSSU eingesetzt. Die Translokation erfolgte bei Standardbedingungen (3 mM ATP, 25°C) für 5 min. Danach wurden die Chloroplasten reisoliert und zur Hälfte mit Thermolysin behandelt. Die Proben wurden anschließend durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Die Position des Vorstufenproteins (pSSU), der maturen Form (mSSU) und des Translokationsintermediates (Tim4) ist gekennzeichnet. TL: 10% des eingesetzten Translationsproduktes.

4.1.4. Effekt von Calcium-Ionophoren auf pSSU-Import

Calmodulin ist ein intrazellulärer Calcium-Rezeptor, der ubiquitär in eukaryotischen Zellen vorhanden ist. Die Bindung von Calcium verursacht intramolekuläre Konformationsänderungen, die es ermöglichen, dass Calmodulin mit seinen Zielproteinen interagiert und somit viele zelluläre Prozesse reguliert (Reddy, 2001; Zielenski, 1998). Um zu untersuchen, ob auch der Proteinimport in Chloroplasten durch Calcium reguliert wird, wurden die Chloroplasten vor der Importreaktion mit einer Reihe von Substanzen behandelt, die Einfluss auf den Calcium-Gehalt nehmen können. Calcium-Chelatoren wie EDTA und EGTA zeigten dabei keinen Effekt auf den Import von pSSU (Abb. 8). Im Gegensatz dazu

fürte die Behandlung mit Calcium-Ionophoren wie A23187 und Ionomycin zur einer deutlichen Inhibierung des Imports von pSSU (Abb. 9a und b). A23187 und Ionomycin sind in der Lage, Calcium zu binden und dieses durch biologische Membranen zu transportieren. Dieser Transport läuft mit dem Konzentrationsgefälle bis ein Gleichgewicht erreicht wird. Beide Ionophore inhibierten den Import, ähnlich wie Ophiobolin A, in einer konzentrationsabhängigen Weise (Abb. 9a + b). Ansteigende Konzentrationen der Ionophore führten zur Abnahme der murenen Form mSSU. Parallel dazu kam es zum Anstieg der Menge gebundenen pSSUs (Abb. 9a und b, nicht mit Thermolysin behandelte Proben). Das Einsetzen der Inhibierung konnte bereits bei 10 μM A23187 (Abb. 9a) und 10 μM Ionomycin (Abb. 9b) beobachtet werden. Bei einer Konzentration von 100 μM erreichte die Hemmung einen Wert von etwa 70%. Die Hemmung zeigte sich auch durch die Bildung des Importintermediates Tim4 (Abb. 9a + b, mit Thermolysin behandelte Proben). Dies legt nahe, dass die Inhibierung durch die Calcium-Ionophore A23187 und Ionomycin, ähnlich wie bei Ophiobolin A beschrieben, erst stattfindet, wenn pSSU schon in den Importapparat inseriert ist.

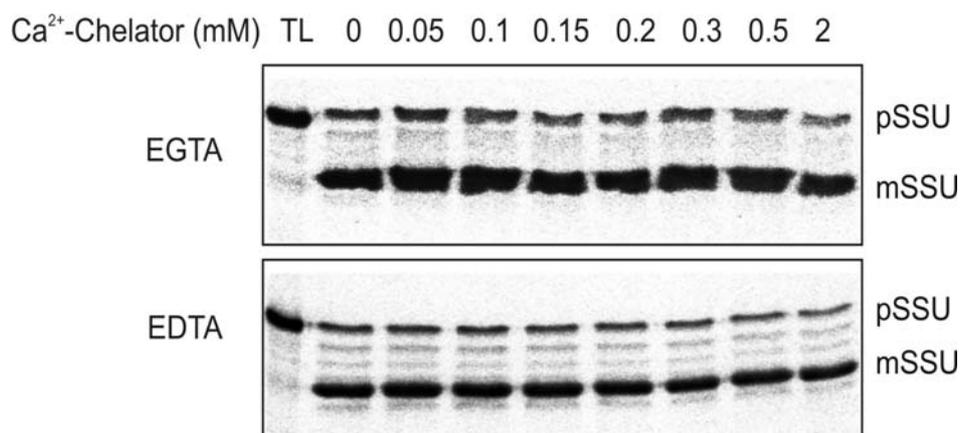


Abb. 8: Effekt von Calcium-Chelatoren auf den Import von pSSU

^{35}S -markiertes Translationsprodukt von pSSU (TL: 10% des eingesetzten Produktes) wurde in Standardimportreaktionen (3 mM ATP, 25°C, 5 min) in intakten Chloroplasten eingesetzt, die zuvor mit steigender Konzentration von EGTA oder EDTA inkubiert waren. Nach dem Translokationsexperiment wurden die Organellen reisoliert und mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

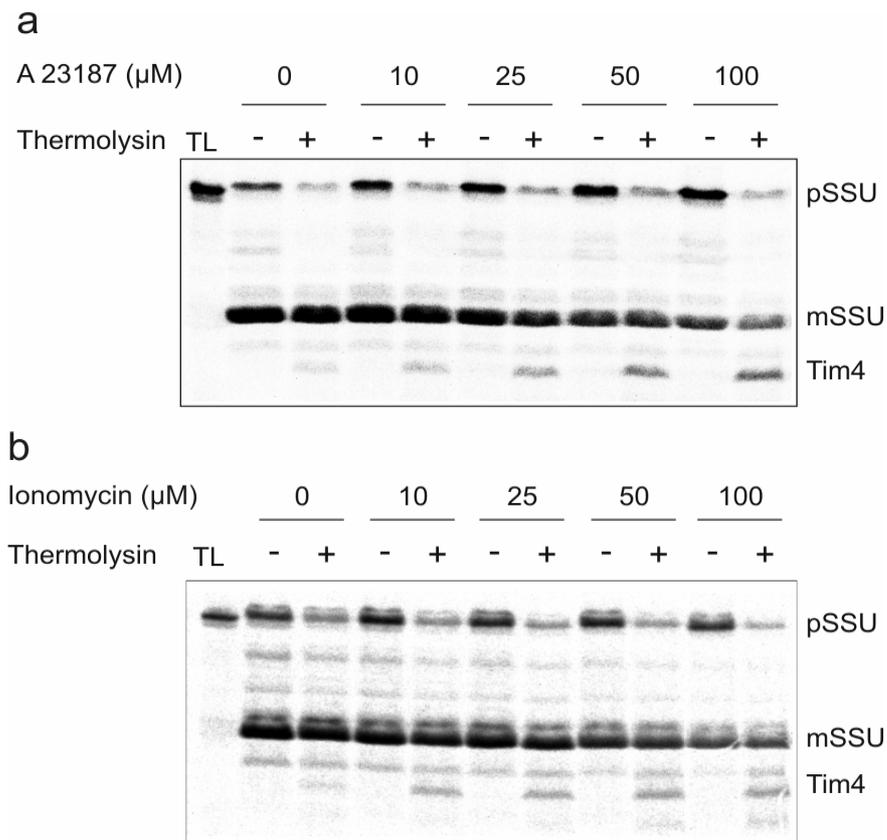


Abb. 9: Hemmung des pSSU-Imports in Chloroplasten durch Calcium-Ionophore

Isolierte intakte Chloroplasten ($20 \mu\text{g}$ Chlorophyll) wurden mit steigender Konzentration von A23187 **(a)** oder Ionomycin **(b)** für 20 min auf Eis vorinkubiert und zu nachfolgenden Translokationsexperimenten mit ^{35}S -markiertem pSSU eingesetzt. Die Translokation erfolgte bei Standardbedingungen (3 mM ATP, 25°C) für 5 min. Nach Reisolierung der Chloroplasten wurde die Hälfte des Ansatzes mit Thermolysin behandelt (+). Die Analyse der Proben erfolgte mittels SDS-PAGE und Autoradiographie. mSSU: mature Form, pSSU: Vorstufenprotein, Tim4: Translokationsintermediat, TL: 10% des eingesetzten Translationsproduktes.

Wie bereits erwähnt sind A23187 und Ionomycin Calcium-Ionophore. Sie binden Calcium und transportieren es durch biologische Membranen bis ein Gleichgewicht erreicht wird. Da die Importreaktion in calcium-freiem Medium stattfindet, ist davon auszugehen, dass die Ionophore das Calcium aus dem Inneren der Chloroplasten in das Außenmedium transportieren. Diese Calcium-

Abreicherung führt dann zum hemmenden Effekt der Ionophore. Um diese Vermutung zu prüfen, wurden die Chloroplasten mit 100 μM A23187 in der Anwesenheit steigender Calcium-Konzentration behandelt, bevor die Importreaktion durchgeführt wurde (Abb. 10). Bereits die Zugabe von 25 μM CaCl_2 führte zu fast vollständiger Wiederherstellung des pSSU-Imports. Dies belegt die Zunahme von mSSU und Abnahme des Importintermediates Tim4. Dieses Experiment zeigt, dass der hemmende Effekt der Ionophore auf deren spezifische Bindung an Calcium zurückzuführen ist und legt darüber hinaus nahe, dass die calcium-abhängige Hemmung des Imports im Inneren der Chloroplasten stattfindet.

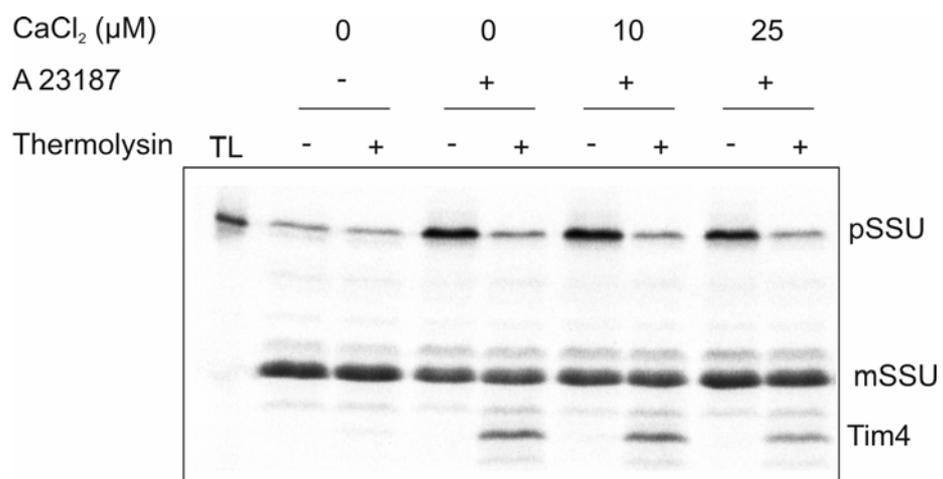


Abb. 10: Aufhebung des Effektes der Calcium-Ionophore auf den pSSU-Import durch Zugabe von externem Calcium.

Isolierte Chloroplasten (20 μg Chlorophyll) wurden mit 100 μM A23187 in der Anwesenheit ansteigender Konzentration vom Calcium für 20 min auf Eis inkubiert und zu nachfolgenden Translokationsexperimenten mit ^{35}S -markiertem pSSU eingesetzt. Die Translokation erfolgte bei 25°C für 5 min. Danach wurden die Chloroplasten reisoliert und mit Thermolysin behandelt. Die Proben wurden anschließend durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. mSSU: mature Form, pSSU: Vorstufenprotein, Tim4: Translokationsintermediat, TL: 10% des eingesetztes Translationsproduktes

Um zu zeigen, dass die Integrität der Hüllmembranen des Chloroplasten durch die Calcium-Ionophore nicht angegriffen wird, wurde der Import von Proteinen der äußeren und inneren Hüllmembran, Toc34 bzw. Tic32, in der Anwesenheit von 100 μ M A23187 oder Ionomycin durchgeführt (Abb. 11). Ähnlich wie bei Ophiobolin A (Abb. 5), zeigten die Ionophore keinen Effekt auf die Translokation beider Proteine. Dies bedeutet, dass die Calcium-Ionophore A23187 und Ionomycin zum einen die Integrität der Membranen nicht beeinträchtigen und zum anderen, dass deren hemmende Effekt auf den Import, ähnlich wie bei Ophiobolin A, Vorstufenprotein-spezifisch ist.

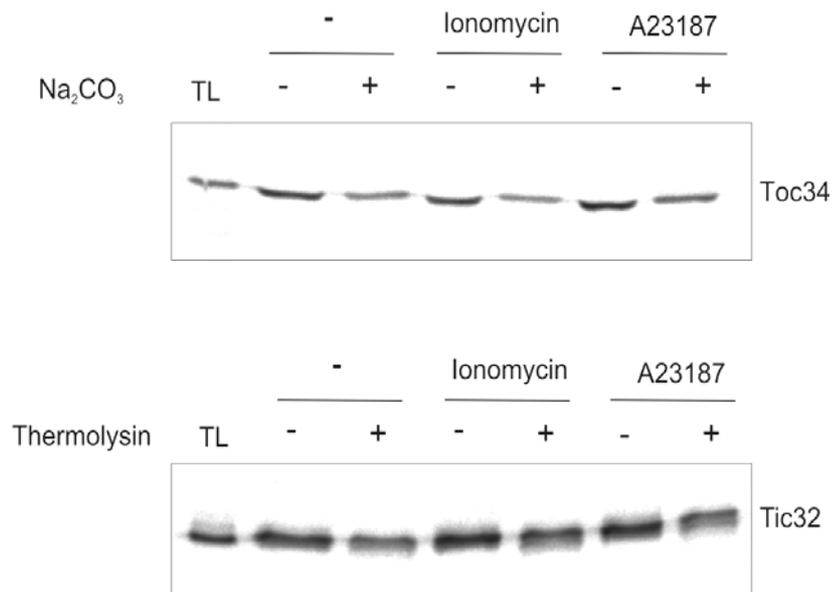


Abb. 11: Der Effekt von A23187 und Ionomycin auf den Import in Chloroplasten ist Vorstufenprotein-abhängig.

³⁵S-markiertes Translationsprodukt (TL: 10% des eingesetzten Translationsproduktes) von Tic32 und Toc34 wurden in Standardimportreaktionen (3 mM ATP, 25°C, 5 min) eingesetzt. Die Chloroplasten wurden zuvor mit 100 μ M A23187 oder 100 μ M Ionomycin für 20 min auf Eis behandelt. Nach der Importreaktion wurde die Hälfte jedes Ansatzes mit 0,1 M Na₂CO₃ bei pH 11,5 extrahiert (Toc34) bzw. mit Thermolysin behandelt (Tic32). Die Analyse der Proben erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie.

