

**Spinat als alternatives Modellsystem zur Analyse des
Tat-abhängigen Membrantransports von Proteinen**

Dissertation

zur Erlangung des

Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität

Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Mandy Waclawek

geb. am 12.05.1987 in Wolfen

Gutachter: Prof. Dr. Ralf Bernd Klösgen

Prof. Dr. Sacha Baginsky

Prof. Dr. Matthias Müller

öffentliche Verteidigung am: 15.11.2016

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
Zusammenfassung	XI
EINLEITUNG	1
1 Transportvorgänge und ihre Notwendigkeit für die eukaryotische Zelle	1
2 Chloroplastidäre Transitpeptide, die „Adressanhänger“ der Proteine	2
3 Proteintransport an der Thylakoidmembran	3
3.1 Insertion von Proteinen in die Thylakoidmembran	5
3.1.1 Spontane Insertion in die Thylakoidmembran	5
3.1.2 SRP-vermittelte Insertion in die Thylakoidmembran	5
3.2 Transport in das Thylakoidlumen	6
3.2.1 Sec-abhängiger Proteintransport	6
3.2.2 Tat-abhängiger Proteintransport	7
3.2.3 Die Komponenten der Tat-Translokase.....	8
4 <i>Spinacia oleracea</i> als alternatives Modellsystem für den cpTat-abhängigen Transport.....	12
5 Motivation für die Untersuchung der TatA-Aktivität.....	13
6 Zielstellung.....	13
MATERIAL & METHODEN.....	15
1 Material	15
1.1 Chemikalien	15
1.2 Längenstandards.....	15
1.3 Enzyme	15
1.4 Nukleotide und Oligonukleotide.....	16
1.5 Klone.....	18
1.6 verwendete Tat-Proteine und Tat-Antigene.....	19

1.7	Antikörper.....	19
1.8	Reaktionskits	20
1.9	Antibiotika.....	20
1.10	Kulturmedien.....	20
1.11	Säulenmaterial und Membranen.....	21
1.12	Pflanzenmaterial	22
2	Methoden	22
2.1	Molekularbiologische Methoden	22
2.1.1	Standardmethoden	22
2.1.2	Identifizierung der Sequenzen für die Tat-Komponenten aus Spinat.....	23
2.1.2.1.	RNA-Präparation und cDNA-Synthese	23
2.1.2.2.	Identifizierung eines zentralen Genabschnitts mithilfe von degenerierten Primern.....	23
2.1.2.3.	Identifizierung des 3`-Bereiches: 3` RACE.....	27
2.1.2.4.	Identifizierung des 5`-Bereiches: 5` RACE.....	28
2.1.3	Klonierungsmethoden	28
2.1.3.1.	Klonierung der cDNA für die Tat-Komponenten aus Spinat	28
2.1.3.2.	Konstruktion der TatA-Chimären über RF cloning.....	29
2.1.4	<i>In vitro</i> - Synthese von Proteinen	30
2.2	Biochemische Methoden.....	31
2.2.1	SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese.....	31
2.2.2	Native Polyacrylamid-Elektrophorese	31
2.2.3	BN-PAGE	32
2.2.4	CN-PAGE.....	33
2.2.5	Auftrennung in der zweiten Dimension (2D-PAGE).....	33
2.3	Visualisierung von Proteinen im Polyacrylamidgel	33
2.3.1	Coomassie-Colloidal-Färbung	34
2.3.2	Immunoblot.....	34
2.3.3	Autoradiographie.....	35
2.4	Heterologe Überexpression und Reinigung der Tat-Antigene / TatA-Proteine	35
2.5	Pflanzliche Methoden	36
2.5.1	Isolierung von Chloroplasten aus Spinat	36

2.5.2	Isolierung von Chloroplasten aus Erbse	37
2.5.3	Bestimmung der Chlorophyllkonzentration	38
2.5.4	Präparation von Thylakoiden	38
2.5.5	TatA-Antikörperbehandlung der Thylakoide zur Inhibierung des Tat- Transports.....	38
2.5.6	Rekonstitution des Tat-Transports durch Zugabe von überexprimiertem TatA	39
2.5.7	<i>In thylakoido</i> - Transportexperimente.....	39
ERGEBNISSE	40
1	Untersuchung des Tat-abhängigen Proteintransports im Modellorganismus <i>Spinacia oleracea</i>	40
1.1	Erste <i>in thylakoido</i> -Transportexperimente	40
1.2	Zeitabhängigkeit des Tat-abhängigen Transports in Spinat.....	43
1.3	Analyse der Tat-Translokasekomplexe mittels BN-PAGE.....	45
1.4	2D-Analyse von Tat-Translokasekomplexen in Spinat mithilfe des 16/23 Proteins	47
1.5	Notwendige Schritte zum Erhalt spezifischer Antikörper für die Tat-Proteine aus Spinat.....	48
1.5.1	Klonierung der codierenden Bereiche für die Tat-Komponenten aus Spinat.....	49
1.5.2	Heterologe Überexpression und Reinigung der Antigene	51
1.5.3	Qualitätstests der erhaltenen Antikörper	53
1.6	2D-Analyse von Thylakoid- und Stroma-Proben mittels Immunoblotting	55
1.6.1	Nachweis von TatBC-Rezeptorkomplexen mittels 2D-Analyse und Immunoblotting.....	55
1.6.2	2D-Analyse von stromalem Extrakt mittels Immunoblotting gegen TatA/TatB.....	57
1.7	Die Rolle von TatA als limitierender Faktor für den <i>in thylakoido</i> -Transport in Spinat.....	58

2	Vergleich der Aktivitäten unterschiedlicher TatA-Homologe.....	66
2.1	Vergleich der Funktionalität unterschiedlicher TatA-Versionen mittels <i>in vitro</i> -Synthese	66
2.2	Vergleich der Aktivitäten unterschiedlicher TatA-Proteine (gereinigte Form)	68
2.2.1	Theoretischer Ansatz für die Aktivitätsuntersuchung - TatA als Coenzym	71
2.2.2	Die TatA-Proteine aus Spinat und Arabidopsis unterscheiden sich in ihrer katalytischen Aktivität	73
2.2.3	Untersuchung der Aktivität von TatA aus Erbse	80
2.3	Mögliche Gründe für die unterschiedlichen katalytischen Aktivitäten der TatA- Proteine.....	82
2.3.1	Der Effekt der Löslichkeit auf die katalytische Aktivität von TatA.....	82
2.3.2	Chimäre TatA-Konstrukte als Mittel zur Identifizierung wichtiger funktioneller Bereiche im TatA-Protein	86
2.4	Zusammenfassung der TatA-Aktivitäten und Bewertung der berechneten Parameter	90
	DISKUSSION	94
1	Eigenschaften des Tat-abhängigen Transports in Spinatthylakoiden.....	94
2	Eigenschaften von Spinat-TatA als kritischer Faktor im Thylakoidtransport.....	96
3	Vorkommen von TatA und TatB im Stroma von Spinatchloroplasten.....	99
4	Spinat – Besonderheiten eines alternatives Modellsystems	101
5	Vergleich der Aktivitäten von TatA-Proteinen unterschiedlicher Herkunft.....	102
5.1	Unterschiede in den katalytischen Aktivitäten der TatA-Homologe.....	103
5.2	Die Rolle des C-Terminus für die katalytische Aktivität des TatA-Proteins und für die Tat-abhängige Translokation	106
5.3	Zusammenfassung: Begriff der Aktivität für das TatA-Protein.....	108
	Literaturverzeichnis	110

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung chloroplastidärer Transitpeptide	7
Abb. 2: Schematische Darstellung der verschiedenen Transportwege im Chloroplasten.....	4
Abb. 3: Untereinheiten der thylakoidären Tat-Maschinerie.....	8
Abb. 4: Modell des Tat-abhängigen Transportprozesses.....	9
Abb. 5: DNA-Sequenzalignment zum Design von degenerierten Primern am Beispiel von TatB	24
Abb. 6: Identifizierung eines zentralen DNA-Abschnitts des unbekanntes Gens mithilfe von degenerierten Primern.....	25
Abb. 7: Identifizierung eines zentralen DNA-Abschnitts des unbekanntes Gens mithilfe von 3` / 5` RACE.....	27
Abb. 8: Schema des RF-clonings am Beispiel der Chimäre Ara L27 Sp TatA	29
Abb. 9: Prinzip der Reinigung der Tat-Antigene / TatA-Proteine aus Spinat nach heterologer Überexpression in <i>E. coli</i>	35
Abb. 10: Vergleich des Tat-abhängigen Proteintransports in Erbsen- und Spinatthylakoiden	41
Abb. 11: Vergleich des Tat-abhängigen Proteintransports in Thylakoiden aus „jungen“ und „alten“ Spinatpflanzen	43
Abb. 12: Zeitabhängigkeit des in thylakoido-Transports des 16/23 Proteins in Erbsen- und Spinatthylakoiden	44
Abb. 13: Detektion von Tat-Translokasekomplexen in Erbsen- und Spinatthylakoiden mittels Blue-Native-PAGE-Analyse.....	46
Abb. 14: 2D-Analyse von substratmarkierten Proteinkomplexen in Spinatthylakoiden	47
Abb. 15: Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener TatA-Proteine.....	49
Abb. 16: Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener TatB-Proteine.....	50
Abb. 17: Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener TatC-Proteine.....	50
Abb. 18: Endausbeute der aufgereinigten Antigene für TatA, TatB und TatC aus Spinat nach heterologer Überexpression in <i>E. coli</i>	52
Abb. 19: Analyse von Antigen-, Thylakoid- und Stromaprobeen mittels Immunoblotting gegen TatA, TatB und TatC.....	53

Abb. 20: 2D-Analyse von Spinatthylakoiden nach erfolgtem Transport mit anschließendem Immunoblotting gegen TatA, TatB und TatC.....	56
Abb. 21: CN-PAGE-Auftrennung und 2D-Analyse von stromalem Extrakt aus Spinat mit anschließendem Immunoblotting gegen TatA und TatB.....	57
Abb. 22: Transport des 16/16 Proteins in Erbsen-/ Spinatthylakoide mit Untersuchung einer möglichen Extraktion von TatA.....	60
Abb. 23: Schema für einen Transport-Rekonstitutionansatz mittels Zugabe von <i>RTS</i> -TatA mit nachfolgenden Waschschritten.....	63
Abb. 24: Rekonstitution des Transports des 16/23 Proteins in Erbsen- oder Spinatthylakoide mittels <i>RTS</i> -TatA-Zugabe mit nachfolgenden Waschschritten	64
Abb. 25: Rekonstitution des Transports des 16/16 Proteins in Spinatthylakoiden mittels Zugabe von <i>RTS</i> -TatA	67
Abb. 26: Heterologe Überexpression und Aufreinigung des TatA-Proteins aus Spinat.....	68
Abb. 27: Rekonstitution des Transports des 16/16 Proteins in Spinatthylakoiden mittels Zugabe von gereinigtem TatA in Abhängigkeit von der Zeit.....	70
Abb. 28: Transportrekonstitutionsexperiment und Ermittlung der Aktivität für Spinat-TatA unter Verwendung von Spinatthylakoiden	74
Abb. 29: Vergleichsabbildung zu Abb. 28, übernommen aus Hauer <i>et al.</i> (2013), unter Verwendung von <i>Arabidopsis</i> -TatA	75
Abb. 30: Vergleich der Rekonstitution und der ermittelten Aktivitäten für Spinat-/ <i>Arabidopsis</i> -TatA unter Verwendung von Spinatthylakoiden	77
Abb. 31: Vergleich der Rekonstitution und der ermittelten Aktivitäten für Spinat-/ <i>Arabidopsis</i> -TatA unter Verwendung von Erbsenthylakoiden	78
Abb. 32: Vergleich der Rekonstitution und der ermittelten Aktivitäten für Spinat-/ <i>Arabidopsis</i> -TatA unter Verwendung von Erbsenthylakoiden und des 23/23 Proteins.....	79
Abb. 33: Vergleich der Transportrekonstitution und der ermittelten Aktivitäten für Spinat-/ <i>Arabidopsis</i> -/Erbsen-TatA unter Verwendung von Erbsenthylakoiden.....	81
Abb. 34: Vergleich der Transportrekonstitution und der ermittelten Aktivitäten für <i>RTS</i> -Spinat-/ <i>Arabidopsis</i> -/Erbsen-TatA unter Verwendung von Erbsenthylakoiden	83
Abb. 35: Versuchsansatz zur Überprüfung der Löslichkeit der unterschiedlichen TatA-Proteine.....	85
Abb. 36: Aminosäuresequenzvergleich für die TatA-Proteine aus Spinat, Erbse und <i>Arabidopsis</i>	87

Abb. 37: Schematische Darstellung der erstellten chimären TatA-Konstrukte	88
Abb. 38: Transport-Rekonstitutionsversuche und Ermittlung der Aktivität chimärer TatA-Konstrukte	89
Abb. 39: Hydropathie-Plot für die TatA-Proteine aus Spinat und Erbse	97

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenin
A _x	Absorption bei x nm
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
BN	<i>Blue Native</i>
BrCN	Bromcyan
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C-Terminus	Carboxyterminus
ca.	circa
CAP	m ⁷ G(5´)ppp(5´)G
CD	Circulardichroismus
Chl.	Chloroplasten
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2´-Desoxynukleosid-5´-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
2D	zweite Dimension
ΔpH	Protonengradient
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	und andere
fw	vorwärts (<i>forward</i>)
G	Guanin
GTP	Guanosin-5`-triphosphat
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N`-2-ethansulfonsäure
HM	HEPES mit Magnesium
HME	HEPES mit Magnesium und EDTA
HMW	<i>high molecular weight</i>
kDa	Kilodalton
K _m	Michaelis-Konstante
l	Liter
LHC	<i>light harvesting complex</i>
M	molar
m	reifes Protein (<i>mature protein</i>)

mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
N-Terminus	Aminoterminus
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMR	NMR Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
OEC	Wasserspaltungsapparat (<i>oxygen evolving complex</i>)
p	p Vorläuferprotein (<i>precursor protein</i>)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pdb	<i>protein data bank</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pmol	Pikomol
Psa	Proteine des Photosystems I
Psb	Proteine des Photosystems II
rev	rückwärts (<i>reverse</i>)
RTS	<i>rapid translation system</i>
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec	<i>secretory</i>
SIM	Saccharose-Isolationsmedium
Soc	<i>Super Optimal Broth</i> -Medium mit Zusatz von Glucose
SPP	stromale Prozessierungspeptidase
SRP	Signalerkennungspartikel (<i>signal recognition particle</i>)
STD	stromadirigierende Domäne (stroma targeting domain)
³⁵ S	Schwefel-35 (Isotop des Schwefels)
t	<i>in vitro</i> - Translation
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Tat	<i>twin arginine translocation</i>
Ti-1	Translokationsintermediat 1
Ti-2	Translokationsintermediat 2
TIC	<i>translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts</i>
TOC	<i>translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts</i>
TPP	Thylakoidprozessierungspeptidase

Abkürzungsverzeichnis

Tricin	N-Tris-(hydroxymethyl)-methylglycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTD	Thylakoiddirigierende Domäne (<i>thylakoid targeting domain</i>)
U	<i>Unit</i> (Mengenangabe bei Enzymen)
V	Volt
vs.	versus
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
w/v	Masse pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
z. B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Der pflanzliche Tat-abhängige Transport ist einer von vier verschiedenen Wegen, mit denen thylakoidäre bzw. luminaire Proteine aus dem Stroma zu ihrem Wirkungsort transportiert werden können. Eine Besonderheit dieses Transportweges ist die Fähigkeit, Proteine in gefalteter Form über eine ionendichte Membran zu translozieren. Die Tat-Translokase besteht aus drei integralen Membranproteinen, TatA, TatB und TatC. Für die Bindung des Vorläuferproteins bilden die Proteine TatB und TatC einen Rezeptorkomplex. Dieser erkennt das Tat-spezifische Signalpeptid mit dem namensgebenden Zwillingarginin-Motiv. Nach Bindung des Vorläuferproteins vermittelt TatA dessen Transport über die Thylakoidmembran. Wie dieser Prozess genau funktioniert und welchen Beitrag das TatA-Protein zur eigentlichen Translokation leistet, ist bisher noch nicht abschließend geklärt.

Alle bisherigen *in vitro*-Untersuchungen zum pflanzlichen Tat-abhängigen Transport wurden bisher mit Thylakoiden aus Erbse (*Pisum sativum*) durchgeführt, da dieser Organismus sich als Modellsystem bewährt hat. Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, Tat-abhängige Transportversuche für einen alternativen Modellorganismus zu etablieren und dessen Transporteigenschaften ausführlich zu charakterisieren. Hierfür wurde Spinat (*Spinacia oleracea*) ausgewählt, da bereits *in organello*-Untersuchungen erfolgreich mit diesem Organismus durchgeführt werden konnten. Außerdem wurde eine Identifizierung der codierenden DNA-Sequenzen für die Tat-Proteine aus Spinat durchgeführt.

Der Tat-abhängige Transport in Spinatthylakoiden erwies sich zunächst als prinzipiell möglich. Durch genauere Untersuchungen fielen jedoch einige Besonderheiten des Transportes unter der Nutzung dieses Modellorganismus auf. Die wohl außergewöhnlichste war die große Variabilität der Transportraten im Vergleich verschiedener, methodisch identischer Versuchswiederholungen. Diese Variabilität wird durch die Waschschriffe während der Thylakoidpräparation hervorgerufen und die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente brachten hervor, dass während dieser Waschschriffe TatA aus der Thylakoidmembran herausgelöst wird. Diese beobachtete Extraktion ist für das Spinat-TatA-Protein stärker ausgeprägt als für das Homolog aus Erbse und führt in Spinat zu einer drastischen Abnahme der Transportfähigkeit, wodurch angenommen werden kann, dass die verbliebene TatA-Menge in den Thylakoiden den Tat-abhängigen Transport limitiert.

Zusätzlich wurden weitere Experimente zur detaillierten Untersuchung des TatA-Proteins aus Spinat durchgeführt. Kernpunkt dieser Analysen war die Ermittlung der katalytischen Aktivität dieses TatA-Proteins. Nach dem in der Arbeitsgruppe favorisierten Modell fungiert TatA im Zuge der Translokation als Coenzym und vermittelt z. B. über eine Konformationsänderung im Rezeptorkomplex den Transport des Vorläuferproteins. Über Transportrekonstitutionsexperimente in Abhängigkeit von TatA konnte durch Hauer *et al.* (2013) bereits der TatA-Bedarf für eine erfolgreiche Translokation ermittelt werden. Mithilfe dieses Versuchsansatzes ist es zusätzlich möglich, die katalytische Aktivität eines TatA-Proteins zu bestimmen. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Analyse außer für Spinat-TatA zusätzlich für die beiden TatA-Homologe aus *Arabidopsis* und Erbse durchgeführt, um die erhaltenen Aktivitätswerte miteinander zu vergleichen. Es zeigte sich, dass die TatA-Proteine aus Spinat und Erbse eine ähnliche Aktivität als Coenzym besitzen, wogegen *Arabidopsis*-TatA einen weitaus aktiveren Vertreter darstellt. Dieser Aktivitätsunterschied zeigte sich unter der Verwendung unterschiedlicher Transportsubstrate und unabhängig vom Modellorganismus. Weiterführende Untersuchungen sollten den Grund für diesen Aktivitätsunterschied ermitteln und führten schließlich zur Proteinsequenz der TatA-Homologe. Mittels eines Sequenz-Alignments wird deutlich, dass die größten Sequenzunterschiede der TatA-Proteine im C-terminalen Bereich zu finden sind. Untersuchungen mit chimären Konstrukten, die jeweils einen Teil aus Spinat- bzw. *Arabidopsis*-TatA besitzen, zeigten jedoch, dass nicht alleine der C-Terminus für diesen Aktivitätsunterschied verantwortlich sein kann.

EINLEITUNG

1 Transportvorgänge und ihre Notwendigkeit für die eukaryotische Zelle

Jeder lebende Organismus ist in vielerlei Hinsicht von Transportprozessen abhängig. Dabei werden Informationen, Energie und Stoffe auf unterschiedliche Weise und zu individuellen Zielen geleitet, wodurch komplexe Stoffwechselforgänge und andere lebensnotwendige Prozesse der Zellen ermöglicht werden. Für Transportvorgänge gibt es viele Unterteilungsmöglichkeiten. Abhängig vom Energiebedarf spricht man von passivem oder aktivem Transport, je nach Ziel und Ausgangsort von Exo- oder Endocytose. Zudem kann der Transport in der Zelle barrierefrei, also innerhalb eines Kompartimentes oder zwischen zwei Kompartimenten über eine Membran erfolgen. Letzterer ist insbesondere bei eukaryotischen Lebensformen von essentieller Bedeutung. So werden beispielsweise Proteine zum Großteil im Cytosol synthetisiert und sind auf einen aktiven Transport über Membranen zu ihren jeweiligen Bestimmungsorten angewiesen. Als Beispiel hierfür dienen Chloroplasten und Mitochondrien. Sie besitzen aufgrund ihres endosymbiontischen Ursprungs noch eigene Genome (Schimper, 1883; Mereschkowsky, 1905; Margulis, 1970; Gray und Doolittle, 1982) und sind in der Lage, einen Teil der benötigten Proteine selbst zu synthetisieren, allerdings kam es im Laufe der Evolution zu einem Transfer großer Teile der chloroplastidären und mitochondrialen Genome in das des Zellkerns (Martin und Herrmann, 1998). Aufgrund dessen werden diese beiden Organellen als semi-autonom bezeichnet. Damit auch kerncodierte Proteine zum jeweiligen Zielorganell gelangen, verfügt die Zelle über einen speziellen Sortierungsmechanismus. Das zu transportierende Protein weist ein N-terminales Transportsignal auf, das Erkennungsstellen für die entsprechenden Translokasen besitzt (Schatz und Dobberstein, 1996).