4.1.5. Die Calcium/Calmodulin-Regulation des Proteinimports findet am Tic-Komplex statt

Die Inhibierung des Imports von pSSU durch Ophiobolin A und die Calcium-Ionophore A23187 und Ionomycin zeigt sich nicht nur durch Abnahme von mSSU sondern auch durch die Akkumulierung des Importintermediates Tim4 (siehe Abb. 6 und Abb. 9). Die Bildung von Tim4 gibt Hinweise darauf, wo die Hemmung durch Ophiobolin A und die Calcium-Ionophore stattfindet. Tim4 entsteht durch den Thermolysinverdau, wenn pSSU partiell in den Translokationsapparat (Toc- und eventuell auch Tic-Komplex) gelangt ist, aber nicht vollständig ins Stroma translozieren kann (Waegemann und Soll, 1991,1996; Caliebe *et al.*, 1997). Um die Entstehung von Tim4 bei der Ophiobolin A- bzw. A23187- und Ionomycin-Hemmung besser einordnen zu können, wurde der Import von pSSU in Chloroplasten unter experimentellen Bedingungen nachvollzogen, bei denen die Translokation ins Stroma nicht vollständig ablaufen kann.

Der Import von Proteinen durch die Hüllmembranen der Chloroplasten ist ein Energie verbrauchender Prozess (Friedman und Keegstra, 1989; Olsen *et al.*, 1989). Je nach ATP-Bedarf kann der Proteinimport dabei in drei verschiedene Schritte aufgeteilt werden (Übersichtsartikel: Jarvis und Soll, 2001). Den ersten Schritt stellt die Bindung der Vorstufenproteine an den Toc-Komplex in der äußeren Hüllmembran der Chloroplasten dar, welcher keine ATP-Hydrolyse benötigt. Der zweite Schritt hingegen ist Energie-abhängig, benötigt jedoch nur geringe Mengen an ATP (< 100 μ M). Während dieses Schrittes gelangen die Vorstufenproteine durch den Toc-Komplex und stellen Kontakt mit Proteinen des Tic-Komplexes in der inneren Hüllmembran her. In Anwesenheit größerer Mengen an ATP (> 100 μ M ATP) werden die Vorstufenproteine vollständig durch den Toc- und Tic-Komplex importiert und gelangen somit ins Stroma. Eine solche ATP-Abhängigkeit des Proteinimports in Chloroplasten wurde für das Vorstufenprotein pSSU nach modifizierter Methode von Olsen und Mitarbeitern (1989) nachvollzogen (Abb. 12). Die Chloroplasten und das ³⁵S-markierte Translationsprodukt pSSU wurden, wie unter 3.13.5 beschrieben, behandelt, um internes ATP zu entfernen. Da die Import-Reaktion im Dunkeln durchgeführt wurde, ist die Reaktion somit ausschließlich von extern zugegebenem ATP abhängig. Dazu wurden ansteigende ATP-Konzentrationen (0-3 mM) zum Import-

Ansatz gegeben. Nach dem Import wurde die Hälfte des Reaktionsansatzes mit Thermolysin behandelt. In der Abwesenheit von ATP konnte nur eine schwache pSSU-Bande jedoch weder mSSU noch das Importintermediat Tim4 beobachtet werden (Abb. 12, Spur 1+2). Die Zugabe von 10 μ M ATP zum Importansatz hingegen führte zur Bildung von Tim4 (Abb. 12, Spur 4). Die Menge an Tim4 erreichte ihre Maximum bei 50-100 μ M ATP (Abb. 12, Spur 5-8). Bei diesen ATP-Konzentrationen konnte auch eine schwache Bande mSSUs nachgewiesen werden. Die Menge an mSSU nahm durch Zugabe höherer ATP-Konzentrationen weiter zu und erreichte das Maximum bei 1 mM ATP (Abb. 12, Spur 9-16). Parallel dazu verschwand Tim4 allmählich. Der Zeitpunkt des Erscheinens des Importintermediates Tim4 entspricht dem Translokationsschritt, in dem nur eine geringe Menge an ATP (< 100 μ M) benötigt wird. Während dieses Schrittes sind die Vorstufenproteine im Toc-Komplex inseriert und stellen Kontakt mit Proteinen des Tic-Komplexes her. Dies deutet darauf hin, dass Tim4 gebildet wird, wenn die Translokation von pSSU im Toc- bzw. Tic-Komplex verlangsamt ist.

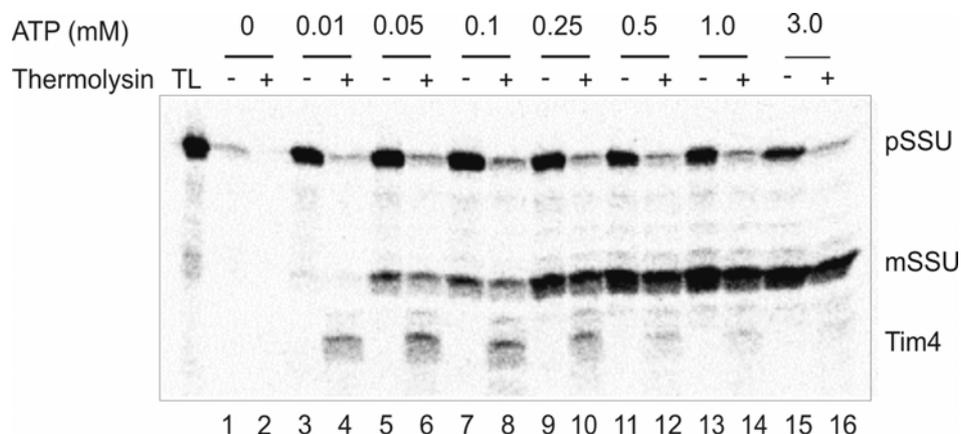


Abb. 12: Effekt von ATP auf den Import von pSSU in Chloroplasten

Die Importreaktion von 35 S-markiertem pSSU (TL: 10% des eingesetzten Translationsproduktes) wurde für 5min bei 25°C im Dunkeln mit den angegebenen ATP-Konzentrationen durchgeführt. Die Chloroplasten sowie das Translationsprodukt wurden, wie unter 3.13.5 beschrieben, vorbehandelt, um internes ATP zu entfernen. Anschließend wurden die Chloroplasten reisoliert und mit Thermolysin (+) behandelt. Die Proben wurden durch SDS-PAGE getrennt und einer Autoradiographie unterzogen. mSSU: mature Form, pSSU: Vorstufenprotein, Tim4: Translokationsintermediat.

Darüber hinaus wurde der Effekt von Diethylpyrocarbonate (DEPC) auf den Import von pSSU, wie bei Caliebe und Mitarbeitern beschrieben (1997), untersucht (Abb. 13). Zum Vergleich wurden in einem weiteren Ansatz die Chloroplasten mit Ophiobolin A vorbehandelt, bevor die Importreaktion gestartet wurde. Die Vorbehandlung der Chloroplasten sowohl mit DEPC als auch mit Ophiobolin A führte zur Hemmung des pSSU-Imports. Die Hemmung zeigte sich durch Abnahme des mSSUs und Bildung des Importintermediates Tim4. DEPC ist ein Reagenz, das den Import von Vorstufenproteinen in den Chloroplasten auf Höhe des Tic-Komplexes hemmt, indem es Tic55, eine Komponente des Tic-Komplexes, modifiziert (Caliebe *et al.*, 1997). Dass Ophiobolin A den gleichen Effekt wie DEPC auf den pSSU-Import aufweist, lässt darauf schließen, dass Ophiobolin A die Translokation der Proteine Translokation am Tic-Komplex unterbricht.

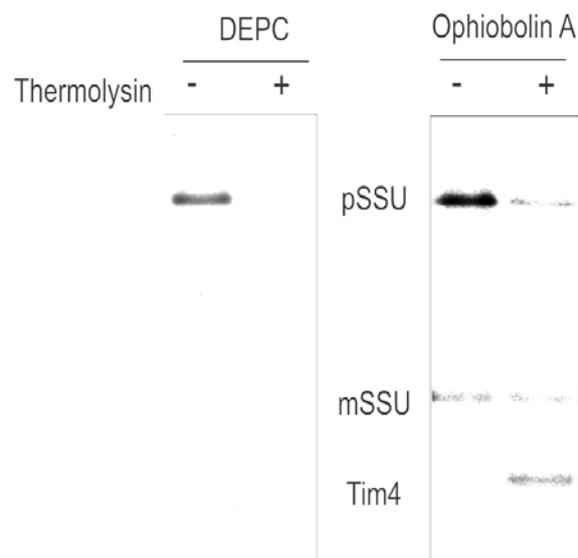


Abb. 13: Der Effekt von Ophiobolin A auf den pSSU-Import in Chloroplasten ähnelt dem von DEPC

Isolierte Chloroplasten (entsprechend 20 µg Chlorophyll) wurden mit 1mM DEPC oder 100 µM Ophiobolin A für 20 min bei 25°C inkubiert. Die anschließende Importreaktion vom ³⁵S-markierten pSSU erfolgte unter Standardbedingungen (3 mM ATP) für 5 min bei 25°C. Nach Reisolierung der Chloroplasten wurde die Hälfte der Reaktionsansätze mit Thermolysin behandelt. Die Proben wurden anschließend durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. mSSU: mature Form, pSSU: Vorstufenprotein, Tim4: Translokationsintermediat.

In einem weiteren Assay wurden die Chloroplasten mit A23187 oder Ionomycin vorbehandelt. Nach der Importreaktion wurden die Chloroplasten lysiert und in lösliche (Ü) und membrangebundene (P) Fraktion getrennt (Abb. 14). Das Ergebnis zeigte, dass ein signifikanter Anteil des bei der Behandlung mit den Ionophoren entstandene Translokationsintermediates Tim4 in der Membranfraktion zu finden ist. Dies entspricht dem Ergebnis von Waegemann und Soll (1993), die gezeigt haben, dass Tim4 mit der inneren Hüllmembran der Chloroplasten co-fraktioniert. Das bedeutet, dass pSSU unter diesen Bedingungen schon in den Tic-Komplex eingetreten ist, aber nicht weiter importiert werden kann.

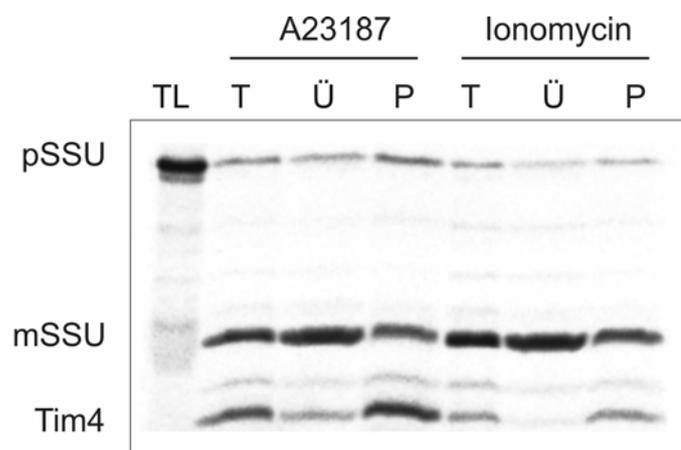


Abb. 14: Das Importintermediat Tim4 ist membranassoziiert

³⁵S-markiertes Translationsprodukt von pSSU (TL: 10% des eingesetzten Translationsproduktes) wurde in Standardimportreaktionen (3 mM ATP, 25°C, 5 min) eingesetzt. Die Chloroplasten wurden zuvor auf Eis für 20 min mit 100 µM A23187 oder 100 µM Ionomycin behandelt. Anschließend wurden die Chloroplasten mit Thermolysin behandelt und hypotonisch lysiert. Durch Ultrazentrifugation wurde der Ansatz (T) in membrangebundene (P) und lösliche (Ü) Fraktion getrennt. Die Analyse der Proben erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender Autographie. mSSU: mature Form, pSSU: Vorstufenprotein, Tim4: Translokationsintermediat.

Die in diesem Abschnitt gewonnenen Erkenntnisse deuten darauf hin, dass das Translokationsintermediat Tim4 gebildet wird, wenn pSSU schon im Tic-Komplex inseriert ist, jedoch nicht weiter ins Stroma importiert werden kann. Da die Hemmung des Proteinimports in Chloroplasten durch Ophiobolin A und die Calcium-Ionophore A23178 und Ionomycin durch die Bildung von Tim4 charakterisiert ist, ist davon auszugehen, dass der Effekt dieser Komponenten auf Höhe des Tic-Komplexes einsetzt.

4.2. Calcium/Calmodulin Regulation des Proteinimports wird durch Tic32 vermittelt

Im vorherigen Kapitel wurde gezeigt, dass der Proteinimport in Chloroplasten durch Calcium/Calmodulin reguliert ist und dass diese Regulation auf Höhe des Tic-Komplexes einsetzt. Daher stand es im weiteren Verlauf der Arbeit im Vordergrund, Proteine zu identifizieren, die mit Calmodulin an der inneren Hüllmembran der Chloroplasten interagieren und somit diese Regulation vermitteln können.

4.2.1. Identifizierung von Tic32 als Calmodulin-bindendes Protein an der inneren Hüllmembran des Chloroplasten

Innere Hüllmembranvesikel wurden, wie unter 3.7.2. beschrieben, mit Decylmaltosid solubilisiert und in Anwesenheit von Calcium mit Calmodulin-Agarose inkubiert. Nach dem Waschen wurden die gebundenen Proteine mit 20 μ M Calmodulin vom Säulenmaterial eluiert (Abb. 15, CaCl_2/CaM). Der Überschuss an Calmodulin verdrängt Proteine, welche spezifisch an die Calmodulin-Liganden, nicht aber unspezifisch an die Agarose-Matrix binden. Im Eluat konnte nach der Silberfärbung nur eine einzige spezifische Bande bei ca. 32 kDa (durch Sternchen markiert) identifiziert werden. Bei dem ca. 16 kDa großen Protein handelte es sich um das Calmodulin, welches für die Elution verwendet wurde. Die Sequenzierung des 32 kDa Proteins mittels Massenspektrometrie ergab drei verschiedene Peptide, die alle mit der Proteinsequenz von Tic32 aus Erbse (psTic32), einer Komponente des Tic-

Komplexes, übereinstimmen (Abb. 16). Dieses Resultat wurde durch Immundekoration mit einem Antiserum gegen Tic32 bestätigt (Abb. 15).

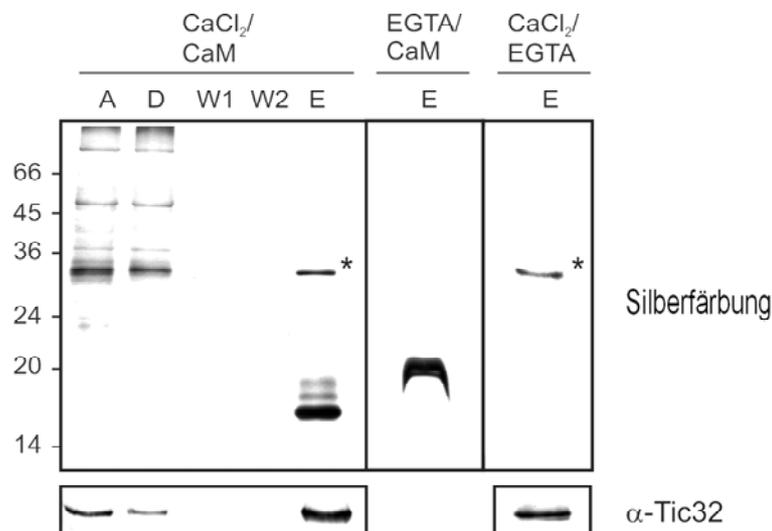


Abb. 15: Identifizierung von Tic32 als Calmodulin-bindendes Protein

Innere Hüllmembranvesikel von Erbsenchloroplasten (ca. 1 mg Protein) wurden mit Decylmaltosid solubilisiert und mit Calmodulin-Agarose in Anwesenheit (CaCl_2/CaM und $\text{CaCl}_2/\text{EGTA}$) oder Abwesenheit (EGTA/CaM) von Calcium inkubiert. Spezifisch gebundene Proteine wurden mit $20 \mu\text{M}$ Calmodulin (CaCl_2/CaM und EGTA/CaM) oder mit 5 mM EGTA ($\text{CaCl}_2/\text{EGTA}$) vom Säulenmaterial eluiert. A: Auftrag; D: Durchlauf; W1: Wasch mit Bindungspuffer; W2: Wasch mit 500 mM NaCl_2 in Bindungspuffer; E: Eluat. Auf der linken Seite der Abbildung sind Molekulargewichte des Proteingrößenstandards angegeben.

Um zu zeigen, ob Tic32 calciumabhängig oder calciumunabhängig an Calmodulin bindet, wurden zwei weitere Versuche durchgeführt, in denen Calcium durch EGTA, ein Calcium-Chelator, ersetzt wurde. In einem ersten Versuch wurde die gesamte Chromatographie an Calmodulin-Agarose in der Anwesenheit von EGTA anstatt von Calcium durchgeführt (Abb. 15, EGTA/CaM). Die Elution erfolgte auch hier mit $20 \mu\text{M}$ Calmodulin, aber in Bindungspuffer mit EGTA. Im Eluat konnte keine Bande bei 32 kDa beobachtet werden. Dies bedeutet, dass Tic32 in der Abwesenheit von Calcium nicht an die Calmodulin-Agarose bindet. Das Protein

bei ca. 20 kDa ist wiederum Calmodulin, welches für die Elution eingesetzt wurde. Der Größenunterschied erklärt sich dadurch, dass Calmodulin ein schnelleres Laufverhalten in SDS-Gelen in der Anwesenheit von Calcium aufweist (Burgess *et al.*, 1980).

MWPFSSKKGVSFGSGSSTAEQVTHGIDATGLTAIVTGASSGIGAETTRV
 LALRGAHVIMGVRNMVAAKDVKDTILKDIPSAKVDAIELDLSSLDVKK
 FASEFNSSGRPLNILINNAGIMACPFKLSKDNIELQFATNHIGHFLLTN
 LLLDTMKKTTRESKKEGRIVNVASEAHRFAYPEGIRFDKINDOSSYNW
 RAYGQSKLANVLHANQLTKHLKEDGVNITANSLHPGTIVTNLFRHNSAV
 NGLINVIGKLVKLVQQAATTCYVALHPQVKGVSGEYFSDSNVYKTP
 HGKDVDLAKKLWDFSINLVKQK

Abb. 16: Aminosäuresequenz von psTic32

Durch eine Massenspektrometrie des 32 kDa-Proteins (Abb. 15) identifizierte Peptide sind unterstrichen. Die schwarze Box kennzeichnet die potentielle Calmodulin-Bindungsdomäne und die grauen Boxen markieren die konservierten aktiven Zentren der „short chain“ Dehydrogenasen.

In einem zweiten Experiment wurde die Anbindung der Proteine an Calmodulin-Agarose in Anwesenheit von Calcium durchgeführt. Die Elution erfolgte jedoch mit 5 mM EGTA und ohne Zugabe von Calmodulin (Abb. 15, CaCl₂/EGTA). Die Analyse der Proben zeigte, dass die 32 kDa Bande (durch Sternchen gekennzeichnet) auch hier als einziges Protein von der Säule eluiert wurde. Die Immundekoration mit Antiserum gegen Tic32 bestätigte, dass das 32 kDa-Protein Tic32 darstellt. Dieses Ergebnis zeigt, dass durch Entfernen des Calciums die Bindung zwischen Calmodulin und Tic32 aufgebrochen wird und liefert so einen weiteren Beleg für die Calcium-Abhängigkeit der Interaktion.

4.2.2. Calmodulin bindet spezifisch an Tic32

Der Calmodulin-Bindungsassay ist eine weit verbreitete Methode, um Calmodulin-bindende Proteine in verschiedenen Organismen zu identifizieren. Daher wurde dieser Assay verwendet, um die Interaktion zwischen Calmodulin und psTic32 zu bestätigen (Abb. 17). Dazu wurde psTic32 heterolog in *E.coli* exprimiert, an Ni²⁺-NTA Agarose aufgereinigt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 17a, Coomassie). Als Kontrolle wurden verschiedene heterolog exprimierte Proteine wie Tic110, Vipp1, Toc64, OEC33, OEC23 und Alb4 eingesetzt.

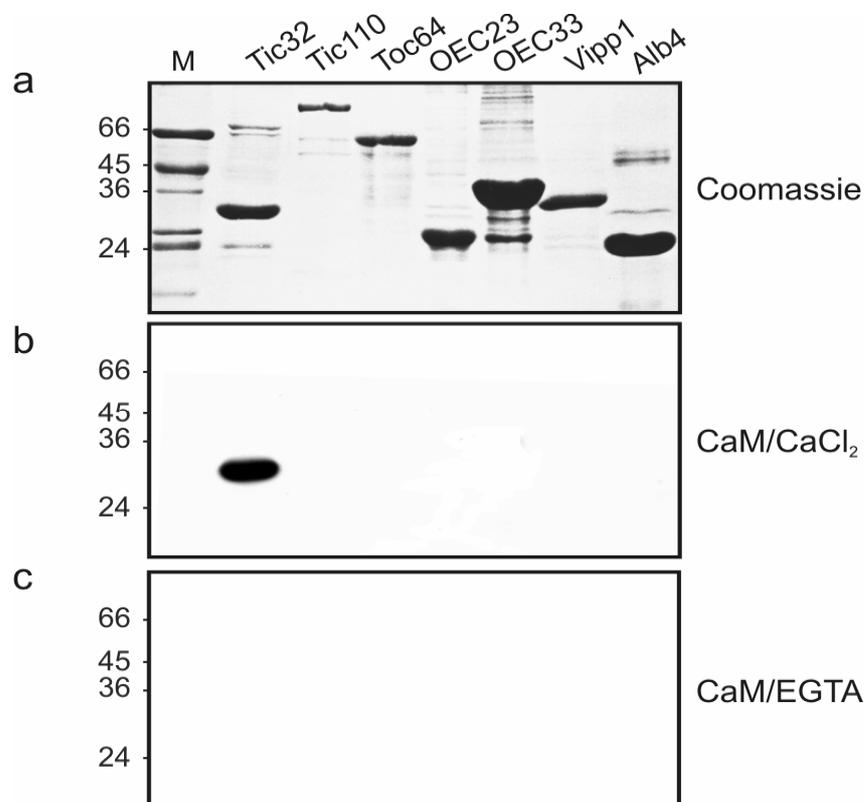


Abb.17: Calmodulin-Bindungsassay

Verschiedene Proteine wurden in *E.coli* heterolog exprimiert, an Ni²⁺-NTA Agarose aufgereinigt und für Calmodulin-Bindungsassays eingesetzt. **(a)** zeigt ein mit Coomassie gefärbtes SDS-Gel von den aufgereinigten Proteinen. Der Calmodulin-Bindungsassay wurde in Anwesenheit von Calcium **(b)** oder EGTA **(c)** durchgeführt. M: Proteingrößenstandard; Tic32, Tic110: Komponenten des Tic-Komplexes; Toc64: Komponente des Toc-Komplexes. OEC33, OEC23: Proteine des Thylakoidlumen; Alb4: integrales Thylakoidenprotein. Auf der linken Seite der Abbildung sind Molekulargewichte des Proteingrößenstandards angegeben.

Nach SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und wie unter 3.8 beschrieben renaturiert. Der Calmodulin-Bindungsassay erfolgte anschließend durch Inkubation der PVDF-Membran mit biotinyliertem Calmodulin in der Anwesenheit von 1 mM CaCl_2 (Abb. 17b, CaM/ CaCl_2). Das Ergebnis zeigte, dass das biotinylierte Calmodulin nur mit Tic32 interagiert. Diese Bindung ist calciumabhängig, da der Assay in der Anwesenheit von EGTA keine positive Reaktion zeigte (Abb. 17c, CaM/EGTA). Diese Ergebnisse bestätigen, dass psTic32 spezifisch und calciumabhängig mit Calmodulin interagiert.

4.2.3. Identifizierung der Calmodulin-Bindungsdomäne von Tic32

Um die Calmodulin-Bindungsdomäne in psTic32 zu identifizieren, wurden mehrere verkürzte Tic32-Konstrukte hergestellt (Abb. 18a), in *E.coli* heterolog exprimiert und aufgereinigt (Abb. 18b, Coomassie). Nach dem Transfer auf PVDF-Membran wurden die Proteine mittels Calmodulin-Bindungsassay in der Anwesenheit von Calcium untersucht (Abb. 18b, Calmodulin). Als Kontrolle wurde das vollständige psTic32 (T_{1-316}) eingesetzt, welches, wie bereits gezeigt wurde, an biotinyliertes Calmodulin bindet. Ein am N-Terminus auf etwa die Hälfte der Proteinsequenz verkürztes Konstrukt ($T_{155-316}$) zeigte ebenfalls eine positive Reaktion. Im Gegensatz dazu zeigten alle Konstrukte, die am C-Terminus verkürzt sind, keine Reaktion mit dem biotinylierten Calmodulin. Sogar das längste Konstrukt (T_{1-289}), in dem nur die letzten 26 Aminosäuren fehlten, reagierte nicht mit Calmodulin. Dies legt nahe, dass die Region zwischen den Aminosäuren 290 und 316 die Calmodulin-Bindungsdomäne in psTic32 enthält.

Die meisten Calmodulin-Bindeproteine besitzen eine charakteristische Domäne, an welche Calmodulin anbindet. Diese Domäne besteht in der Regel aus ca. 20 Aminosäuren und bildet eine basische amphipathische Helix mit einer hydrophoben und einer hydrophilen Seite (O'Neil und DeGardo, 1990; James et al., 1995; Wang *et al.*, 2004).

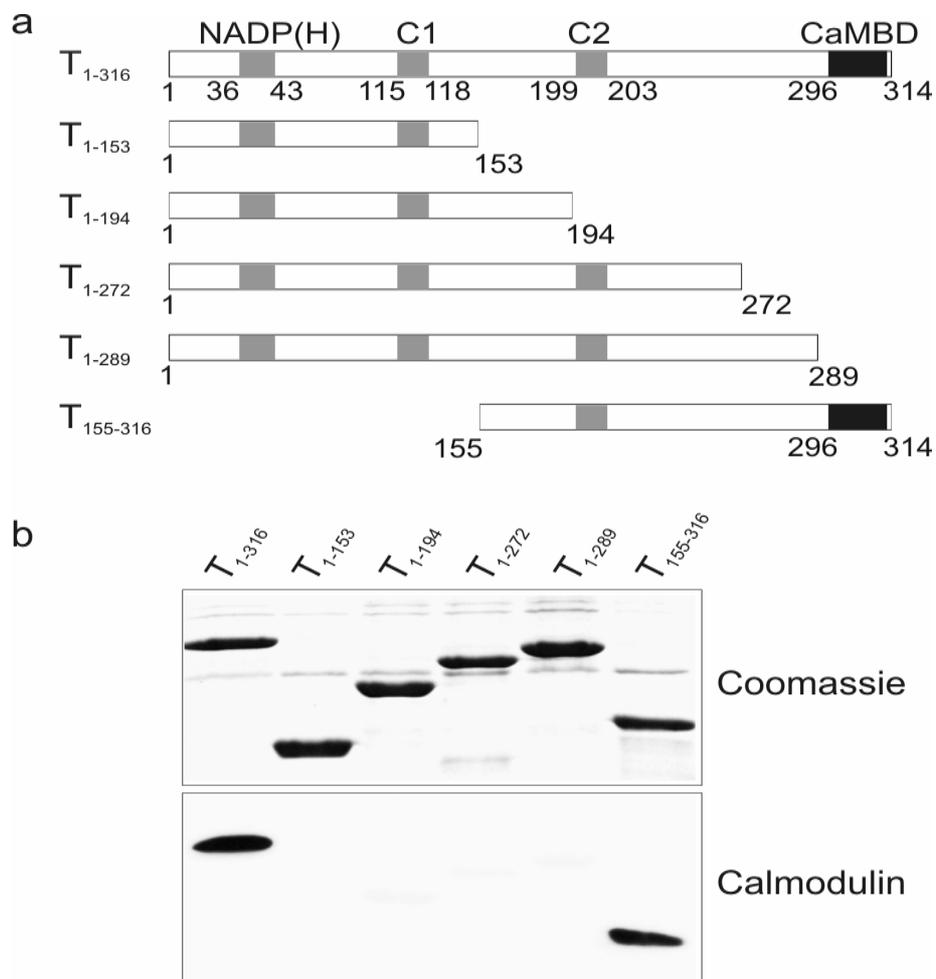


Abb. 18: Identifizierung der Calmodulin-Bindungsdomäne in Tic32

(a) Schematische Darstellung der verschiedenen verkürzten Konstrukte von psTic32. Die NADPH-Bindungsstelle [NADP(H)] und die konservierten aktiven Zentren der „short chain“ Dehydrogenasen (C1 und C2) sind mit grauen Boxen markiert. Die schwarze Box markiert die potentielle Calmodulin-Bindungsdomäne (CaMBD). Die Zahlen an den Sequenzblöcken geben die Positionen der Aminosäure an, orientiert an der Gesamtlänge von psTic32 (T₁₋₃₁₆). **(b)** Alle Konstrukte wurden in *E.coli* exprimiert und an Ni²⁺-NTA Agarose aufgereinigt. Gleiche Menge aufgereinigte Proteine (ca. 3 µg) wurde durch SDS-PAGE getrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt (Coomassie) oder für Calmodulin-Bindungsassay verwendet (Calmodulin). Der Bindungsassay wurde in Anwesenheit von Calcium durchgeführt.