Innerhalb von Chloroplasten kann zwischen verschiedenen Transportrouten der Proteine differenziert werden. Nach dem Transport aus dem Cytosol über die Chloroplastenhülle sind stromale Proteine bereits an ihrem Zielort angekommen. Andere, z.B. Komponenten der Elektronentransportkette, üben ihre Funktion jedoch in einem weiteren, inneren Membransystem, den Thylakoiden aus. Auch für den Transport über bzw. die Integration in die Thylakoidmembran werden spezielle Informationen benötigt, die im sogenannten Vorläuferprotein enthalten sind.

2 Chloroplastidäre Transitpeptide, die „Adressanhänger“ der Proteine

Die für die korrekte Lokalisierung und den erfolgreichen Transport in Plastiden notwendigen Transportsignale werden als Transitpeptide bezeichnet (Bruce, 2000). Sie variieren sehr in ihrer Zusammensetzung und Länge. Ein allgemeines Merkmal ist ein relativ hohes Vorkommen von Aminosäuren mit hydroxylierten Resten, wie z.B. Serin oder Threonin, wohingegen Seitenketten mit negativen Ladungen weniger vertreten sind (von Heijne *et al.*, 1989; Schatz und Dobberstein, 1996).

Je nach Bestimmungsort des Proteins innerhalb der Chloroplasten wird in einfache und zusammengesetzte Transitpeptide unterschieden (siehe Abb. 1). Kerncodierte, stromal lokalisierte Proteine verfügen über einfache Transitpeptide. Diese vermitteln als sogenannte stromadirigierende Domäne (STD) den Transport über die Doppelmembran der Chloroplastenhülle. Die Translokation wird durch die oligomeren Proteinkomplexe TOC (*translocon of the outer envelope membrane of chloroplasts*) und TIC (*translocon of the inner envelope membrane of chloroplasts*) gewährleistet und ist strikt abhängig von Nukleosidtriphosphaten (Young, Keegstra und Froehlich, 1999). Damit das Protein nach erfolgtem Transport in seiner endgültigen Konformation vorliegt und im Stroma seine Funktion erfüllen kann, wird die STD des Vorläuferproteins durch eine stromale Prozessierungspeptidase (SPP) proteolytisch abgespalten (Richter und Lamppa 1998; Robinson und Ellis, 1984).

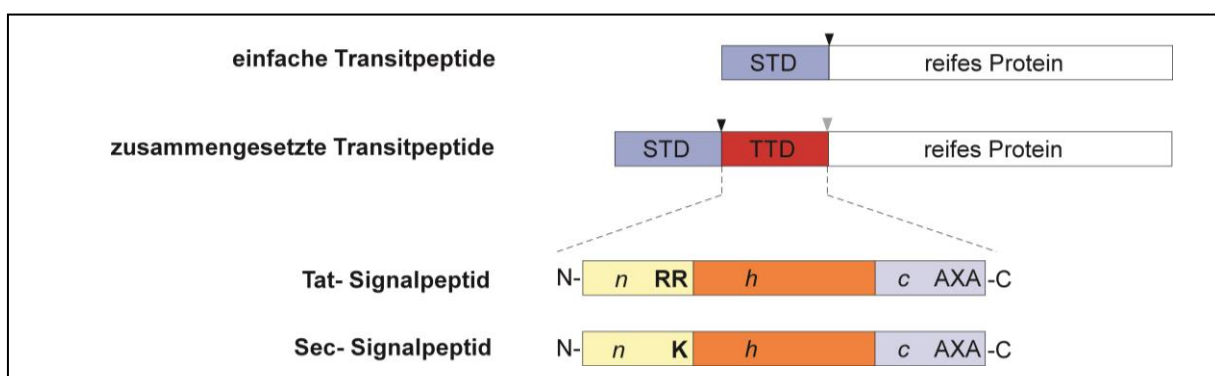


Abbildung 1: Schematische Darstellung chloroplastidärer Transitpeptide. Stromale Proteine besitzen ein einfaches Transitpeptid, das nur aus der stromadirigierenden Domäne (STD; in blau dargestellt) besteht. Proteine, deren Bestimmungsort die Thylakoide sind, verfügen über ein zusammengesetztes Transitpeptid, bestehend aus der STD und einer thylakoiddirigierenden Domäne (TTD; in rot dargestellt). Letztere wird auch Signalpeptid genannt. Sec- und Tat-Signalpeptide unterteilen sich in die positiv geladene *n*-Region, die hydrophobe *h*-Region und die *c*-Region. Das für den Tat-Transport spezifische Zwillingargininmotiv (RR) befindet sich am C-terminalen Ende der *n*-Region. An gleicher Position befindet sich im Sec-Signalpeptid ein Lysin (K). Die Spaltstellen der Stromaprozessierungspeptidase (SPP; als schwarze Pfeilspitze dargestellt) und der Thylakoid-Prozessierungspeptidase (TPP; als graue Pfeilspitze dargestellt) sind jeweils markiert. Letztere wird im Signalpeptid mit der Sequenz Ala-X-Ala (AXA) dargestellt. Weitere Details sind dem Text zu entnehmen.

Proteine, deren Bestimmungsort in den Thylakoiden liegt, verfügen über ein zusammengesetztes Transitpeptid, das außer der STD zusätzlich noch ein Signal für den Thylakoidtransport enthält, die thylakoiddirigierenden Domäne (TTD). Diese wird auch als Signalpeptid bezeichnet und wird nach erfolgtem Transport über die Thylakoidmembran durch die thylakoidäre Prozessierungspeptidase (TPP) abgespalten (Jarvis und Robinson, 2004). Es gibt allerdings auch einige Sonderfälle, wie z.B. das Rieske Fe/S-Protein, welches eine TTD trägt, die nach Abspaltung der STD als Membrananker fungiert und somit nicht entfernt wird (Madueño *et al.*, 1994; Molik *et al.*, 2001).

Für den Transport über die Thylakoidmembran kann die TTD spezifisch für den Sec-abhängigen (*secretory*) oder den Tat-abhängigen (*twin arginine translocation*) Weg sein. Prinzipiell weisen diese beiden Signalpeptide eine ähnliche Struktur auf. Sie lassen sich in drei distinkte Bereiche einteilen: einen positiv geladenen N-Terminus (*n*), einen hydrophoben Kernbereich (*h*) und eine C-terminal gelegene, polare Region (*c*), die mit einem konservierten Ala-X-Ala-Motiv die TPP-Erkennungssequenz trägt (von Heijne, 1985; Cristóbal *et al.*, 1999).

Neben ihrem gemeinsamen Aufbau unterscheiden sich jedoch Tat- und Sec-Signalpeptide durch einige Faktoren. Neben der etwas stärkeren Hydrophobizität im Kernbereich der Sec-Signalpeptide im Vergleich zur TTD der Tat-Substrate sind auch spezifische Aminosäuren am C-terminalen Ende der *n*-Region charakteristisch für die jeweiligen Signalpeptide. So findet sich an dieser Stelle für Tat-Signalpeptide ein konserviertes Zwillings-Arginin-Motiv, das als essentiell für die Erkennung durch die Translokase gilt (Chaddock *et al.*, 1995). Dagegen weisen Signalpeptide von Sec-Substraten an dieser Position ein einzelnes Lysin auf. Zusätzlich tritt in der *c*-Region einiger Tat-dirigierender Signalpeptide häufig die positiv geladene Aminosäure Lysin auf, welche ein Fehlleiten zur Sec-Translokase verhindern soll und daher auch als „*Sec-avoidance*“-Motiv bezeichnet wird (Bogsch *et al.*, 1997).

3 Proteintransport an der Thylakoidmembran

Die erste Hürde für den Transport eines kerncodierten plastidären Proteins stellt, wie zuvor erwähnt, die Hüllmembran der Chloroplasten dar. Die Proteine werden über die TOC- und TIC-Komplexe ins Stroma geleitet (siehe Abb. 2). Für Proteine, die ihre Funktion innerhalb der Thylakoide ausüben, wie z.B. die Komponenten der Photosysteme, existieren weitere Transportmechanismen an der Thylakoidmembran. Dabei ist zu unterscheiden, ob diese

Proteine in die Thylakoidmembran integriert werden oder durch diese hindurch in das Lumen gelangen sollen. Die Insertion von Proteinen in die Thylakoidmembran wird hauptsächlich spontan bzw. über den SRP-Weg (*signal recognition particle*) vermittelt. Für die Translokation luminaler Proteine über die Thylakoidmembran sind hauptsächlich der Sec- (*secretory*) und der Tat-Transportweg (*twin arginine translocation*) zuständig.

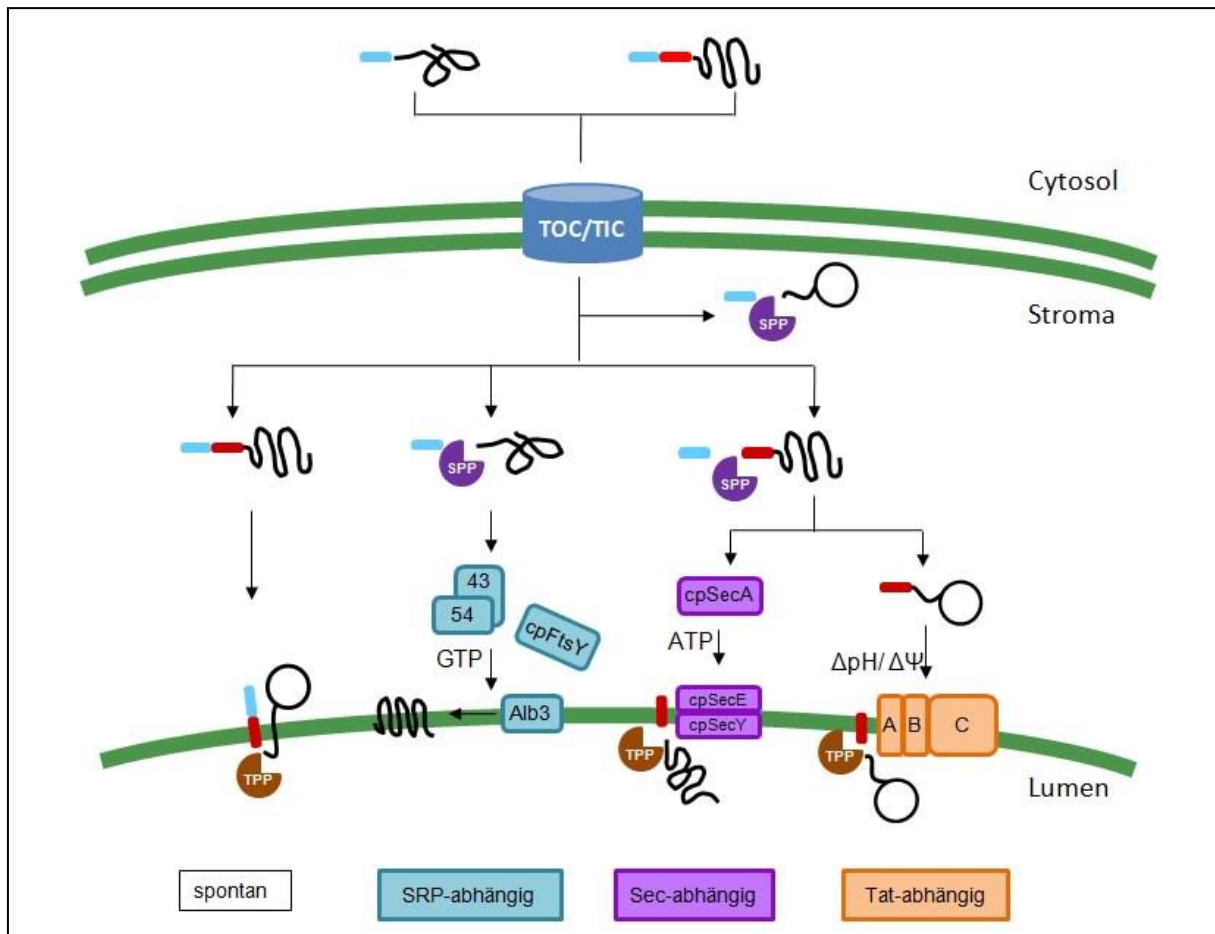


Abbildung 2: Schematische Darstellung der verschiedenen Transportwege im Chloroplasten. Neben den TOC- und TIC-Komplexen der Chloroplastenhülle sind die vier Transportwege über die Thylakoidmembran sowie die für den jeweiligen Weg notwendigen stromalen und membrangebundenen Faktoren vereinfacht dargestellt. Stromadirigierende Transportdomänen sind als hellblaue und thylakoiddirigierende Domänen als rote, abgerundete Rechtecke gezeigt. Die stromale (SPP) und thylakoidäre Prozessierungspeptidase (TPP) sind als violette bzw. braune, offene Kreise dargestellt. Die entsprechenden Energiequellen sind für jeden Transportweg angegeben. Weitere Details sind dem Text zu entnehmen.

(Abkürzungen: SRP, *signal recognition particle*; Tat, *twin arginine translocation*; sec, *secretory pathway*; SPP, stromale Prozessierungspeptidase; TPP, Thylakoid-Prozessierungspeptidase)

3.1 Insertion von Proteinen in die Thylakoidmembran

Generell ist für alle zuvor erwähnten Transportwege bekannt, dass sie Proteine in die Thylakoidmembran inserieren können. Für einen Großteil der Proteine erfolgt dies jedoch über den spontanen bzw. SRP-abhängigen Weg. Diese werden im Folgenden näher erläutert.

3.1.1 Spontane Insertion in die Thylakoidmembran

Von spontaner oder direkter Insertion wird gesprochen, wenn Proteine ohne den Einfluss jeglicher Energiequellen, proteinogener und stromaler Faktoren in die Thylakoidmembran gelangen. Diese Form der Membraninsertion ist laut bisherigen Erkenntnissen einmalig in Chloroplasten und kann vornehmlich für strukturell relativ einfach aufgebaute Proteine beobachtet werden, wie z.B. CF_oII (Untereinheit der ATP-Synthase; Michl *et al.*, 1994) sowie PsbX und PsbY (Untereinheiten des Photosystems II; Lorković *et al.*, 1995; Thompson *et al.*, 1999). Allerdings gibt es auch Hinweise für die spontane Insertion polytooper Membranproteine, wie z.B. Elip2 (*early light-inducible protein 2*) oder PsbS (Untereinheit des Photosystem II; Kim *et al.*, 1999). Die Insertion dieser Proteine wird durch ein abspaltbares, hydrophobes Transitpeptid gewährleistet. Dieses ist allerdings nicht für die Insertion aller Proteine notwendig, wie z.B. im Falle der bitopen Membranproteine TatA und TatB (Fincher *et al.*, 2003) sowie der Untereinheiten PsaG und PsaK des Photosystems I (Michl *et al.*, 1994; Gutensohn *et al.*, 2006).

3.1.2 SRP-vermittelte Insertion in die Thylakoidmembran

Der plastidäre SRP-abhängige Weg (*signal recognition particle*) besitzt analog zum bakteriellen SRP-System die Fähigkeit zur Insertion polytooper Membranproteine. Am Beispiel von LHCP (dem Apoprotein des LHC-Komplexes) als Substrat wurde ein Transitkomplex beschrieben, der sich aus den Proteinen cpSRP54 und cpSRP43 zusammensetzt (siehe Abb. 2; Eichacker und Henry, 2001). Durch Binden des Transitkomplexes an LHCP wird dieses in Lösung gehalten und mithilfe des Rezeptorproteins FtsY zur Thylakoidmembran dirigiert (Schünemann *et al.*, 1998). In Zusammenarbeit mit dem integralen Membranprotein Alb3 wird LHCP in die Thylakoidmembran inseriert. Der SRP-abhängige Weg ist strikt GTP-abhängig und wird durch ATP und einen Protonengradienten an der Thylakoidmembran zusätzlich stimuliert (Schünemann, 2007). cpSRP54 grenzt sich vom cytosolischen SRP54 durch das Fehlen einer

RNA-Komponente ab. Im plastidären Transitkomplex ist stattdessen cpSRP43 vorhanden, welches kein homologes bakterielles Protein aufweist (Li *et al.*, 1995; Schünemann *et al.*, 1998).

3.2 Transport in das Thylakoidlumen

Für luminale Proteine dienen sowohl der Tat- als auch der Sec-Weg der Translokation über die Thylakoidmembran. Die Wahl zwischen den beiden Transportwegen hängt hierbei für jedes Protein maßgeblich vom Faltungszustand ab und wird, wie bereits beschrieben, durch spezifische Motive innerhalb der jeweiligen Signalpeptide festgelegt.

3.2.1 Sec-abhängiger Proteintransport

Der plastidäre Sec-abhängige Weg ähnelt funktionell dem homologen System in Bakterien und besitzt die Aufgabe, Proteine im entfalteten Zustand über die Thylakoidmembran zu transportieren. Als Beispiele für Sec-Substrate können OEC33 (33kDa-Untereinheit des Wasserspaltungsapparates), PsaF (Untereinheit F des Photosystems I) und Plastocyanin genannt werden. Mithilfe dieser Substrate konnten erste Charakteristika dieses Transportweges ermittelt werden, unter anderem die Sensitivität gegenüber Natriumazid (Henry *et al.*, 1994; Knott und Robinson, 1994), was die Beteiligung eines SecA-Homologs nahelegte. Dieses als cpSecA bezeichnete Protein besitzt, wie im bakteriellen System auch, eine ATPase-Funktion und wurde sowohl in der Thylakoidmembran als auch im Stroma gefunden (Nakai *et al.*, 1994; Yuan *et al.*, 1994). Die Bildung eines cpSecA-Substrat-Komplexes findet allerdings nur an der Thylakoidmembran statt. Die eigentliche Translokationspore wird aus den Membranproteinen cpSecY und cpSecE gebildet (siehe Abb. 2). Im plastidären System fehlen sowohl ein homologes Protein zum bakteriellen SecG als auch zur Komponente SecB, welche als faltungsverhinderndes Chaperon beschrieben wird (Bechtluft *et al.*, 2007). Analog wirkende Faktoren, die für cpSec-Substrate eine entfaltete Konformation gewährleisten, stehen bis dato noch zur Diskussion (Albiniak *et al.*, 2012). Der Transport ist strikt ATP-abhängig (Robinson *et al.*, 1994), ein Protonengradient über die Thylakoidmembran wird zwar nicht als essentiell angesehen, kann aber einen stimulierenden Effekt auf die Transporteffizienz bewirken (Mant *et al.*, 1995).

3.2.2 Tat-abhängiger Proteintransport

Der Tat-abhängige Weg ermöglicht als Alternative zum Sec-Transport die Translokation luminaler Proteine in gefalteter Form. Die Substrate dieses Weges sind im bakteriellen System meist Cofaktor-tragende Proteine, wie z.B. eine Komponente der Zellteilungsma­schinerie (SufI), die kleinen Untereinheiten der [NiFe]-Hydrogenase 2, HybA und HybO oder die katalytische Untereinheit der Trimethylamin-N-Oxidoreduktase TorA. Für das plastidäre Tat-System sind unter anderem die Untereinheiten des Wasserspaltungsapparates OEC16 und OEC23 sowie die Polyphenoloxidase PPO als Substrate zu nennen. Das im Signalpeptid enthaltene Zwillingsargininmotiv ist für diesen Transportweg namensgebend (*tat – twin arginine translocation*). Die Translokation ist strikt abhängig von der Anwesenheit eines Membranpotentials, das aus einem Protonengradienten (ΔpH ; Mould und Robinson, 1991; Klös­gen *et al.*, 1992) und / oder elektrochemischen Gradienten ($\Delta\Psi$; Braun *et al.*, 2007) besteht. Da gefaltete Proteine aufgrund ihrer Tertiärstruktur ein gewisses Volumen einnehmen, stellt ihr Transport über die Membran unter Aufrechterhaltung des Membranpotentials eine besondere Herausforderung dar. Dabei ist die korrekte Faltung keine zwingende Voraussetzung für die erfolgreiche Tat-abhängige Translokation, wenngleich dies für das bakterielle System lange postuliert wurde (DeLisa *et al.*, 2003; Robinson *et al.*, 2011). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die bakterielle Tat-Translokase ungefaltete Proteine erkennen und transportieren kann (Richter *et al.*, 2007). Ähnliche Beobachtungen wurden im pflanzlichen System unter Verwendung von falsch gefalteten oder C-terminal verkürzten Substratproteinen gemacht (Hynds *et al.*, 1998; Schlesier und Klös­gen, 2015). Für das OEC33 (33 kD Untereinheit des Wasserspaltungsapparates), das eigentlich ein Sec-Substrat ist, wurde gezeigt, dass der OEC33-Passagier in Verbindung mit einem Tat-spezifischen Signalpeptid zumindest zu einem gewissen Anteil erfolgreich über den Tat-abhängigen Weg ins Lumen transportiert wird (Dittmar *et al.*, 2014). Das Tat-System ist sogar in der Lage, ein Protein, das kein Signalpeptid trägt, über einen sogenannten *hitchhiker* (Anhalter-) Mechanismus mithilfe des Signalpeptides eines Partnerproteins zu transportieren, wie es für die große Untereinheit der [NiFe]-Hydrogenase 2, HybC gezeigt wurde (Rodrigue *et al.*, 1999).

3.2.3 Die Komponenten der Tat-Translokase

Die thylakoidäre Tat-Maschinerie setzt sich aus drei kerncodierten Membranproteinen zusammen (siehe Abb. 3), welche als TatA (Tha4), TatB (Hcf106) und TatC (cpTatC) bezeichnet werden und jeweils homolog zu einer Tat-Komponente des bakteriellen Systems sind (Settles *et al.*, 1997; Walker *et al.*, 1999; Mori *et al.*, 2001). Dort wurde zusätzlich noch eine weitere Komponente namens TatE beschrieben, die eine starke Homologie zu TatA besitzt (Eimer *et al.*, 2015).