Eine genauere Analyse des Proteinsequenzabschnitts zwischen den Aminosäuren 290 und 316 von psTic32 zeigte, dass der Bereich von Leucin²⁹⁶ bis Leucin³¹⁴ eine amphipatische Helix mit einer Nettoladung +1 bilden kann (Abb. 19a). Dies legt nahe, dass dieser Bereich die potentielle Calmodulin-Bindungsdomäne darstellt. Calmodulin-Bindungsdomänen zeichnen sich nicht nur durch die Bildung einer basischen amphipathischen Helix aus, sondern es konnte durch Vergleichsanalyse der Calmodulin-Bindungsdomäne vieler bekannter Calmodulin-Bindeproteine auch gezeigt werden, dass diese Domänen durch verschiedene Motive charakterisiert sind (http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/pub_pages/search/index.htm).

Manche dieser Motive, wie z.B. das sogenannte IQ-Motiv, wurden ausschließlich in Proteinen identifiziert, die unabhängig von Calcium an Calmodulin binden. Andere Motive hingegen stehen für die calciumabhängige Bindung an Calmodulin und werden beispielsweise 1-10-, 1-12- oder 1-14-Motiv genannt. Die Zahlen stehen für die Position der konservierten, hydrophoben Aminosäuren in der Sequenz der Calmodulin-Bindungsdomäne. Für die Calmodulin-Bindungsdomäne von psTic32 können mindestens drei potentielle calciumabhängige Calmodulin-Bindemotive zugeordnet werden (Abb. 19b).

Soweit bekannt, konnten bisher nur zwei Homologe zu Tic32 aus Erbse (psTic32, AAS38575) eindeutig identifiziert werden, nämlich eines in *Arabidopsis thaliana* (atTic32, At4g23430) und ein anderes in *Oryza sativa* (osTic32, AAX96188), (Hörmann *et al.*, 2004). Der Sequenzvergleich zwischen der Calmodulin-Bindungsdomäne in psTic32 (296-314-Bereich) und der entsprechenden Region in atTic32 und osTic32 zeigt eine hohe Homologie (Abb. 20). Darüber hinaus könnte gezeigt werden, dass das 1-12-Motiv, welches für die calciumabhängige Bindung an Calmodulin steht, in allen drei Tic32-Homologen vorkommt (Abb. 20).

Aus diesen Kenntnissen lässt sich schließen, dass alle bekannten Tic32 Protein eine potentielle Calmodulin-Bindestelle in ihrem C-Terminus aufweisen und dass sie calciumabhängig mit Calmodulin interagieren.

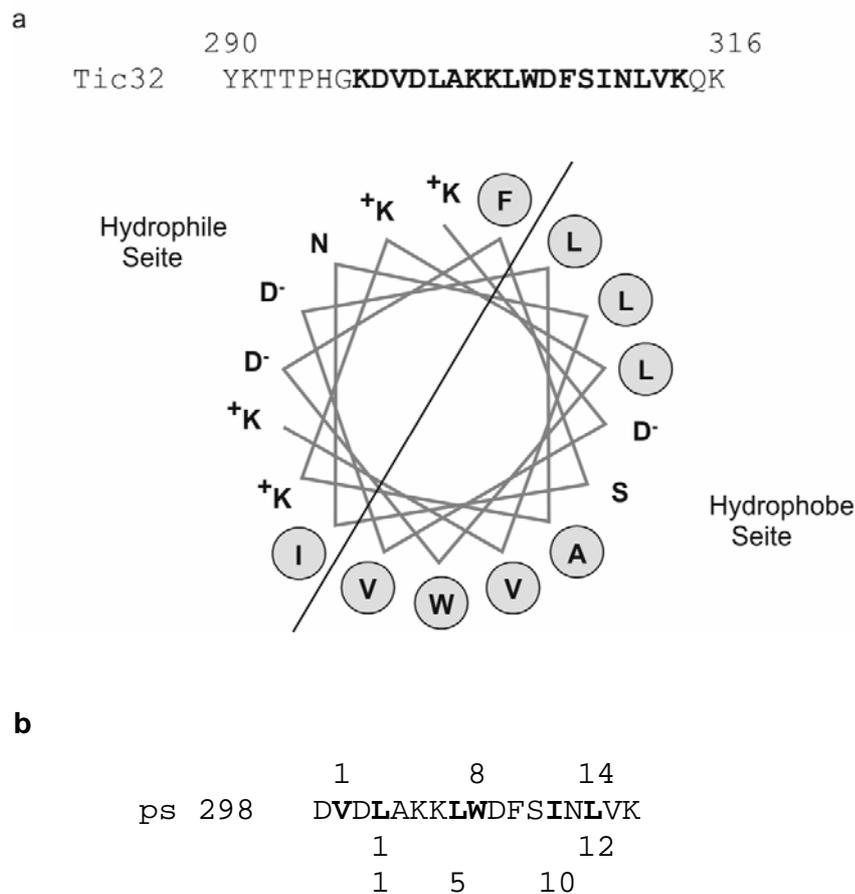


Abb. 19: Analyse der Calmodulin-Bindungsdomäne von psTic32

(a) Die letzten 26 Aminosäuren am C-Terminus von psTic32 sind oben gezeigt. Die Calmodulin-Bindungsdomäne entsprechend des Sequenzabschnitts zwischen den Aminosäuren 296 und 314 sind in fetten Buchstaben dargestellt. Die helikale Darstellung der Calmodulin-Bindungsdomäne (untere Abbildungsteil) wurde mit Hilfe des Programms „<http://cti.itc.virginia.edu/~cmg/Demo/wheel/wheelApp.html>“ erstellt. Die hydrophoben Aminosäuren sind mit grauen Zirkeln, die positiv und negativ geladenen Aminosäuren sind mit (+) bzw. (-) gekennzeichnet. **(b)** Die potentiellen Calmodulin-Bindungsmotive in psTic32. Die Zahlen, nach denen die Motive benannt werden, markieren die Position der hydrophoben Aminosäuren innerhalb der Sequenz.

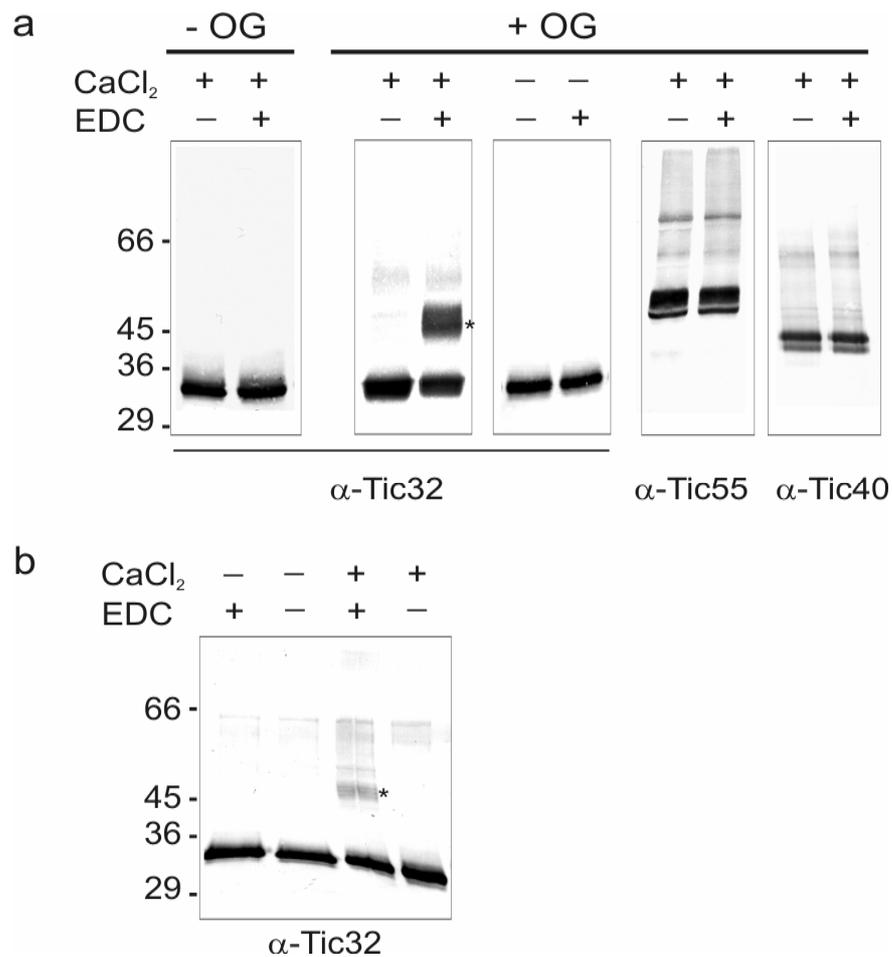


Abb. 21: Quervernetzungsexperimente mit inneren Hüllmembranen der Chloroplasten

(a) Innere Hüllmembranvesikel aus Erbsenchloroplasten (ca. 10 μ g Protein) wurden für 60 min bei 4°C mit Calmodulin in der Anwesenheit (+OG) oder Abwesenheit (-OG) von N-Octylglucosid inkubiert. Die Reaktionen wurden entweder mit 0,1 mM CaCl₂ (+CaCl₂) oder mit 5 mM EGTA und EDTA (-CaCl₂) durchgeführt. Danach wurden die Vesikel mit dem Quervernetzungsreagenz EDC für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und nach Transfer auf Nitrozellulosemembran mit Antiserum gegen Tic32, Tic55 und Tic40 immundekoriert. **(b)** Die Quervernetzungsexperimente wurden in der Anwesenheit von N-Octylglucosid wie in (a) durchgeführt, jedoch ohne Zugabe von externem Calmodulin. Auf der linken Seite beider Abbildungen sind die Molekulargewichte des Proteingrößenstandards angegeben. Quervernetzungsprodukte sind durch Sternchen (*) markiert

In unbehandelten inneren Hüllmembranvesikeln konnte sowohl vor als auch nach Zugabe von Calmodulin nur eine einzige Bande bei ca. 32 kDa immundekoriert werden (Abb. 21a, -OG). Diese Bande stellt das Tic32 selbst dar. Im Gegensatz dazu tauchte in mit OG solubilisierten inneren Hüllmembranvesikeln neben Tic32 noch eine zusätzliche Bande bei ca. 48 kDa auf, wenn externes Calmodulin zum Reaktionsansatz gegeben wurde (Abb. 21a, +OG). Der Größe nach entspricht diese Bande dem Quervernetzungsprodukt zwischen Calmodulin und Tic32. Die Bildung dieses 48 kDa-Komplexes ist calciumabhängig, da beim Ersatz des Calciums durch EGTA kein Quervernetzungsprodukt zu beobachten war (Abb. 21a, +OG). Als Kontrolle wurde die Quervernetzungsreaktion mittels Antisera gegen Tic55 und Tic40 analysiert (Abb. 21a, +OG). Für beide Proteine konnte kein Quervernetzungsprodukt mit Calmodulin identifiziert werden. Dies ist ein zusätzlicher Hinweis, dass die Bindung zwischen Calmodulin und Tic32 spezifisch ist.

Darüber hinaus wurden die Quervernetzungsexperimente ohne Zugabe von externem Calmodulin durchgeführt und anschließend durch Immundekoration mit Antiserum gegen Tic32 analysiert. Wiederum konnte eine wenn auch nur schwache Bande bei einem Molekulargewicht von ca. 48 kDa nur in der Anwesenheit von EDC und Calcium identifiziert werden (Abb. 21b). Die Größe dieses Quervernetzungsproduktes entspricht der des Tic32/Calmodulin-Komplexes (Vergleich siehe Abb. 21a, +OG). Diese Ergebnisse gaben einen ersten Hinweis darauf, dass die isolierten inneren Hüllmembranvesikel der Chloroplasten endogenes Calmodulin enthalten, welches mit Tic32 assoziiert ist.

4.2.5. Der Effekt von NADPH auf die Calmodulin-Bindung an Tic32

Aufgrund der Aminosäuresequenz gehört Tic32 zur Familie der sogenannten „short chain„ Dehydrogenasen (SDR's) (Hörmann *et al.*, 2004). Tic32 enthält die folgenden für SDR's-typischen, konservierten Motive: eine NAD(P⁺)H Bindungsstelle nahe dem N-Terminus, ein NNAG-Motiv als Stabilisator des zentralen β -Faltblattes (C1) und das aktive Zentrum YXXXG (C2) (schematische

Darstellung in Abb. 22). Inzwischen konnte auch gezeigt werden, dass Tic32 eine NADPH-abhängige Dehydrogenaseaktivität aufweist (Chigri *et al.*, 2006). Da die Wirkung von Calmodulin auf den chloroplastidären Proteinimport durch Bindung an Tic32 erfolgt, wurde untersucht, ob Calmodulin die Dehydrogenaseaktivität von Tic32 beeinflusst. Das Ergebnis dieser Untersuchungen zeigte, dass die Zugabe von Calmodulin die Dehydrogenaseaktivität von Tic32 hemmt (in Zusammenarbeit mit F. Hörmann).

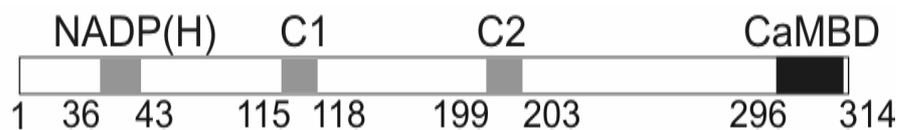


Abb. 22: Schematische Darstellung der Primärstruktur von psTic32

Die NADPH-Bindungsstelle (NADP(H)) und die konservierten aktiven Zentren der Dehydrogenase (C1 und C2) sind mit grauen Boxen gekennzeichnet. Die schwarze Box zeigt die in dieser Arbeit identifizierte potentielle Calmodulin-Bindungsdomäne (CaMBD). Die Zahlen unterhalb der Darstellung geben die Positionen der Aminosäuren an.