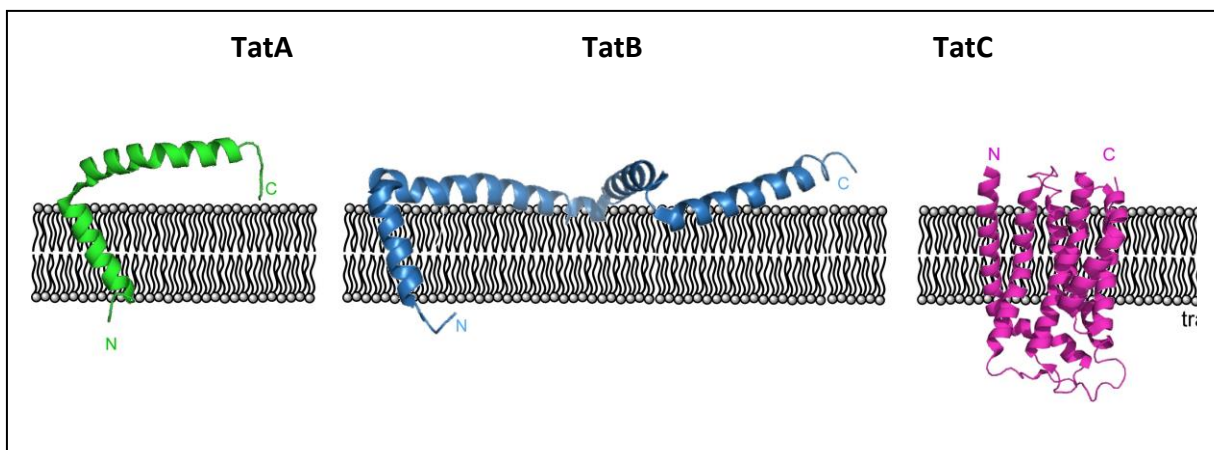


Abbildung 3: Untereinheiten der thylakoidären Tat-Maschinerie. Für die Proteine TatA (nach Rodriguez *et al.*, 2013; PDB code: 2LZR) und TatB (nach Zhang *et al.*, 2014; PDB code: 2MI2) ist die entsprechende Struktur aus *E. coli* und für TatC (nach Rollauer *et al.*, 2012; PDB code: 4B4A) aus *Aquifex aeolicus* dargestellt. Weitere Details sind dem Text zu entnehmen.

Bei Betrachtung der Topologie der Tat-Proteine ist hervorzuheben, dass TatA und TatB aufgrund ihrer Ähnlichkeit in der Primärsequenz auch eine ähnliche Struktur aufweisen. Für die TatA-Proteine aus *Bacillus subtilis* (Hu *et al.*, 2010) und *E. coli* (Rodriguez *et al.*, 2013) sowie TatB aus *E. coli* (Zhang *et al.*, 2014) konnte diese mittels NMR-Analysen (*nuclear magnetic resonance*) näher beschrieben werden. Die *E. coli* TatA-Struktur beruht jedoch auf einer nicht funktionellen Mutante. Als bitope Membranproteine verfügen TatA und TatB jeweils über eine, an einen kurzen, luminalen Bereich angrenzende, integrale Helix. Dieser Transmembranbereich wird durch eine Gelenkregion (*Hinge*) mit der darauffolgenden stromal exponierten amphipathischen Helix verbunden. An diese schließt sich für TatA und TatB jeweils der C-terminale Bereich an, wobei sich dessen Länge zwischen beiden Proteinen wesentlich unterscheidet. Für den C-Terminus beider Proteine ist bereits bekannt, dass er für die Tat-Funktion nicht essentiell ist, dagegen ist das Vorhandensein der amphipathischen Helix strikt notwendig (Lee *et al.*, 2002; Dabney-Smith *et al.*, 2003). Unabhängig von den

Strukturanalysen wird für TatA eine duale Topologie diskutiert, sodass die amphipathische Helix zeitweise auch eine transmembrane Orientierung einnehmen kann (Gouffi *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2007).

TatC ist ein polytopes Membranprotein, das insgesamt sechs integrale Bereiche aufweist. Dabei liegen sowohl N- als auch C-Terminus stromal lokalisiert vor. Für TatC wird eine „Handschuh“-artige Struktur inklusive einer lipidexponierten Tasche beschrieben, die als Bindestelle für das Signalpeptid von Tat-Substraten dienen könnte (Ramasamy *et al.*, 2013). Neueste Analysen weisen darauf hin, dass TatC seine Funktion als obligates Oligomer ausübt (Cléon *et al.*, 2015).

Der Mechanismus des Tat-abhängigen Transports

Die Tat-vermittelte Translokation eines Substrats wird über einen membranständigen Rezeptorkomplex initiiert (siehe Abb. 4). Dieser wurde mittels *Blue-Native-Analyse* als ca. 700 kDa großes Heterooligomer, bestehend aus TatB und TatC beschrieben (Cline und Mori, 2001). TatA konnte im pflanzlichen System bisher lediglich mittels Cross-Link-Analysen in diesem Komplex nachgewiesen werden (Pal *et al.*, 2013).

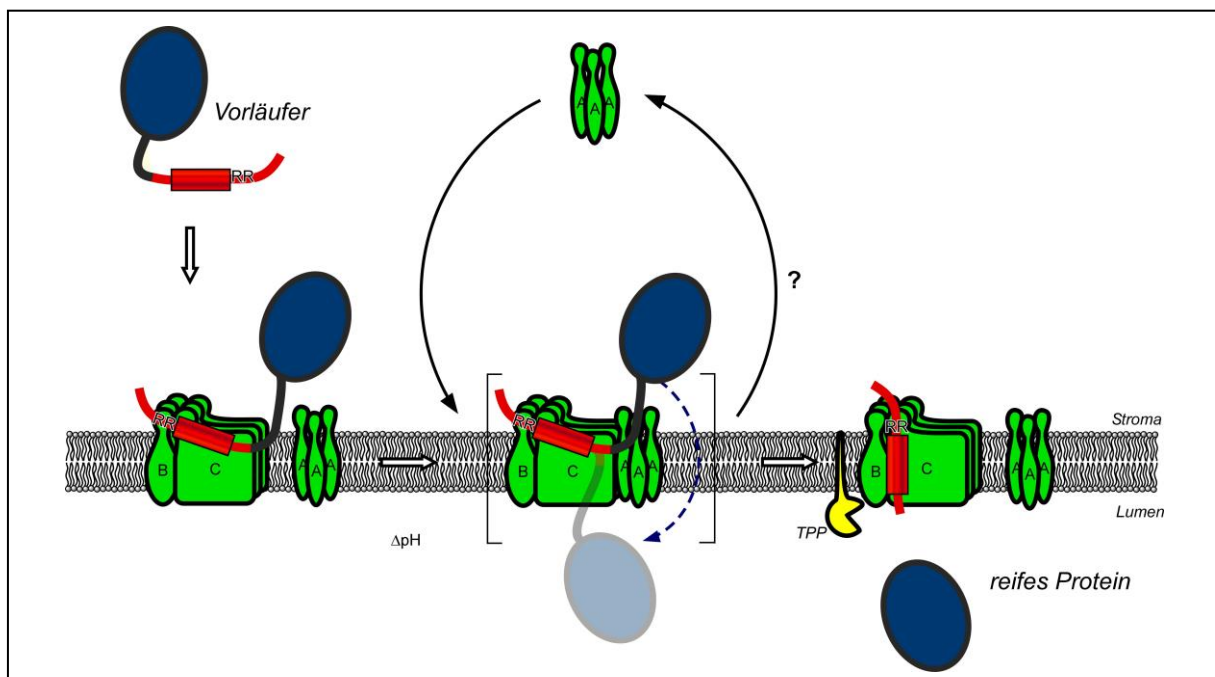


Abbildung 4: Modell des Tat-abhängigen Transportprozesses (modifiziert nach Frielingsdorf, 2008). Durch Pfeile wird der schrittweise Transportvorgang des Vorläuferproteins bis hin zum reifen Protein dargestellt. Das Fragezeichen zeigt an, dass ein hypothetischer „Recycling-Mechanismus“ bis dato nicht nachgewiesen ist. Weitere Details sind dem Text zu entnehmen.

(Abkürzungen: ΔpH –Protonengradient, TPP–Thylakoid-Prozessierungspeptidase)

Für die Bindung des Substrates am TatBC-Rezeptorkomplex sind im Wesentlichen das Zwillingsarginin und die *h*-Domäne des Tat-Signalpeptids notwendig. Die Erkennung des RR-Motivs erfolgt dabei über den N-Terminus von TatC und zusätzlich einen Bereich zwischen Transmembranhelix II und III (Zoufaly *et al.*, 2012). Im Allgemeinen sind jedoch für die Bindung des Signalpeptides Bereiche in den ersten drei Transmembranhelices wichtig (Holzapfel *et al.*, 2007). Es gibt außerdem auch Hinweise für die Beteiligung des N-Terminus von TatB an der Substratbindung (Blümmel *et al.*, 2015). Der auf die Bindung des Vorläuferproteins folgende, eigentliche Schritt des Transports über die Thylakoidmembran wird durch TatA vermittelt, welches bei Anwesenheit eines Membranpotentials vermutlich eine transiente Interaktion mit dem substratgebundenen TatBC-Rezeptorkomplex eingeht (Mori und Cline 2002; Alami *et al.*, 2003; Frielingsdorf *et al.*, 2008). Die genaue Funktionsweise von TatA während dieses Schrittes ist bisher noch ungeklärt. Bestehende Modelle zu dieser Fragestellung werden im folgenden Abschnitt näher erläutert.

Nach erfolgter Translokation liegt nun der reife Teil des Vorläuferproteins luminal exponiert vor (siehe Abb. 4). Den abschließenden Schritt des Transportprozesses stellt die Abspaltung des Signalpeptides vom reifen Teil des Substrates durch die Thylakoidprozessierungspeptidase dar.

Verschiedene Modelle zur Funktionsweise von TatA im Transportprozess

Wie zuvor erwähnt, ist bisher noch unklar, welche Rolle TatA im Transportprozess einnimmt und wie es letztendlich genau zur Translokation des Substrates beiträgt. Sowohl im pflanzlichen System als auch für die bakterielle Tat-Translokase gibt es durchaus Hinweise auf einen TatABC-Komplex (Mangels *et al.*, 2005; Pal *et al.*, 2013), parallel ist TatA jedoch ebenfalls in kleineren TatAB-Komplexen oder in homo-oligomerer Form zu finden (Bolhuis *et al.*, 2001; Oates *et al.*, 2005). Weiterhin wird für TatA die Funktion der Substratbindung im frühen Stadium des Tat-abhängigen Transportes postuliert (Fröbel *et al.*, 2011), was für eine *Carrier*-Funktion sprechen könnte. Im pflanzlichen System kann TatA nicht nur membrangebunden, sondern auch in löslicher Form im Stroma nachgewiesen werden (Frielingsdorf *et al.*, 2008). Aufgrund divergierender Angaben, die das stöchiometrische Verhältnis von TatA zu TatB und TatC in der Thylakoidmembran betreffen (Jakob *et al.*, 2009; Celedon und Cline, 2012; Hauer *et al.*, 2013), ist es auch vorstellbar, dass TatA einem steten Übergang zwischen

membrangebundener und löslicher Form unterliegt. Diese und viele weitere Erkenntnisse liefern jeweils einen Beitrag in der Funktionsanalyse von TatA, führen aber nicht zu einer einheitlichen Vorstellung über die genaue Aufgabe des Proteins im Tat-abhängigen Transport. Momentan existieren drei Modelle für die Beteiligung von TatA, die jeweils unterschiedliche Funktionsweisen für das Protein postulieren.