Es stellt sich nun die Frage, wie Calmodulin Einfluss auf die Aktivität von Tic32 nimmt. Die potentielle Bindungsstelle von Calmodulin überlappt nicht direkt mit den katalytischen Zentren der Dehydrogenase (Abb. 22). Dennoch könnte die Hemmung der Dehydrogenaseaktivität darauf zurückgeführt werden, dass innerhalb der dreidimensionalen Struktur von Tic32 Calmodulin die Bindung von NADPH sterisch hindert. Zum anderen könnte die Bindung von Calmodulin zu Änderungen in der Konformation von Tic32 führen, sodass es unzugänglich für NADPH wird.

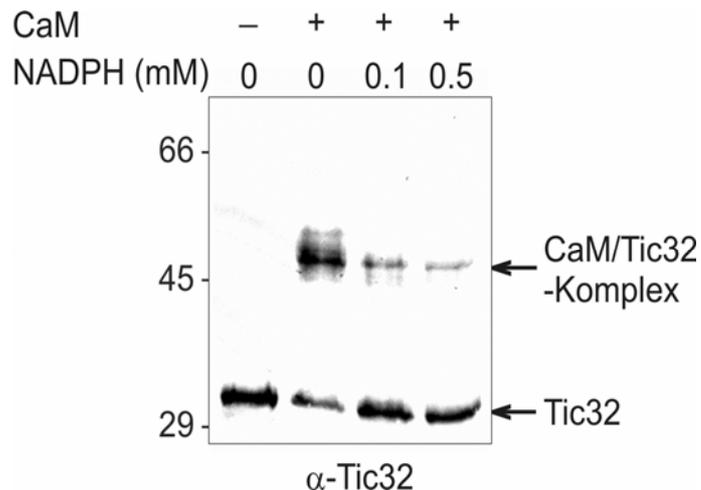


Abb. 23: NADPH verhindert die Calmodulin-Bindung an Tic32

Innere Hüllmembranvesikel aus Erbsenchloroplasten (10 μ g Protein) wurden für 20 min bei 4°C mit ansteigenden Konzentrationen von NADPH in der Anwesenheit von N-Octylglucosid und 0,1 mM CaCl_2 inkubiert. Nach Zugabe von 5 μ M Calmodulin wurden die Vesikel für 40 min bei 4°C weiter inkubiert. Die Quervernetzungsreaktion erfolgte anschließend mit EDC für 30 min bei Raumtemperatur. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Immundekoration mit Antiserum gegen Tic32 analysiert. Quervernetzungsprodukte (CaM/Tic32-Komplex) und Tic32 sind durch Pfeile markiert. Auf der linken Seite der Abbildung sind die Molekulargewichte des Proteingrößenstandards angegeben.

Ob NADPH seinerseits die Calmodulin-Bindung an Tic32 beeinflusst wurde durch Quervernetzungsexperimente überprüft. Dazu wurden innere Hüllmembranvesikel mit N-Octylglucosid in der Abwesenheit oder Anwesenheit von NADPH solubilisiert. Nach Zugabe von 5 μ M exogenen Calmodulins wurde die Quervernetzungsreaktion mittels EDC durchgeführt (Abb. 23). Die Proben wurden nach SDS-PAGE mittels Immundekoration mit einem Antiserum gegen Tic32 analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Menge des 48 kDa-Quervernetzungsproduktes zwischen Calmodulin und Tic32 (CaM/Tic32-Komplex) abnahm, wenn NADPH im Reaktionsansatz eingesetzt wurde. Dieser Effekt wurde mit steigenden NADPH-Konzentrationen immer deutlicher. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich Calmodulin und NADPH bei ihrer Bindung an Tic32 gegenseitig ausschließen.

4.2.6. Der Effekt von NADPH auf die Interaktion zwischen Tic32 und Tic110

Tic32 ist ein integrales Protein der inneren Hüllmembran der Chloroplasten (Hörmann *et al.*, 2004). Seine Zugehörigkeit zum Tic-Komplex wurde über seine Interaktion mit Tic110 identifiziert. Darüber hinaus wurde in den bisherigen Versuchen gezeigt, dass Tic32 eine Bindungsstelle sowohl für Calmodulin als auch für NADPH besitzt (Abb. 22). Obwohl die zwei Bindungsstellen räumlich voneinander getrennt sind, kann Tic32 jeweils nur eins von beiden Molekülen binden (4.2.5). In weiterführenden Experimenten stand es im Vordergrund, die Bedeutung dieser Bindungen für die Interaktion zwischen Tic32 und Tic110 aufzuklären. Die Co-Immunopräzipitation ist eine weit verbreitete Methode, um die Interaktion zwischen Proteinen zu untersuchen. Daher wurden Co-Immunopräzipitationsexperimente, wie unter 3.9 beschrieben, mit inneren Hüllmembranvesikeln der Chloroplasten in der Anwesenheit von NADPH, NADP oder NADH durchgeführt. Die Co-Immunopräzipitation erfolgte mit einem Antiserum gegen Tic110. Die Proben wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Immundekoration analysiert (Abb. 24). Die Zugabe von NADPH zum Reaktionsansatz führte zum fast vollständigen Wegfall der Interaktion zwischen Tic32 und Tic110. Währenddessen zeigten NADP bzw. NADH so gut wie keinen Effekt auf diese Interaktion. Darüber hinaus zeigte die Analyse der Co-Immunopräzipitation mit Antisera gegen andere Komponenten des Tic-Komplexes, dass sowohl Tic62 als auch Tic40 das gleiche Verhalten wie Tic32 aufweisen (Abb. 24). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass NADPH die Assemblierung des Tic-Komplexes beeinträchtigt. Tic32 könnte dabei als Überträger des Effektes fungieren, da es in der Lage ist, NADPH zu binden. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass andere Komponenten des Tic-Komplexes (z.B. Tic62) bzw. der inneren Hüllmembran, die ebenfalls NADPH binden können, diesen Effekt vermitteln.

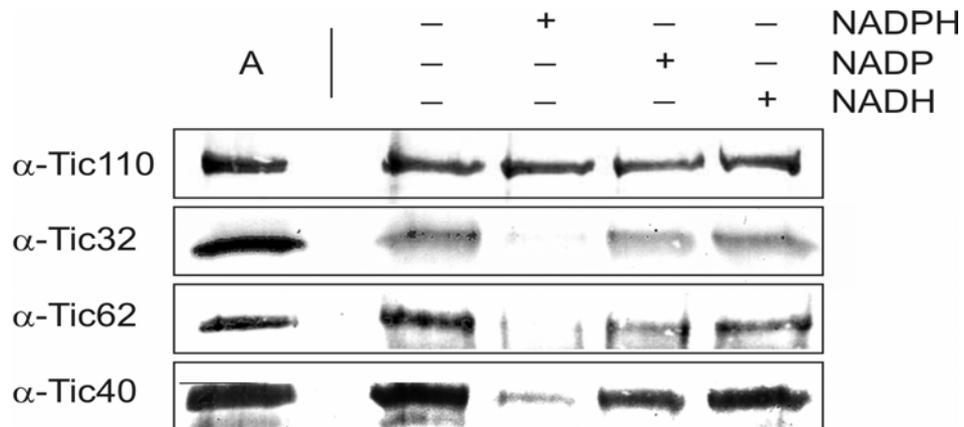


Abb. 24: Co-Immunopräzipitation des Tic-Komplexes

Innere Hüllmembranvesikel aus Chloroplasten (ca. 20 μ g Protein) wurden nach Solubilisierung mit 1% N-Octylglucosid für 60 min bei 4°C mit 500 μ M NADPH, NADP oder NADH inkubiert. Die Co-Immunopräzipitation wurde mit einem Antiserum gegen Tic110 durchgeführt. Die Analyse der Proben erfolgte anschließend mittels SDS-PAGE und Immundekoration mit Antiserum gegen Tic110, Tic32, Tic62 und Tic40. A: 1/20 des Auftrags.

4.3. Identifizierung von chloroplastidären Calmodulin

4.3.1. Datenbanksuche nach potentiell im Chloroplasten lokalisierten Calmodulinen

Nachdem gezeigt wurde, dass Calmodulin den Proteinimport reguliert, sollte im weiteren Verlauf der Arbeit versucht werden, Calmodulin im Chloroplasten zu identifizieren. Datensuchläufe (BLASTP) mit der Aminosäuresequenz „klassischer“ Calmoduline ergaben mehr als 30 Calmodulin-ähnliche Proteine in *Arabidopsis*. Der Sequenzvergleich dieser Proteine mit bekannten Calmodulinen aus dem Cytosol von *Arabidopsis*- bzw. menschlichen Zellen zeigte allerdings, dass nur neun von ihnen im Vergleich zu klassischen Calmodulin eine N-terminale Extension besitzen (Abb. 25). Diese Extension könnte eine N-terminale Präsequenz darstellen, die zum Import in Chloroplasten, Mitochondrien oder anderen Organellen verwendet wird. Eine Analyse mittels des Programmes „TargetP“ sagte vorher, dass fünf, cal2-cal6, von den neun Calmodulin-ähnlichen Proteinen eventuell in den Chloroplasten importiert werden (Tabelle 3). Um diese

Vorhersagen zu prüfen, wurden transiente Transformationen von Protoplasten mit den Calmodulin-ähnlichen Proteinen durchgeführt, die mit einer potentiellen chloroplastidären N-terminalen Präsequenz versehen sind (cal2-cal6). Als Kontrolle wurden drei weitere Calmodulin-ähnlichen Proteine, cal1, cal7 und cal9, eingesetzt, die nach Vorhersagen des TargetP-Programms nicht in Chloroplasten importiert werden. Die Beobachtungen mittels des Fluoreszenzmikroskops ergaben, dass keines dieser Proteine einen Signal im Chloroplasten zeigte, was dann eine chloroplastidäre Lokalisierung zwar nicht ausschließt, jedoch unwahrscheinlich machte (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis wurde auch durch Importexperimente in Chloroplasten bestätigt (Daten nicht gezeigt).

```

At 1g76640      1  ----- MKNTQRQLSSSF
At 1g76650      1  ----- MKNNTQPQSSFKKLCRKLSPKREDSAGEIQCHN
At 5g42380      1  ----- MTLAKNQKSSLSRLYKKVSSKRSESSRNLEDESRTSSNS
At 2g41110      1  ----- ----- MA
HS              1  ----- ----- MA
At 2g43290      1  ----- MVRIFLLYNI LNSFLLSLVPKCLRFLFPLSWFDKTLHKNSPPSPSTMLPSPSSSS
At 3g59440      1  ----- MVRVFLLYNLFNSFLLCLVPKCLRFFVFPSPWYIDDKNPPPP
At 2g41410      1  MKLAASLNRLSPKRLFRFKSKASVSRSEPSFSSNASSSSSDGSYGNLKQGPATPI SVL
At 3g10190      1  MKLAKLI PKRFFI RSKDRSTVSKSPTAFSFGSASSSSGQDCKNSGGDGGGGSVPTSI LP
At 2g15680      1  ----- MSNVSFLELQYKLSKNKMLRKPSRMFSRDRQSSGLSSPGP
At 3g50770      1  ----- MATQKEKPSNSNFKWFSTKTLKLNLSFNRRRSPKNSNSTLNSPRNSDDNNN

At 1g76640      13  MKFLEEKNRDL EAVFAYMDANRDGRI SAEELKKSFKTLG- EQMSDEEAEAAVKLSLIDGD
At 1g76650      34  SNGEDKNRELEAVFSYMDANRDGRI SPEELCKSFMTLG- EQLSDEEAVAAVRSLDIDGD
At 5g42380      40  SGSSSLNVNELRTVFDYMDANSDGKI SGFELQSCVSLLG- GALSSREVEEVVKTSDVDGD
At 2g41110      3   DQLTDDQI SEFKEAFSLFDKDGDCITTKELGTVMRSLG- QNPTEAELQDMI NEVDADGN
HS              3   DQLTEEQI AEFKEAFSLFDKDGDCITTKELGTVMRSLG- QNPTEAELQDMI NEVDADGN
At 2g43290      56  APTKRI DPSELKRVFQVFDKNGDGRITKEELNDSLENLGI- IYIPDKDLTQMI HKIDANGD
At 3g59440      42  DESETESPVDLKRVFQVFDKNGDGRITKEELNDSLENLGI- IFMPDKDLIQMI QKMDANGD
At 2g41410      61  PQNSGDFYTELVQAFKLI DRDDDCGVVSRGDLAALI SRLSHEPPSQEEVSLMLREVDGGDG
At 3g10190      61  EVSPYSYVEILQAFKLI DRDNDGAVSRHDL ESLLSRLCPDPLTEEEI NVMLKEVDCDGD
At 2g15680      41  GGFSPSVNEMRRVFSRFDLKDGGKISQTEYKVVLRALG- QERAI EDVPKI FKAVDLDCD
At 3g50770      55  IKSHQASKEELRQVESHFDSDGDGKISAFELRHYFGSVC- EYISHEAAQEAINEVDTDAD

```

Abb. 25: Sequenzvergleich von potentiellen chloroplastidären Calmodulinen

Vergleich der Aminosäuresequenz des cytosolischen Calmodulins aus *Arabidopsis thaliana* (At2g41110) und *Homo sapiens* Zelle (HS) mit anderen Calmodulinen zeigte, dass *Arabidopsis* neun Calmodulin-ähnliche Proteine mit einer N-terminalen Extension besitzt. Der Sequenzvergleich erfolgte mittels des Programms ClustalW (Jeanmougin *et al.*, 1998). Identische Aminosäuren sind schwarz, homologe Aminosäuren sind grau unterlegt.

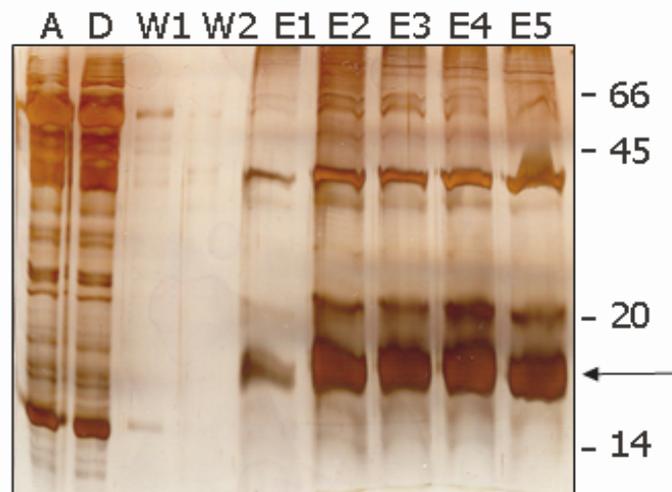
Tab. 3: Liste mit Calmodulinen und Calmodulin-ähnlichen Proteinen aus *Arabidopsis thaliana* (cal), die eine potentielle N-terminale Präsequenz besitzen. Das Programm TargetP (www.cbs.dtu.dk/services/TargetP) wurde verwendet, um die intrazelluläre Lokalisierung der Proteine vorherzusagen. Als Kontrolle wurde das cytosolische Calmodulin (At2g41110) genommen. AS: Aminosäure; Chl: Chloroplast; Mit: Mitochondrien; Sec: Sekretionsweg.

Gene	TargetP	Länge (AS)	Präsequenz (AS)
At3g10190 (cal1)	Mit	209	19
At2g41410 (cal2)	Chl	216	73
At3g50770 (cal3)	Chl	205	46
At2g15680 (cal4)	Chl	187	57
At1g76650 (cal5)	Chl	177	22
At5g42380 (cal6)	Chl	185	18
At2g43290 (cal7)	Sec	218	52
At5g44460 (cal9)	Mit	181	21
At2g41110	-	149	-

4.3.2. Affinitätschromatographie an Fluphenazin-Sepahrose

Darüber hinaus wurde in einem weiteren Ansatz versucht, Calmodulin aus Chloroplasten aufzureinigen. Dabei wurde eine Affinitätschromatographie an Fluphenazin-Sepahrose mit verschiedenen Sub-Fractionen des Chloroplasten durchgeführt (3.7.3). Fluphenazin ist ein spezifischer Inhibitor von Calmodulin, welcher die Interaktion von Calmodulin mit vielen seiner Bindeproteine hemmt (Charbonneau und Cormier, 1979). Die Chromatographie an Fluphenazin-Sepahrose erfolgte in der Anwesenheit von Calcium, da Fluphenazin calciumabhängig an Calmodulin bindet. Die gebundenen Proteine wurden mit 5 mM EGTA vom Säulenmaterial eluiert. Die Eluate wurden anschließend lyophilisiert, in SDS-Solubilisierungspuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert (Abb. 26a).

a



b

At1g76550_	GEDCITPRSLKMNLLK	LGE	SRT	-	TD	DCRVMISAFKLNA
At5g42380_	GEEFITAASLRRTLSR	LGE	SCT	-	VD	ACKVMIRGFDQND
At3g50770_	GSGCITPKGLQKNLVR	LGE	SRT	YOE	-	CEAMIKFYDIDC
At2g15680_	GDKISAEVMSVLWKL	LGE	RCS	LL	ED	CNRMVRAVDADG
sequenz	-----	LGE	AYS	LLDK	-----	

Abb. 26: Calmodulin-Aufreinigung aus den Chloroplasten

(a) Die Affinitätschromatographie an Fluphenazin-Sepharose wurde, wie unter 3.7.3 beschrieben, mit Stroma von Erbsenchloroplasten durchgeführt. Nach dem Wasch erfolgte die Elution mit 5 mM EGTA. Die Eluate wurden lyophilisiert und in Probenpuffer aufgenommen. Die Analyse der verschiedenen Fraktionen erfolgte mittels SDS-PAGE und Silberfärbung. A: Auftrag; D: Durchlauf; W1: Wasch mit Bindungspuffer; W2: Wasch mit 500 mM NaCl in Bindungspuffer. E1-E5: Eluate. Der Pfeil markiert die Bande, die sequenziert wurde (b, Sequenz). Auf der rechten Seite der Abbildung sind die Molekulargewichte des Proteingrößenstandards angegeben. (b) Sequenzvergleich des in (a) erhaltenen Peptids (Sequenz) mit Calmodulin-ähnlichen Proteinen aus *Arabidopsis thaliana*. Identische Aminosäuren sind schwarz, homologe Aminosäuren sind grau unterlegt.

Wurde die Aufreinigung mit Stroma von Erbse durchgeführt, konnten im Eluat mehrere Banden identifiziert werden. Die Proteinbande bei ca. 16 kDa (mit einem Pfeil markiert), die der Größe von Calmodulin entspricht, wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie analysiert. Das Ergebnis ergab mehrere Peptide, die alle mit der Proteinsequenz eines ribosomalen Proteins übereinstimmen. Darüber hinaus wurde jedoch noch ein weiteres Peptid aus 11 Aminosäuren (MLGEAYSLLDK) identifiziert. Ein Sequenzvergleich zeigte, dass dieses Peptid eine hohe Homologie zu mehreren Calmodulinen, insbesondere zu einem Calmodulin-ähnlichen Protein aus *Arabidopsis* aufweist, welches eine potentielle chloroplastidäre N-terminale Präsequenz besitzt (Abb. 26b). Ob dieses Peptid tatsächlich zu einem Calmodulin gehört, muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

4.3. Effekt von Ophiobolin A auf die *in vitro* Phosphorylierung der inneren Chloroplastenhüllmembran

Die von Calmodulin gebundenen Zielproteine sind äußerst vielfältig und auf alle Bereiche der zellulären Steuervorgänge verteilt (James *et al.*, 1995; Yang und Poovaiah, 2003). Zu diesen Zielproteinen zählen u.a. Proteinkinasen sowie Proteinphosphatasen. Durch Bindung an Calmodulin werden diese Proteine aktiv und sind dann in der Lage ihre Substrate zu phosphorylieren bzw. zu dephosphorylieren. Daher es ist nicht auszuschließen, dass die Calmodulin-Regulation des Proteinimports in Chloroplasten eventuell durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung vermittelt wird. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden Phosphorylierungsexperimente mit verschiedenen Subfraktionen des Chloroplasts in Anwesenheit des Calmodulin-Inhibitors Ophiobolin A durchgeführt (Abb. 27). Dazu wurden isolierte äußere und innere Hüllmembranvesikel sowie gesamte Chloroplasten aus Erbse in Anwesenheit oder Abwesenheit von 150 μM Ophiobolin A in Reaktionspuffer für 25 min vorinkubiert, bevor die Phosphorylierungsreaktion durch Zugabe von $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP gestartet wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von SDS-Solubilisierungspuffer gestoppt und mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Im Fall ganzer Chloroplasten bleibt das Phosphorylierungsmuster mit oder ohne Zugabe von Ophiobolin A zum

Reaktionsansatz gleich (Abb. 27, Chl). In gesamten Chloroplasten sind stromale und thylakoidäre Proteine dominanter als die der Hüllmembranen. Das unveränderte Reaktionsmuster lässt darauf schließen, dass Calmodulin keinen Effekt auf die Kinasen bzw. Phosphatasen des Stroma und der Thylakoide hat.

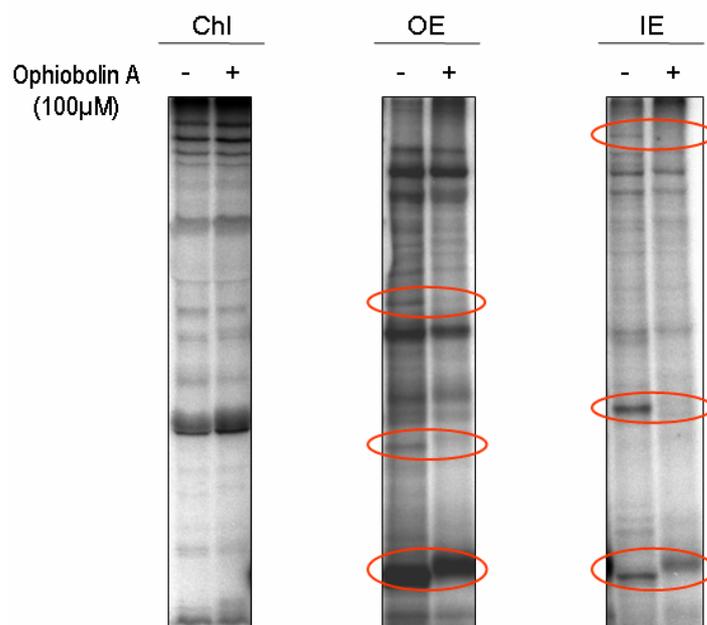


Abb. 27: *in vitro* Phosphorylierung

Gesamte Chloroplasten (Chl), isolierte äußere (OE) und innere (IE) Hüllmembranvesikel aus Erbse (je äquivalent zu 20 μg Protein) wurden in Anwesenheit oder Abwesenheit von 100 μM Ophiobolin A in Reaktionspuffer für 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. 1 μCi $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP wurden dann zugegeben und nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit SDS-Solubilisierungspuffer gestoppt. Die Ansätze wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

Im Gegensatz dazu konnten manche Proteine der äußeren sowie der inneren Hüllmembran nicht mehr detektiert werden, wenn Ophiobolin A zum Reaktionsansatz gegeben wurde (Abb. 27, OE + IE). Das Ausbleiben der

Phosphorylierung dieser Proteine könnte die Folge der Hemmung von Proteinkinase/n oder der Aktivierung von Proteinphosphatase/n durch Ophiobolin A sein. Damit scheint Calmodulin die Phosphorylierung mancher Proteine der äußeren und inneren Hüllmembran zu regulieren. Ob dieser Effekt dann zur Regulation des Proteinimports in Chloroplasten führt, muß durch weitere experimentelle Untersuchungen verifiziert werden.

5. Diskussion

Kernkodierte chloroplastidäre Proteine werden an cytosolischen Ribosomen synthetisiert und müssen posttranslational in Chloroplasten importiert werden (Übersichtsartikel: Vothknecht und Soll, 2003). Die Proteine translozieren in die Chloroplasten über die äußere und innere Hüllmembran in einem hoch regulierten Prozess. Die Translokation durch den Toc-Komplex wird über Phosphorylierung/Dephosphorylierung sowie über GTP-Bindung bzw. Hydrolyse reguliert (Schleif *et al.*, 2002 und 2003; Jelic *et al.*, 2002). Eine Kontrolle der Translokation durch den Tic-Komplex hingegen erfolgt über Redoxregulation (Caliebe *et al.*, 1997; Hörmann *et al.*, 2004; Kuchler *et al.*, 2002).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine bisher unbekannte Regulation des Proteinimports in Chloroplasten durch Calmodulin identifiziert. Hinweise auf diese Regulation lieferten Importexperimente in Chloroplasten in Anwesenheit von Ophiobolin A, ein spezifischer membrandurchlässiger Inhibitor von Calmodulin. Die Behandlung der Chloroplasten mit Ophiobolin A führt zur Hemmung des Proteinimports (Abb. 5). Davon sind jedoch nur diejenigen Proteine betroffen, die eine N-terminale Präsequenz besitzen und den generellen Importweg über den Toc- und Tic-Komplex verwenden. Diese Selektivität ist unabhängig vom weiteren Transportweg der Proteine innerhalb des Chloroplasten. Der Import von Proteinen, die im Stroma (SSU) oder in der inneren Hüllmembran (Tic110) lokalisiert sind, wird genauso gehemmt wie der von Proteinen (OE33 und OE23), die in die Thylakoide weiter transportiert werden müssen. Im Gegensatz dazu ist der Import von Proteinen wie Toc34 und Tic32, die nicht mit einer Präsequenz versehen sind, nicht von Ophiobolin A beeinflusst. Toc34 wird direkt vom Cytosol in die äußere Hüllmembran der Chloroplasten inseriert (May und Soll, 1998; Qbadou *et al.*, 2003). Tic32 benötigt keinen Toc-Komplex für seine Translokation in Chloroplasten aber eventuell ein Teil des Tic-Komplexes nämlich Tic22, welches im Intermembranraum zwischen der äußeren und der inneren Hüllmembran der Chloroplasten lokalisiert ist (Nada und Soll, 2004).

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass Ophiobolin A nicht die Bindung der Vorstufenproteine an die Oberflächerezeptoren der Chloroplasten hemmt. Die

Behandlung der Chloroplasten mit Ophiobolin A führte sogar zur Zunahme der Menge gebundener Vorstufenproteine, während die Importeffizienz abnahm. Dies schließt die Rezeptoren an der Oberfläche der Chloroplasten als Ort für die Wirkung von Ophiobolin A aus. Die Hemmung des Imports kann daher nur innerhalb des Chloroplasten erfolgen. Mehr Hinweise über den Effekt von Ophiobolin A lieferten die Importexperimente mit pSSU. Die Hemmung des pSSU-Imports durch Ophiobolin A ist charakterisiert durch Bildung des Importintermediates Tim4 (Abb. 6). Tim4 entsteht durch proteolytische Degradation des Vorstufenproteins pSSU, wenn pSSU partiell in den Translokationsapparat (Toc- und eventuell auch Tic-Komplex) gelangt ist, aber nicht vollständig ins Stroma translozieren kann (Waegemann und Soll, 1991, 1996; Caliebe *et al.*, 1997). Die Bildung von Tim4 legt nahe, dass die Inhibierung durch Ophiobolin A erst einsetzt, wenn pSSU partiell in den Importapparat inseriert ist. Tim4 wird auch gebildet, wenn die Chloroplasten mit DEPC vorbehandelt wurden (Abb. 13). DEPC ist ein Reagenz, das den Import von Vorstufenproteinen in den Chloroplasten hemmt, indem es Tic55, eine Komponente des Tic-Komplexes, modifiziert (Caliebe *et al.*, 1997). Dies bedeutet, dass das Erscheinen des Importintermediates Tim4 eine Folge der Unterbrechung der Translokation am Tic-Komplex ist. Weitere Experimente haben gezeigt, dass Tim4 mit der inneren Hüllmembran der Chloroplasten co-fraktioniert (Waegemann und Soll, 1993; siehe auch Abb. 14). Diese Untersuchungen legen nahe, dass die Hemmung des Proteinimports in Chloroplasten durch Ophiobolin A an der inneren Hüllmembran auf Höhe des Tic-Komplexes einsetzt. Interessanterweise beeinflusst Ophiobolin A nicht den Import von Tic32, obwohl dieses Protein mindestens eine Komponente des Tic-Komplexes, welche im Intermembranraum lokalisiert ist, für seine Translokation verwendet. Dies lässt darauf schließen, dass der Effekt von Ophiobolin A nicht auf der Intermembranseite sondern auf der stromalen Seite der inneren Hüllmembran oder direkt in der inneren Hüllmembran einsetzt. Da Ophiobolin A ein bekannter Inhibitor von Calmodulin ist, erscheint eine Calmodulin-Regulation des Proteinimports in Chloroplasten naheliegend. Diese Regulation könnte durch Tic32 vermittelt werden, da die Affinitätschromatographie an Calmodulin-Agarose Tic32 als dominantes Calmodulin-Bindeprotein in der inneren Hüllmembran der Chloroplasten zeigte (Abb. 15).