Die wohl am meisten diskutierte Hypothese beschreibt die Funktion einer TatA-Oligomerisierung am TatBC-Rezeptorkomplex. Dabei fungieren sogenannte TatA-Poren als eigentliches Translokationselement, deren Durchmesser an die Größe des zu transportierenden Substrates angepasst werden kann (Gohlke *et al.*, 2005). Dabei steht noch zur Diskussion, ob dieses Translokationselement durch Zusammenlagern der hydrophoben Transmembranhelices gebildet wird oder ob die amphipatischen Helices durch eine mutmaßliche Flexibilität im *Hinge*-Bereich ähnlich eines „Falltür“-Mechanismus in die Membran inserieren und somit die Pore für die zu transportierenden Vorläuferproteine auskleiden (Dabney-Smith *et al.*, 2006). In einem weiteren Modell wird davon ausgegangen, dass TatA in der Lage ist, durch Inserieren in die Membran diese so zu destabilisieren, dass der Durchgang von Tat-Substraten erleichtert wird (Natale *et al.*, 2008). Dies kann unter anderem durch eine Störung der geordneten Lipiddoppelschicht durch die kurze und teils flexible Transmembranhelix von TatA vermittelt werden, wenn dieses Protein in größerer Menge in die Membran inseriert (Mehner *et al.*, 2012), insbesondere in der Nähe von schon gebundenem Substrat (Brüser und Sanders, 2003). Andererseits könnte eine transiente Insertion der amphipatischen Helix zur Destabilisierung beitragen (Dabney-Smith *et al.*, 2006). Weiterhin wird postuliert, dass die Membran durch Inserieren der Transmembranbereiche von TatA gekrümmt wird, da diese etwas kürzer sind als die Dicke der Doppellipidschicht. Diese Krümmung kann leichter zum Aufreißen der Membran und somit zum Hindurchgelangen eines Substrates führen (Rodriguez *et al.*, 2013).

Eine dritte Theorie sieht den TatBC-Rezeptorkomplex als eigentliches Translokationselement, welches durch die Bindung von TatA aktiviert wird. Durch eventuelle Veränderungen in der Konformation des multimeren Komplexes, ausgelöst durch die Interaktion mit TatA, könnte die Translokation gestartet werden. Dieses Modell sieht also vor, dass TatA nicht direkt den Transport des Substrates bewerkstelligt, sondern als sogenanntes Coenzym zu einer aktiven Translokase führt (Hauer *et al.*, 2013).

4 *Spinacia oleracea* als alternatives Modellsystem für den cpTat-abhängigen Transport

Für nahezu alle Untersuchungen des Tat-abhängigen Transports im pflanzlichen System wird mit dem Organismus *Pisum sativum* ein einheitliches Modellsystem genutzt. Aufgrund des relativ simplen Präparationsprotokolls für die Chloroplasten eignet sich dieses System hervorragend für *in vitro*-Transportversuche. Für die detaillierte Charakterisierung des Tat-Transports und eventuelle neue Erkenntnisse über den Mechanismus der Tat-Translokation wäre allerdings ein alternatives Modellsystem von Vorteil. Damit könnten grundlegende Ergebnisse verifiziert, Artefakte ausgeschlossen oder mögliche Sonderfälle sowie Organismus-spezifische Eigenheiten aufgedeckt werden. So konnte beispielsweise im bakteriellen System für grampositive Bakterien eine strukturell einzigartige Version der Tat-Translokase nachgewiesen werden, die kein homologes Protein für TatB besitzt, allerdings über zwei verschiedene TatA-ähnliche Proteine und zwei TatC-Homologe verfügt (Goosens *et al.*, 2014).

Auch für die bisher stark diskutierte Frage der Stöchiometrie der einzelnen Tat-Komponenten untereinander ist eine weitere Pflanzenspezies wünschenswert, um die erhaltenen Absolutwerte zwischen verschiedenen pflanzlichen Organismen zu vergleichen und so als verlässlich einstufen zu können. Da das zukünftige alternative Modellsystem vorwiegend für *in vitro*-Transportexperimente verwendet werden soll, fiel die Wahl auf Spinat (*Spinacia oleracea*), ein Organismus, der für physiologische Fragestellungen und Untersuchungen eingesetzt wird. Die hierfür notwendigen Protokolle und Anweisungen für Anzucht und Präparation der Chloroplasten waren teilweise bereits vorhanden und zudem liefern diese Protokolle Chloroplastenmaterial mit hoher Ausbeute und Reinheit sowie nur geringen Verlusten von intaktem Material während der Präparation (Seigneurin-Berny *et al.*, 2008). Innerhalb der Arbeitsgruppe wurden bereits im Vorfeld dieser Arbeit einige Transportversuche mit intakten Chloroplasten aus Spinat durchgeführt und lieferten stets verlässliche Ergebnisse (Clausmeyer *et al.*, 1993). Daher ist auf der Basis von *in organello*-Untersuchungen die Etablierung eines erfolgreichen *in thylakoido*-Transports vorstellbar. Ein weiterer Vorteil ist, dass die innerhalb der Arbeitsgruppe vorhandenen Tat-Substrate aus Spinat stammen, sodass Transportexperimente im authentischen System durchgeführt werden können.

5 Motivation für die Untersuchung der TatA-Aktivität

In Kapitel 3.2.2 wurde bereits die Rolle des TatA-Proteins im Tat-abhängigen Transport über die Thylakoidmembran diskutiert. Zum Vergleich der Transporteigenschaften des neu etablierten Modellsystems Spinat und des Erbsen-Systems gehört auch die Untersuchung des TatA-Bedarfs für den jeweiligen Organismus. Innerhalb der Arbeitsgruppe konnten bereits Untersuchungen zum TatA-Bedarf für eine erfolgreiche Translokation in Erbsenthylakoide durchgeführt werden (Hauer *et al.*, 2013). Durch einen analogen Versuchsansatz mit Spinatthylakoiden können nun die erhaltenen Daten verifiziert werden oder herausgefunden werden, ob jeder Modellorganismus eventuell einen individuellen TatA-Bedarf besitzt.

Mit dem in zuvor genannter Publikation verwendeten Versuchsansatz können auch Aussagen über die Aktivität des verwendeten TatA-Proteins getroffen werden. Entsprechend dem in der Arbeitsgruppe favorisierten katalytischen Modell für TatA als Coenzym können mithilfe der erhaltenen Daten über Regression nach der Hill-Gleichung bestimmte Parameter ermittelt werden, die sich sehr gut eignen, um die Aktivität des Coenzym zu bewerten. Der Vergleich von TatA-Proteinen aus unterschiedlichen Organismen hinsichtlich ihrer katalytischen Aktivität könnte weitere Informationen darüber liefern, in welcher Art und Weise TatA seine Funktion im Tat-abhängigen Transport ausübt oder welche Bereiche des TatA-Proteins eine funktionell essentielle Rolle besitzen. Damit können eventuell bestehende Modelle gestützt oder widerlegt werden.

6 Zielstellung

Gegenstand dieser Arbeit war die Etablierung eines neuen Modellsystems (*Spinacia oleracea*) für den pflanzlichen Tat-abhängigen Proteintransport. Dieses sollte zunächst hinsichtlich der allgemeinen Transporteigenschaften charakterisiert und mit dem vorhandenen Modellorganismus (*Pisum sativum*) verglichen werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Tat-Translokasekomplexe in Spinat.

Da zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit die Sequenzen der Tat-Proteine aus Spinat noch nicht bekannt waren, sollten diese im Rahmen dieser Arbeit mittels PCR-Techniken identifiziert werden. Dies bot die Möglichkeit, Tat-Proteine und deren Antigene für weitere Analysen insbesondere durch heterologe Überexpression zu synthetisieren. Zudem sollten spezifische Antikörper gegen die Tat-Proteine aus Spinat generiert werden.

Nach der erfolgreichen Synthese und Aufreinigung des TatA-Proteins aus Spinat sollte dieses bezüglich seiner Eigenschaften und Besonderheiten im Tat-abhängigen Proteintransport untersucht werden. Kernpunkt dieser Analyse war die Bestimmung und Bewertung der katalytischen Aktivität dieses Proteins im Vergleich mit dem Homolog aus *Arabidopsis*, welches dahingehend bereits durch Hauer *et al.* (2013) charakterisiert wurde. Durch die analoge Untersuchung von TatA aus Erbse sollte damit ein Vergleich der katalytischen Aktivität von drei TatA-Proteinen aus unterschiedlichen Organismen durchgeführt werden.

MATERIAL & METHODEN

1 Material

1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien in p.a. Qualität wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Invitrogen (Karlsruhe) sowie im Falle der Radiochemikalien von Perkin-Elmer (Rodgau-Jügesheim) bezogen.

1.2 Längenstandards

Art	Bezeichnung	Hersteller
DNA-Marker	1 kb DNA <i>Ladder</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
Proteinmarker	<i>PageRuler™ Prestained Protein</i>	
	<i>Ladder</i>	Fermentas (St. Leon-Rot)
	<i>HMW Native Marker</i>	GE Healthcare (München)

1.3 Enzyme

Enzym	Hersteller
Restriktionsendonukleasen	
<i>Hind</i> III; <i>Sal</i> I; <i>Nco</i> I; <i>Xho</i> I; <i>Not</i> I; <i>Xba</i> I; <i>Sac</i> I; <i>Bam</i> H I; <i>Nde</i> I	Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>Phusion™</i> Hot Start DNA-Polymerase	Thermo Scientific (Karlsruhe)
<i>Taq</i> -DNA- Polymerase	Biomaster (Windeck)
<i>PfuTurbo®</i> DNA-Polymerase	Stratagene (La Jolla, USA)
T4-DNA-Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot)
M-MLV Reverse Transcriptase	Promega (Mannheim)
T7-RNA-Polymerase	Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>RiboLock™</i> Ribonuklease-Inhibitor	Fermentas (St. Leon-Rot)
Thermolysin	Sigma-Aldrich (München)

1.4 Nukleotide und Oligonukleotide

Das RNA-Cap-Strukturanalogon wurde von New England Biolabs (Frankfurt/Main), die Ribonukleotide von Fermentas (St. Leon-Rot) bzw. Sigma (München) und die Desoxyribonukleotide von Roth (Karlsruhe) bezogen. Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide aufgelistet.

bereits vorhandene Primer zur Sequenzierung:

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
M13 fw	GGTTTTCCCAGTCACGACGTTG
M13 rev	CACACAGGAAACAGCTATGACC
T7 promotor	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
pIVEX rev seq 2	CGGACACAATCCGTTATTTATTATG

degenerierte Primer für Sequenz-Identifizierung:

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
deg TatB 1 fw	TGCKTCYCTSTTTGGDGTGGAGC
deg TatB 2 fw	GTTGGAGCWCCYGARGCWYTGGT
deg TatB 3 rev	TCTCTAATWGTKGGYTGRAA
deg TatB 4 rev	TTGASACATCCTGKAKYTCTCTAAT
deg TatC 1 fw	CCTGGNGAATTTTTCTTYAC
deg TatC 2 fw	CCTGCDGCVTTRAAYTTCTT
deg TatC 3 rev	ATNGACCAYARHGATTCHAC
deg TatC 4 rev	CCDACHACMACATAYCTCCA

spezifische Primer für Sequenz-Identifizierung:

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
TatA loop fw (René Hauer)	CAGTTACCGGAAATTGGCCGG
TatB IM fw	GTTGTTGCTTTATTGTTTTCCGGG
TatC spez fw	TTCAGTACAGGGTTGTCTTTCC
oligo(dt) plus	GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTT
TatA Cterm rev	TTTAGACGACGATGCAACATTTTC
TatB Cterm rev	TAAGTAATCCTCACTAGAATATGC
TatC spez rev	GGAAAGACAACCCTGTACTGAA
5 Prime Race innen (FirstChoice® RLM-RACE Kit)	CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATG
5 Prime RACE außen (FirstChoice® RLM-RACE Kit)	GCTGATGGCGATGAATGAACACTG

spezifische Primer für Klonierung:

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
TatA mat <i>Bam</i> H I fw	GGATCCATGAACTCGTTGTTGGGCTT
TatA Stop <i>Xho</i> I rv	CTCGAGTTAAGAACTCTCTTTAGACGA
TatA <i>hinge</i> fw <i>Nco</i> I neu	CCATGGGCCCCAAACAGTTACCGGAAATTGGCCGG
TatA rev <i>Xho</i> I neu	CTCGAGAGAACTCTCTTTAGACGACGATGCAACATT
TatB <i>hinge</i> fw <i>Nco</i> I neu	CCATGGGGCCTAAAGGGCTAGCTGAGGTTGCTCGA
TatB rev <i>Not</i> I neu	GCGGCCGCGGATTCCTCTCAGTTTTCTGGACTGA
TatC fw LD <i>Nco</i> I	GCGCCCATGTTTGTGTTTGCAGTTGACGATTTCAAGG
TatC rev LD <i>Xho</i> I	GCGCCTCGAGTCTCTGTCTGAAGCTCCTCTAGGTGATCC

1.6 verwendete Tat-Proteine und Tat-Antigene

Protein	Art der Expression	Eigenschaften	Herkunft
TatA (<i>Arabidopsis</i>)	Heterologe Expression	reifes Protein ohne Start-Met	Dr. M. Jakob
TatA (Erbse)	Heterologe Expression	reifes Protein ohne Start-Met	Dr. M. Jakob
TatA (Spinat)	Heterologe Expression	reifes Protein ohne Start-Met	diese Arbeit
ch Ara L27 <i>Sp</i> TatA (<i>Arabidopsis</i> / Spinat)	Heterologe Expression	reifes Protein ohne Start-Met, chimäres Konstrukt	diese Arbeit
ch Ara S74 <i>Sp</i> TatA (<i>Arabidopsis</i> / Spinat)	Heterologe Expression	reifes Protein ohne Start-Met, chimäres Konstrukt	diese Arbeit
ch <i>Sp</i> P57 Ara TatA (Spinat/ <i>Arabidopsis</i>)	Heterologe Expression	reifes Protein ohne Start-Met, chimäres Konstrukt	diese Arbeit
TatA Antigen (Spinat)	Heterologe Expression	Antigen mit C-terminalem <i>His</i> -Tag	diese Arbeit
TatB Antigen (Spinat)	Heterologe Expression	Antigen mit C-terminalem <i>His</i> -Tag	diese Arbeit
TatC Antigen (Spinat)	Heterologe Expression	Antigen mit C-terminalem <i>His</i> -Tag	diese Arbeit
<i>RTS</i> -TatA (<i>Arabidopsis</i>)	<i>RTS</i> -Reaktion	reifes Protein	diese Arbeit
<i>RTS</i> -TatA (Erbse)	<i>RTS</i> -Reaktion	reifes Protein	diese Arbeit
<i>RTS</i> -TatA (Spinat)	<i>RTS</i> -Reaktion	reifes Protein	diese Arbeit

1.7 Antikörper

Antikörper	Eigenschaften	Herkunft
α TatA (<i>Arabidopsis</i>)	gerichtet gegen TatA aus <i>Arabidopsis</i> , erkennt TatA aus Erbse	Dr. M. Jakob
α TatA (Spinat)	gerichtet gegen TatA aus Spinat	Innovagen (Lund)
α TatB (Spinat)	gerichtet gegen TatB aus Spinat	Innovagen (Lund)
α TatC (Spinat)	gerichtet gegen TatC aus Spinat	Innovagen (Lund)
<i>AntiRabbit</i> -IgG Peroxidase- Konjugat	erkennt sämtliche hier verwendete primäre Antikörper, gekoppelt mit Peroxidase	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)

1.8 Reaktionskits

Bezeichnung	Hersteller
<i>NucleoSpin®Plasmid</i>	Macherey-Nagel (Düren)
<i>Nucleobond®AX</i>	Macherey-Nagel (Düren)
<i>NucleoSpin®Extract</i>	Macherey-Nagel (Düren)
<i>SureClean Plus</i>	Bioline (Luckenwalde)
<i>TOPO® TA Cloning Kit</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>BigDye®Terminator v3.1 Sequencing Kit</i>	Applied Biosystems (Darmstadt)
<i>Flexi®Rabbit Reticulocyte Lysate System</i>	Promega (Mannheim)
<i>RNeasy Plant Mini Kit</i>	Qiagen (Hilden)
<i>Oligotex mRNA Mini Kit</i>	Qiagen (Hilden)
<i>FirstChoice® RLM-RACE Kit</i>	Thermo Scientific (Karlsruhe)
<i>RTS 100 Wheat Germ CECF Kit</i>	5 Prime (Hilden)

1.9 Antibiotika

Antibiotikum	verwendete Konzentration	Hersteller
Ampicillin (Amp)	100 µg/ml	Serva (Heidelberg)
Kanamycin (Kan)	50 µg/ml	Serva (Heidelberg)

Die frisch hergestellten Antibiotika-Lösungen wurden vor der Verwendung sterilfiltriert und in 500 µl-Aliquots bei -20°C gelagert.

1.10 Kulturmedien

Zur Herstellung der Kulturmedien wurden folgende Chemikalien verwendet:

Bezeichnung	Hersteller
Bakterienpepton	Difco Laboratories (Detroit, USA)
Bacto-Agar	BD Biosciences (Erembodegem, Belgien)
Hefeextrakt	Roth (Karlsruhe)

Medium	Bestandteile	Konzentration
LB-Medium	Bakterienpepton	1 % (w/v)
	Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
	NaCl	0,5 % (w/v)
	eingestellt auf pH 7,0	
LB-Amp-Agarplatten	LB-Medium	
	Bacto-Agar	1,5 % (w/v)
	Ampicillin	100 µg/ml
LB-Kan-Agarplatten	LB-Medium	
	Bacto-Agar	1,5 % (w/v)
	Kanamycin	50 µg/ml
Soc-Medium	Bakterienpepton	2 % (w/v)
	Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
	MgCl ₂	10 mM
	MgSO ₄	10 mM
	Glucose	20 mM
eingestellt auf pH 7,0 (Hanahan, 1983)		

1.11 Säulenmaterial und Membranen

verwendetes Material		Hersteller
Säulenmaterial	<i>Ni Sepharose™ 6 Fast Flow</i>	GE Healthcare (Uppsala)
	<i>NHS-activated Sepharose Fast Flow</i>	GE-Healthcare (Uppsala)
Dialyseschläuche	<i>ZelluTrans /Roth V 1,0V</i>	Roth (Karlsruhe)
	<i>MEMBRA-CEL® dialysis tubing, MWCO 3500</i>	Serva (Heidelberg)
PVDF-Membran	<i>Amersham Hybond SEQ 0.2 PVDF</i>	GE-Healthcare (Uppsala)

1.12 Pflanzenmaterial

Für die Präparation von Chloroplasten und Thylakoiden aus Erbse wurden 7-8 Tage alte, in Erde und unter Langzeitbedingungen angezogene Erbsenkeimlinge (*Pisum sativum* L., Var. „*Feltham First*“) verwendet.

Die verwendeten Spinatpflanzen (*Spinacia oleracea* L., Sorte „*Lina*“) wurden in einer hydroponischen Kultur in Nährlösung (siehe untenstehende Tabelle) unter ständiger Belüftung unter Kurztagbedingungen angezogen. Nach 3-4 Monaten wurden die Blätter geerntet und für die Chloroplastenpräparation bzw. die RNA-Präparation verwendet.

Komponente	Bestandteile	Konzentration
Nährsalze	KNO ₃	6 mM
	Ca(NO ₃) ₂	4 mM
	MgSO ₄	2 mM
	KH ₂ PO ₄	2 mM
	Fe-EDTA	0,04 mM
Spurenelemente	H ₃ BO ₃	46 µM
	MnCl ₂ x 4H ₂ O	9 µM
	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,77 µM
	CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,32 µM
	Na ₂ MoO ₄	0,12 µM

2 Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Standardmethoden

Standardmethoden der Molekularbiologie, wie z.B. DNA-Restriktion, Transformation, Agarosegel-Elektrophoresen oder DNA- und RNA-Fällung wurden basierend auf den Protokollen von Sambrook und Russell (2001) durchgeführt. Die Isolierung von RNA aus Blattmaterial von Spinat, Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen und deren Sequenzierung erfolgten mit entsprechenden Kits nach Angaben der Hersteller (siehe Kapitel 1.9).

2.1.2 Identifizierung der Sequenzen für die Tat-Komponenten aus Spinat

2.1.2.1. RNA-Präparation und cDNA-Synthese

Für die Bestimmung der DNA-Sequenz der Tat-Komponenten aus Spinat wird eine cDNA-Bibliothek für den entsprechenden Organismus benötigt, die im Rahmen dieser Arbeit selbst generiert wurde. Dazu wurde zunächst aus 100 mg Blattmaterial mithilfe des *RNeasy Plant Mini Kit* die Gesamt-RNA präpariert. Aus dieser RNA-Präparation wurde über ein weiteres Kit (*Oligotex mRNA Mini Kit*) die mRNA isoliert, mit welcher im Anschluss die cDNA-Synthese durchgeführt wurde.

cDNA-Synthese:

PCR-Komponente	Mengenangabe	Volumen
M-MLV-RT –Puffer	5x	7,5 µl
mRNA		13 µl
Oligo d(T) Primer	10 pmol/µl	10 µl
dNTP`s	10 mM	2,5 µl
DTT	100 mM	5 µl
M-MLV-Reverse Transkriptase	200 U/µl	1 µl
Wasser		11 µl
		gesamt 50 µl

Der Ansatz wurde für 1 h bei 42°C inkubiert, die Reaktion wurde für 15 min bei 72° gestoppt.