Calmodulin ist ein intrazellulärer Calcium-Rezeptor, der eine große Anzahl von zellulären Prozessen reguliert, indem er an Calcium bindet (Snedden und Fromm, 1998; Reddy, 2001; Zielenski, 1998). Dass der Proteinimport in Chloroplasten einer Calciumregulation unterliegt, wurde durch Durchführung der Importexperimente in der Anwesenheit von A23187 und Ionomycin verifiziert (Abb. 9). A23187 und Ionomycin sind Calcium-Ionophore, die Einfluss auf den Calcium-Gehalt nehmen können, indem sie das Calcium binden und dieses durch biologische Membranen transportieren. Dieser Transport läuft mit dem Konzentrationsgefälle bis ein Gleichgewicht erreicht wird. Die Ergebnisse zeigten, dass die Calcium-Ionophore, ähnlich wie bei Ophiobolin A beschrieben, den Proteinimport auf Höhe des Tic-Komplexes hemmen. Da die Importreaktionen im Calcium-freien Medium stattfinden, ist davon auszugehen, dass die Ionophore das Calcium aus dem Inneren der Chloroplasten in das Außenmedium transportieren. Diese Calcium-Abreicherung führt dann zum hemmenden Effekt der Ionophore. Dies deutet darauf hin, dass der Proteinimport vom Calciumgehalt des Chloroplasten abhängig ist. Die Calcium-Abhängigkeit zeigt sich ebenfalls für die Interaktion zwischen Calmodulin und Tic32, da in der Abwesenheit von Calcium diese Interaktion nicht stattfindet (Abb. 15). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass der Proteinimport in Chloroplasten in das Calcium-Netzwerk der Pflanzenzelle integriert ist. Das Calcium-Signal wird dabei durch Calmodulin und sein Bindeprotein Tic32 übertragen. Dies stellt eine neue Art der Regulation des Proteinimports in Chloroplasten dar, die auf Höhe des Tic-Komplexes einsetzt.

Die Spezifität der Bindung zwischen Calmodulin und Tic32 wurde mittels des sogenannten Calmodulin-Bindungsassays bestätigt (Abb. 17). Durch diesen Assay konnte auch nachgewiesen werden, dass die Calmodulin-Bindungsdomäne in Tic32 am proximalen C-Terminus zwischen der Aminosäure 296 und 314 liegt (Abb. 18). Der Sequenzvergleich zeigt, dass die Calmodulin-Bindungsdomäne in allen bis dato bekannten Tic32-Homologen aus Erbse (AAS38575), *Arabidopsis thaliana* (At4g23430) und *Oryza sativa* (AAX96188) konserviert ist. Dadurch erscheint die Calmodulin-Regulation eine allgemeine Regulation des Proteinimports in Chloroplasten höherer Pflanzen zu sein.

Darüber hinaus wurde durch chemische Quervernetzungsexperimente gezeigt, dass Calmodulin ebenfalls mit Tic32 direkt an der inneren Hüllmembran der Chloroplasten interagiert (Abb. 21a). Die Interaktion ist calciumabhängig, da in der Abwesenheit von Calcium kein Quervernetzungskomplex zwischen Calmodulin und Tic32 gebildet wird. Ein ähnlicher Quervernetzungskomplex konnte ebenfalls ohne Zugabe von externem Calmodulin beobachtet werden (Abb. 21b). Dies deutet darauf hin, dass die isolierten inneren Hüllmembranvesikel der Chloroplasten endogenes Calmodulin enthalten, welches mit Tic32 assoziiert ist.

Tic32 gehört zur Familie der sogenannten „short chain“, Dehydrogenasen (Hörmann *et al.*, 2004). Es enthält die für „short-chain“ Dehydrogenasen typischen konservierten Motive. Inzwischen konnte auch gezeigt werden, dass Tic32 eine NADPH-abhängige Dehydrogenaseaktivität aufweist, die durch Calmodulin gehemmt wird (Chigri *et al.*, 2006). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass sich Calmodulin und NADPH bei ihrer Bindung an Tic32 gegenseitig ausschließen, obwohl die Bindungsstellen beider Moleküle nicht überlappen (schematische Darstellung in Abb. 21). Dies bedeutet, dass entweder Calmodulin und NADPH sich gegenseitig innerhalb der dreidimensionalen Struktur von Tic32 sterisch hindern oder die Bindung NADPH bzw. Calmodulin zu Konformationsänderungen in Tic32 führt, sodass es nicht mehr für das jeweils andere Molekül zugänglich ist.

Tic32 ist eine Komponente des Tic-Komplexes, die durch direkte Bindung an Tic110 identifiziert wurde (Hörmann *et al.*, 2004). Seine Zugehörigkeit zum Tic-Komplex wurde durch Co-Immunpräzipitationsexperimente nachgewiesen. Durch Immunpräzipitation mit Antiserum gegen Tic110 gelingt es, die meisten Komponenten des Tic-Komplexes aus der inneren Hüllmembran der Chloroplasten zu fällen (Abb. 24). Tic55 und die schweren Ketten des primären Antikörpers werden in der SDS-PAGE jedoch nur unzureichend getrennt. Daher konnte Tic55 nach der Immunpräzipitation nicht detektiert werden. Da für Tic20 kein Antiserum gegen Erbse zur Verfügung steht, können ebenfalls keine Aussagen über dessen Assoziation mit dem Tic-Komplex getroffen werden. Die Zugabe von NADPH zum Immunpräzipitationsreaktionsansatz führte zur Unterbrechung der Bindung zwischen Tic110, Tic32, Tic62 und Tic40. Als Überträger dieses Effektes könnten Tic32 aber auch/oder andere Komponenten

des Tic-Komplexes (z.B. Tic62) bzw. der inneren Hüllmembran, die ebenfalls NADPH binden können, fungieren.

Im Chloroplasten sind viele Prozesse über Redoxreaktionen reguliert. Die Photosynthese, der dominierende Prozess in Chloroplasten, ist eine Kette von Elektronentransfer- und Redoxreaktionen (Allen *et al.*, 1995). Der Redoxstatus der Chloroplasten beeinflusst außerdem die Transkription (Pfannschmidt *et al.*, 1999; Tullberg *et al.*, 2000), Translation (Danon und Mayfield, 1994), RNA-Degradation (Salvador und Klein, 1999) und –Prozessierung (Deshpande *et al.*, 1997; Liere und Link, 1997), sowie den Proteinabbau (Garcia-Ferris und Moreno, 1994). Im Hinblick auf die zahlreichen Prozesse im Chloroplasten, die redoxreguliert sind, erscheint es nicht verwunderlich, dass der Proteinimport ebenfalls über Redoxreaktionen gesteuert wird. Diese Regulation wird offensichtlich über die Tic-Komplex-Komponenten Tic32, Tic55 und Tic62 geleitet. Tic55 besitzt ein Rieske-Eisen-Schwefel-Zentrum und Tic62 bindet NAD(P) sowie Ferredoxin-NADP Oxidoreduktase (Küchler *et al.*, 2002; Caliebe *et al.*, 1997). Daher wurde für beide Proteine eine Redoxfunktion vermutet. Die Bindung von NADPH und die NADPH-abhängige Dehydrogenaseaktivität legen eine redoxregulierte Funktion ebenfalls für Tic32 nahe. Die Frage, wie diese Komponenten zusammenwirken, um die Funktion des Tic-Komplexes über Redoxreaktionen zu regulieren, ist bis dato noch nicht geklärt. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten allerdings zeigen, dass die Bindung von NADPH an Tic32 die Interaktion zwischen den Komponenten des Tic-Komplexes Tic110, Tic32, Tic40 und Tic62 unterbricht. Diese Disassemblierung führt zur Hemmung der Translokation von Proteinen über die innere Hüllmembran des Chloroplasten. Es wurde spekuliert, dass es eine Reihe von Tic-Komplexen mit verschiedenen Kompositionen existiert, die für den Import unterschiedlicher Sub-Gruppen von Proteinen verantwortlich sind. Nach den bisher gewonnenen Kenntnissen im Rahmen dieser Arbeit es ist nicht auszuschließen, dass die Proteintranslokation über einen Tic-Komplex ohne die oben genannten Komponenten nicht durch NADPH und Calmodulin reguliert werde. Dies könnte manche Proteine betreffen, die im Zuge dieser Arbeit nicht untersucht worden sind.

Da sich Calmodulin und NADPH bei ihrer Bindung an Tic32 gegenseitig ausschließen, liegt die Vermutung nahe, dass die Bindung von Calmodulin an

Tic32, im Gegensatz zu NADPH, möglicherweise die Stabilität des Tic-Komplexes beeinflusst. Co-Immunopräzipitationsexperimente zeigen, dass die meisten Tic-Komponenten stets als Komplex assembliert vorliegen. Ob diese Assemblierung eine Folge der Assoziation zwischen Tic32 und dem endogenen Calmodulin ist, welches in isolierten inneren Hüllmembranvesikeln der Chloroplasten bereits enthalten ist, muss durch weitere experimentelle Untersuchungen geklärt werden.

6. Zusammenfassung

Kernkodierte chloroplastidäre Proteine werden an cytosolischen Ribosomen synthetisiert und müssen posttranslational in Chloroplasten importiert werden. Die Translokation dieser Proteine erfolgt in einem hoch regulierten Prozess durch den Toc- und Tic-Komplex, die Proteintranslokationskomplexe in der äußeren bzw. inneren Hüllmembran der Chloroplasten. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der Proteinimport in Chloroplasten in das Calcium-Netzwerk der Pflanzenzelle integriert ist. Hinweise darauf lieferte die Identifizierung einer bisher unbekanntenen Regulation des chloroplastidären Proteinimports durch Calcium/Calmodulin. Diese Regulation betrifft nur diejenigen Proteine, die eine abspaltbare N-terminale Präsequenz besitzen sowie Toc- und Tic-Komplex für ihre Translokation in Chloroplasten verwenden. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Calcium/Calmodulin-Regulation des Proteinimports auf Höhe des Tic-Komplexes einsetzt. Als Überträger dieser Regulation fungiert wahrscheinlich Tic32, eine Komponente des Tic-Komplexes, da die Affinitätschromatographie an Calmodulin-Agarose Tic32 als dominantes Calmodulin-Bindeprotein in der inneren Hüllmembran der Chloroplasten aufzeigte. Sowohl heterolog exprimiertes als auch natives Tic32 binden an Calmodulin nur in Anwesenheit von Calcium. Die Calmodulin-Bindungsdomäne in Tic32 liegt am proximalen C-Terminus zwischen Leu²⁹⁶ und Leu³¹⁴. Tic32 kann ebenfalls NADPH binden, was eine Redoxregulation für dieses Protein nahelegt. Die Bindung von NADPH führt zur Unterbrechung der Interaktion von Tic110 mit Tic32, Tic62 und Tic44. Da sich NADPH und Calmodulin bei ihrer Bindung an Tic32 gegenseitig ausschließen, könnte Calmodulin die Bindung zwischen den Komponenten des Tic-Komplexes wiederherstellen. Zusammengenommen liefern diese Ergebnisse Hinweise darauf, dass sowohl die Redox- als auch die Calcium/Calmodulin-Regulation des Proteinimports in Chloroplasten auf Höhe des Tic-Komplexes stattfinden und dass die beiden Regulationen durch Tic32 vermittelt werden könnten.

8. Abstract

Most chloroplast proteins are nuclear-encoded and are therefore synthesized on cytosolic ribosomes. In order to enter the chloroplast these proteins have to cross the double-membrane that is surrounding the organelle. This is achieved by means of the Toc and Tic translocon, two hetero-oligomeric protein complexes in the outer and inner envelope, respectively. Chloroplast import itself is highly regulated on both sides of the envelope membranes. This thesis provides evidences that the chloroplast is integrated into the calcium signalling network of the plant cell by a previous unknown mode of regulation for this process via calcium/calmodulin. This regulation affects the translocation only of those chloroplast proteins imported by means of a cleavable N-terminal presequence and via the Toc- and Tic-complex. The results of this thesis also indicate that this regulation occurs at the Tic translocon. Tic32, a component of the Tic translocon could be a potential promoter of the calcium/calmodulin regulation, since Tic32 was identified as the predominant calmodulin-binding protein of the inner envelope membrane by using affinity-chromatography on calmodulin-agarose. heterologously expressed as well as native Tic32 binde calmodulin in a calcium-dependent manner. This interaction is mediated by a calmodulin-binding domain between Leu²⁹⁶ and Leu³¹⁴ close to the C-proximal end of Tic32. Furthermore, Tic32 binds NADPH thereby supporting a redox function for this protein. NADPH disrupts the interaction of Tic110 with Tic32, Tic44 and Tic62. Since the binding of NADPH and calmodulin to Tic32 appear to be mutually exclusive, binding of calmodulin to Tic32 could promote the interaction between the components of the Tic-complex. Taken together these results suggest that redox and calcium/calmodulin regulations of chloroplast protein import convene at the Tic translocon and that both could be mediated by Tic32.

9. Literatur

- Alefsen H., Waegemann K., Soll J. (1994). Analysis of the protein import machinery. *J. Plant Physiol.* **144**: 339-345
- Allen J.F., Alexciev K., Håkansson G. (1995) Regulation by redox signalling. *Curr. Biol.* **5**: 1822-1872
- Arazi T., Baum G., Snedden W. A., Shelp B. J., Fromm H. (1995) Molecular and biochemical analysis of calmodulin interactions with the calmodulin-binding domain of plant glutamate decarboxylase. *Plant Physiol* **108**: 551-561
- Arnon D.J. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **24**: 42-45
- Aseeva E., Ossenbuhl F., Eichacker L.A., Wanner G., Soll J., Vothknecht U.C. (2004) Complex formation of Vipp1 depends on its alpha-helical PspA-like domain. *J. Biol.Chem.* **279**: 35535-35541.
- Blobel G., Walter P., Chang C.N., Goldman B.M., Erickson A.H., Lingappa V.R. (1979) Translocation of proteins across membranes: the signal hypothesis and beyond. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **33**: 9-36
- Blum H., Beier H., Gross H.J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Eur. J. Biochem.* **46**: 84-88
- Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254
- Berridge M.J., Lipp P. and Bootman M.D. (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **1**: 11-21
- Burgess W.H., Jemiolo D.K., Kretsinger R.H. (1980) *Biochim.Biophys.Acta* **623**: 257-270
- Caliebe A., Grimm R., Kaiser G., Lübeck J., Soll j., Heins L. (1997) The chloroplastic protein import machinery contains a Rieske-Type iron-sulfur cluster and a mononuclear iron-binding protein. *EMBO J.* **16**: 7342-7350

-
- Charbonneau H., Cormier M.J. (1979) Purification of plant calmodulin by fluphenazine-sepharose affinity chromatography. *Biochem Biophys Res Commun* **90**: 1039-1047
- Chigri F., Hörmann F., Stamp A., Stammers D.K., Bölter B., Soll J., Voithknecht U.C. (2006) Calcium regulation of chloroplast protein translocation is mediated by calmodulin binding to Tic32. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **103**:16051-16056
- Chua N.H., Schmidt G.W. (1979) Transport of proteins into mitochondria and chloroplasts. *J. Cell Biol.* **81**: 461-483
- Cline K., Henry R., Li C., Yuan J. (1993) Multiple pathways for protein transport into or across the thylakoid membrane. *EMBO J.* **12**: 4105–4114.
- Danon A., Mayfield S.P. (1994) Light-regulated translation of chloroplast messenger RNAs through redox potential. *Science* **266**: 1717-1719
- Deshpande N.N., Bao Y., Herrin D.L. (1997) Evidence for light / redox-regulated splicing of psbA pre-RNAs in *Chlamydomonas* chloroplasts. *RNA* **3**: 37-48
- Friedman A.L., Keegstra K. (1989) Chloroplast protein import Quantitative analysis of precursor binding. *Plant Physiology* **89**: 993–999.
- Gamborg O.L., Murashige T., Thorpe T.A., Vasil I.K. (1976) Plant tissue culture media. *In Vitro* **12**: 473–478.
- Garcia-Ferres C., Moreno J. (1994) Oxidative modification and breakdown of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase induced in *Euglena gracilis* by nitrogen starvation. *Planta* **193**: 208-215
- Gerdes L, Bals T, Klostermann E, Karl M, Philippar K, Hunken M, Soll J, Schunemann D. (2006) A second thylakoid membrane-localized Alb3/Oxal/YidC homologue is involved in proper chloroplast biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **281**:16632-16642
- Grossmann A., Bartlett S., Chua N.H., (1980) Energy dependent uptake of cytoplasmically synthesized polypeptides by chloroplasts. *Nature* **285**: 625-628
- Hanahan D. (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. In.: DNA cloning I, a practical approach, Glover, D.M.; ed., IRL PressLtd, Oxford, 109-135.

-
- Heins L., Mehrle A., Hemmler R., Wagner R., Kuchler M., Hörmann F., Sveshnikov D., Soll J. (2002) The preprotein conducting channel at the inner envelope membrane of plastids. *EMBO J.* **21**: 2616-2625.
- Hoeflich K.P., Ikura M. (2002) Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms. *Cell* **108**: 739-742
- Honkanen R.E., Zwiller J., Moore R.E., Daily S.L., Khatra B.S., Dukelow M., Boynton A.L. (1990) Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* **265**: 19401-19404.
- Hörmann F., Kuchler M., Sveshnikov D., Oppermann U., Li Y., Soll J. (2004) Tic32, an essential component in chloroplast biogenesis. *J. Biol. Chem.* **279**: 34756-34762
- James P., Vorherr T., Carafoli E. (1995) Calmodulin-binding domains: just two faced or multi-faceted? *Trends Biochem Sci.* **20**: 38-42
- Jarrett H.W., Brown C.J., Black C.C., Cormier M.J. (1982) Evidence that calmodulin is in the chloroplast of peas and serves a regulatory role in photosynthesis. *J. Biol. Chem.* **257**: 13795-13804
- Jarvis P., Soll J. (2001) Toc, Tic, and chloroplast protein import. *Biochim Biophys Acta* **1541**: 64-79.
- Jeanmougin F., Thompson J.D., Gouy M., Higgins D.G., Gibson T.J. (1998) Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci.* **23**:403-5.
- Keegstra K., Olsen L.J., Theg S.M. (1989) Chloroplastic precursors and their transport across the envelope membranes. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**: 471-501
- Kessler F., Blobel G., Patel H.A., Schnell DJ. (1994) Identification of two GTP-binding proteins in the chloroplast protein import machinery. *Science* **266**: 1035-1039
- Koop H.U., Steinmüller K., Wagner H., Rössler C., Eibl C., Sacher L. (1996) Integration of foreign sequences into the tobacco plastome via polyethylene glycol-mediated protoplast transformation. *Planta* **199**: 193–201.

-
- Küchler M., Decker S., Hörmann F., Soll J, Heins L. (2002) Protein import into chloroplasts involves redox-regulated proteins. *EMBO J.* **22**: 6136-6145.
- Kyhse-Anderson J. (1984) Electroblothing of multiple gels-a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamid to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys.Methods* **10**: 203-209
- Laemmli U.K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Leung P.C., Taylor W.A., Wang J.H., Tipton C.L. (1984) Ophiobolin A. A natural product inhibitor of calmodulin. *J. Biol. Chem.* **259**: 2742-2747
- Li H.M., Kaneko Y., Keegstra K. (1994) Molecular cloning of a chloroplastic protein associated with both the envelope and thylakoid membranes. *Plant Mol. Biol.* **25**: 619-632
- Liere K., Link G. (1997) Chloroplast endoribonuclease p54 involved in RNA 3'-end processing is regulated by phosphorylation and redox state. *Nucleic Acids Res.* **25**: 2403-2408
- Lübeck J., Soll J., Akita M., Nielsen E., Keegstra K. (1996) Topology of IEP110, a component of the chloroplastic protein import machinery present in the inner envelope membrane. *EMBO J.* **15**: 4230-4238
- Margulis L. (1970) Origin of Eukaryotic Cells. New Haven: Yale University Press.
- May T., Soll J. (1998) Positive charges determine the topology and functionality of the transmembrane domain in the chloroplastic outer envelope protein Toc34. *J. Cell. Biol.* **141**: 895-904
- Mereschkowsky C. (1905) Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biol. Centralbl* **25**: 593-604.
- Nada A., Soll J. (2004) Inner envelope protein 32 is imported into chloroplasts by a novel pathway. *J. Cell Sci.* **117**: 3975-3982.
- Olsen L.J., Theg S.M., Selman B.R., Keegstra, K. (1989) ATP is required for the binding of precursor proteins to chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **264**: 6724-672.

- O'Neil K.T., DeGardo W.F. (1990) How calmodulin binds its targets: sequence independent recognition of amphiphilic alpha-helices. *Trends Biochem.Sci.* **2**: 59-64
- Peters C., Andrews P.D., Stark M.J.R., Cesaro-Tadic S., Glatz A., Podtelejnikov A., Mann M., Mayer A. (1999) Control of the terminal step of intracellular membrane fusion by protein phosphatase 1. *Science* **285**: 1084-1087
- Peters C., Mayer A. (1998) Ca^{2+} /calmodulin signals the completion of docking and triggers a late step of vacuole fusion. *Nature* **396**: 575-580
- Pfannschmidt T., Nilsson A., Allen J.F. (1999a) Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature* **397**: 625-628
- Qbadou S., Tien R., Soll J., Schleiff E. (2003) Membrane insertion of the chloroplast outer envelope protein, Toc34: constraints for insertion and topology. *J. Cell Sci.* **116**: 837-46
- Reddy A.S.N. (2001) Calcium: Silver bullet in signaling. *Plant Science* **160**: 381-404.
- Reddy V.S., Ali G.S., Reddy A.S.N (2002) Genes Encoding Calmodulin-binding Proteins in the *Arabidopsis* Genome. *J.Biol.Chem.* **277**: 9840-9852
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel B., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Ehrlich H.A. (1998) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Salvador M.L., Klein U. (1999) The redox state regulates RNA degradation in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **121**: 1367-1374
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) Molecular Cloning. *A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schleiff E., Klösgen R.B. (2001) Without a little help from 'my' friends: direct insertion of proteins into chloroplast membranes?. *Biochim. Biophys. Acta.* **1541**: 22-33.
- Schleiff E., Jelic M., Soll J. (2003) A GTP-driven motor moves proteins across the outer envelope of chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **100**:4604-4609.

-
- Schnell D.J., Blobel G. (1993). Identification of intermediates in the pathway of protein import into chloroplasts and their localization to envelope contact sites. *J. Cell Biol* **120**: 103-115
- Seedorf M., Waegemann K., Soll, J. (1995) A constituent of the chloroplast import complex represents a new type of GTP-binding protein. *Plant J.* **3**: 401-411.
- Snedden W.A., Fromm H. (1998) Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment. *Trends Plant Sci* **3**: 299-
- Sohrt, K., and Soll, J. (2000) Toc64, a new component of the protein translocon of chloroplasts. *J. Cell Biol.* **148**: 1213-1221.
- Soll J., Schleiff E. (2004) Protein import into chloroplasts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**: 198-208
- Tullberg A., Alexciev K., Pfannschmidt T., Allen J.F. (2000) Photosynthetic electron flow regulates transcription of the psbA gene in pea (*Pisum sativum* L.) chloroplasts through the redox state of the plastoquinon pool. *Plant Cell Physiol.* **41**: 1045-1054
- Waegemann K., Soll J. (1991) Characterization of the protein import apparatus in isolated outer envelopes of chloroplasts. *Plant J.* **1**: 149-158.
- Waegemann K., Soll J. (1993) Isolation and characterisation of a functionally active protein translocation apparatus from chloroplast envelopes. *NATO ASI Series* **271**: 101-104
- Waegemann K., Soll J. (1996) Phosphorylation of the transit sequence of chloroplast precursor proteins. *J. Biol. Chem.*, **271**, 6545-6554.
- Wang Y., Liang S., Xie Q.G, Lu Y.T (2004) Characterization of a calmodulin-regulated Ca²⁺-dependent-protein-kinase-related protein kinase, AtCRK1, from *Arabidopsis*. *Biochem.J.* **383**: 73-81
- Westphal S., Soll J., Vothknecht U.C. (2001) A vesicle transport system inside chloroplasts. *FEBS Lett.* **506**: 257-261
- Westphal S., Sol, J., Vothknecht U.C. (2003) Evolution of chloroplast vesicle transport. *Plant Cell Physiol.* **44**: 217-222

- Yang T., Poovaiah B.W. (2000) *Arabidopsis* chloroplast chaperonin 10 is a calmodulin-binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275**: 601-607.
- Yang T., Poovaiah B.W. (2003) Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. *Trends Plant Sci.* **10**: 505-512.
- Zhang L., Lu Y.T. (2003) Calmodulin-binding protein kinases in plants. *Trends Plant Sci.* **8**: 123-127.
- Zielinski R.E. (1998) Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**: 697-725.

Veröffentlichungen

1. F. Chigri, J. Soll and U.C. Vothknecht (2005) Calcium regulation of chloroplast protein import. Plant Journal 42: 821-831
2. F. Chigri, F. Hörmann, A. Stamp, D.K. Stammers, B. Bölter, J. Soll and U.C. Vothknecht (2006) Calcium regulation of chloroplast protein translocation is mediated by calmodulin-binding to Tic32 (Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 103: 16051-16056)

Lebenslauf

Name	Fatima Chigri
Geburtsdatum	7. September 1972 in Marokko
Staatsangehörigkeit	Marokkanisch

Ausbildung

1991-1995	Studium der Biologie in Marokko
1997-2001	Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität Kiel mit Abschluss Diplom
2001-2002	Diplomarbeit bei Herrn Prof. Dr. J. Soll am Botanischen Institut der Christian-Albrechts-Universität Kiel. Titel: Vesikeltransport in Chloroplasten
seit 2002	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Ludwig-Maximilians-Universität München in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. Soll mit Promotion unter Betreuung von PD. Dr. U.C. Vothknecht.

Dankesagung

Prof. Dr. J. Soll danke ich herzlich für die äußerst interessante Themenstellung, seine Diskussionsbereitschaft und vielfältige Unterstützung, die entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Besonderer Dank gilt PD. Dr. Ute C. Vothknecht für die Betreuung, vielfältige Diskussionen und Unterstützungen sowie für die Möglichkeit meine Ergebnisse auf nationalen und internationalen Konferenzen zu präsentieren.

Für die ständige Diskussionsbereitschaft über wissenschaftliche sowie private Themen bedanke ich mich besonders bei Soumya Qbadou und Elena Aseeva, die mich alle die Jahre der Promotion begleitet haben.

Mein Dank gilt Johanna Bussemer und Claudia Sippel für die freundliche Atmosphäre und die gute Laune im Labor. Bei Johanna möchte ich mich auch für die Hilfe bei manchen privaten Angelegenheiten bedanken. Für die Durchführung einiger Experimente und fürs Abholen immer früh morgens, wenn wir die große Erbsenaufarbeitung haben, bedanke ich mich sehr bei Claudia.

Ahmed Nada und Rania Abou Ali gilt auch mein Dank für ihre Freundschaft und die vielfältige Unterstützung

Bei Philipp Benz bedanke ich mich ganz herzlich für die Durchsicht und die konstruktive Kritik eines Teiles dieses Manuskripts sowie für die gelegentlichen netten Diskussionen.

Bei Sunčana Moslovac, Ewa Firley-Kwoka, Rita Sharma, Rolf Berdemeier, Lea Vojta, Aleksandar Vojta und Torsten Martin möchte ich mich ebenfalls für die netten und unterhaltsamen Gespräche bedanken.

Der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich für die Schaffung einer angenehmen oder auch manchmal unangenehmen Arbeitsatmosphäre danken. Man hat mit euch was fürs Leben gelernt.

Mein herzlicher und großer Dank für die grenzenlose Unterstützung gilt meine Familie. Wenn ich sie brauche, ist sie einfach immer für mich da.