2.1.2.2. Identifizierung eines zentralen Genabschnitts mithilfe von degenerierten Primern

Typischerweise beginnt die Identifizierung eines Gens mit der Bestimmung eines zentralen Abschnitts, der eine konservierte Sequenz aufweist. Dies sind z.B. Bereiche, die für spezielle funktionelle Domänen im Protein codieren. Innerhalb dieser Bereiche ist die Variabilität in der Sequenz besonders gering. Diese Ähnlichkeit kann zur Identifizierung von Genen ausgenutzt werden. Dies geschieht mithilfe von degenerierten Primern, die ein Gemisch von Oligonukleotiden darstellen, das alle möglichen Kombinationen für die variierenden Positionen beinhaltet. Somit wird sichergestellt, dass mindestens ein individueller Primer an die cDNA binden kann. Für das Design der degenerierten Primer wird in der Regel ein Sequenz-*Alignment* homologer Vertreter des zu untersuchenden Proteins auf Aminosäureebene

genutzt. Da diese Methode in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht zum Erfolg führte, wurde aufgrund der hohen cDNA-Sequenzähnlichkeit das Primerdesign mithilfe eines neuen *Alignments* auf DNA-Ebene durchgeführt (siehe Abb. 5). Im Ergebnis werden vier Primer abgeleitet, die jeweils ein äußeres und ein inneres Primerpaar bilden. Die beiden *forward* gerichteten Primer überschneiden sich in ihrer Sequenz genauso wie die beiden *reverse* Primer.

	äußerer Primer fw: <u>TGCKTCYCTSTTTGGDGTGGAGC</u>	
TatB <i>Arabidopsis thaliana</i>	AAGAGTATGATGATTCGTGCGTCTCTGTTTGGTGTGGAGCACCTGAGGCTTTGGTTATT	291
TatB <i>Pisum sativum</i>	AAGGGTAAGGTTGTTTATGCGTCTCTCTTTGGGGTTGGAGCACCTGAAGCTTTGGTAATT	300
TatB <i>Zea mays</i>	CGCAGAAACGTTATATGTGCTTCCCTGTTTGGAGTTGGAGCTCCCCGAAGCACTGGTCATT	243
	innerer Primer fw: <u>GTTGGAGCWCCYGARGCWYTGTT</u>	
TatB <i>Arabidopsis thaliana</i>	GGTGTGTTGCTTTGTTAGTCTTTGGTCCTAAAGGTCTTGCTGAGGTAGCTCGGAATCTT	351
TatB <i>Pisum sativum</i>	GGGGTTGTGGCTTTGTTGGTTTTTGGTCCTAAAGGTCTTGCTGAGGTGCTCGAAATCTG	360
TatB <i>Zea mays</i>	GGAGTAGTCGCCTTGTGGTATTTCGGCCCCAAGGGCTAGCAGAGGTAGCCAGGAATTTG	303
	innerer Primer rv: <u>TTYCARCCMACSATTAGAGAR</u>	
TatB <i>Arabidopsis thaliana</i>	GGAAAACTCTGCGTACATTTTCAGCCAACGATTAGAGAGCTACAGGATGTTTCAAGAGAT	411
TatB <i>Pisum sativum</i>	GGAAAAACATGCGTGAATTTCAACCCACCATTAGAGAAATCCAGGATGTTTCAAGGGAG	420
TatB <i>Zea mays</i>	GGGAAGACTTTGCGTGTCTTCCAACCAACCATTAGAGAGCTACAGGATGTATCAAGGGAG	363
	äußerer Primer rv: <u>TTAGAGARMTMCAGGATGTWTCAA</u>	

Abbildung 5: DNA-Sequenzalignment zum Design von degenerierten Primern am Beispiel von TatB. Basierend auf der DNA-Sequenz eines konservierten Bereiches von TatB aus *Arabidopsis thaliana*, *Pisum sativum* und *Zea mays* wurde ein Alignment erstellt, mithilfe dessen nun die Sequenzen für degenerierte Primer abgeleitet wurden. Dabei wurden jeweils 2 Primerpaare generiert, eine Paar äußere Primer (in blau dargestellt) und ein Paar innere Primer (in rot dargestellt), die in einer *nested* PCR eingesetzt werden. Für die Primersequenz wurde die IUPAC-Nomenklatur verwendet (K= G oder T, Y= C oder T, S= G oder C, W= A oder T, R= A oder G, M= A oder C, D= A, G oder T). Für die reversen Primer wurde die erhaltene Sequenz nachträglich entsprechend komplementiert.

Die generierten Oligonukleotide bilden die Grundlage für eine sogenannte *nested*-PCR (siehe Abb. 6). Bei dieser speziellen Modifikation der Polymerase-Kettenreaktion werden zwei PCR-Läufe nacheinander durchgeführt. So wird das äußere Primerpaar in einer ersten Amplifikationsrunde eingesetzt. Als Ursprungsmaterial diente hier die in dieser Arbeit generierte cDNA-Bibliothek aus Spinat.

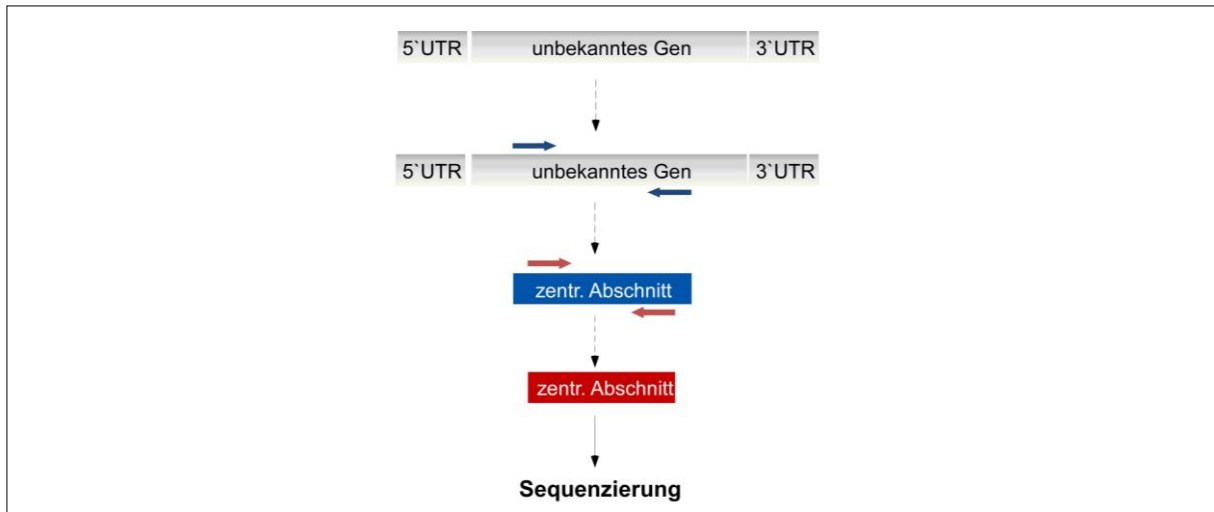


Abbildung 6: Identifizierung eines zentralen DNA-Abschnitts des unbekannten Gens mithilfe von degenerierten Primern. Nach dem Prinzip der *nested-PCR* wird zuerst das Ziel-Fragment mithilfe des äußeren Primerpaars (blaue Pfeile) amplifiziert. Das gereinigte PCR-Produkt wird darauf in einer zweiten PCR-Reaktion angereichert, wobei die innerliegenden Primer (rote Pfeile) spezifisch binden können. Nach einem Klonierungsschritt wird das entstandene DNA-Fragment einer Sequenzierung unterzogen.

PCR-Ansatz:

PCR-Komponente	Mengenangabe	Volumen
10x Pfu Puffer		5 µl
dNTP`s	10 mM	1 µl
Primer <i>fw</i>	10 pmol/µl	1 µl
Primer <i>rev</i>	10 pmol/µl	1 µl
Pfu Turbo-Polymerase	2,5 U/µl	1 µl
DNA- <i>template</i> (cDNA)		2 µl
Wasser		39 µl
		gesamt 50 µl

PCR-Programm:

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
initiale Denaturierung	95 °C	2 min	1
Denaturierung	95 °C	30 s	} 30
Annealing	60-70 °C	1 min	
Extension	72 °C	1 min/ kb	
finale Extension	72 °C	10 min	1

Die Temperaturen für den *Annealing*-Schritt wurden spezifisch für die Primer-Paarungen angepasst.

Mittels der ersten PCR-Reaktion wurde ein DNA-Fragment amplifiziert, das über Gel-Extraktion gereinigt und für die zweite PCR eingesetzt wurde (identisches PCR-Programm). Da die inneren Primer unter anderem an Sequenzbereiche der äußeren Primer binden, konnte nun spezifisch das im ersten Schritt amplifizierte DNA-Fragment angereichert werden (siehe Abb. 6). Dieses wurde mittels Gel-Extraktion gereinigt. Eine Klonierung des PCR-Produktes in den *pCR™2.1-TOPO®* Vektor sollte die Sequenzierung dieses DNA-Fragmentes ermöglichen. Zuvor war es jedoch notwendig, mithilfe der Taq-Polymerase eine Poly-A-Sequenz an das 3'-Ende des PCR-Produktes anzuhängen, denn diese bildet die Voraussetzung für eine erfolgreiche Klonierung mithilfe des *TOPO® TA Cloning Kit*.

Taq-Tailing-Reaktion

Komponente	Mengenangabe	Volumen
DNA-template	150 ng	X µl
dATP	10 mM	1 µl
10x Taq-Puffer		5 µl
Taq-Polymerase	5 U/µl	0,2 µl
Wasser		ad 50 µl
Der Ansatz wurde für 30 min bei 72°C inkubiert		gesamt 50 µl

Nach erfolgreicher Klonierung und Transformation des entstandenen Vektors in *E. coli* konnte das erhaltene Produkt für eine Sequenzierungsreaktion eingesetzt werden. So konnte für TatB und TatC ein zentral liegender Abschnitt des entsprechenden Gens identifiziert werden. Für TatA war ein solcher Abschnitt bereits aus einer früheren Arbeit innerhalb der Arbeitsgruppe (Bachelorarbeit Kristin Schönefeld, 2010) bekannt.

Ausgehend von dem jeweiligen zentralen Abschnitt konnte nun für alle drei Tat-Gene die Identifizierung des 5'- und 3'-Bereiches vorgenommen werden. Dies wird typischerweise über 3' RACE und 5' RACE durchgeführt (siehe Abb. 7). Beide Prinzipien basieren auf einer einfachen PCR-Reaktion mit spezifisch gewählten Primern. Dabei wird jeweils ein genspezifischer Primer genutzt, der jeweils mithilfe des bereits bekannten DNA-Abschnitts generiert wird und innerhalb des Gens bindet. Der zweite Primer bindet dann an das 5'- bzw. 3'-Ende der cDNA. Für die Sequenzanalyse des 3'-Endes konnte die Original-cDNA verwendet werden, für das 5'-Ende war eine Modifizierung notwendig.

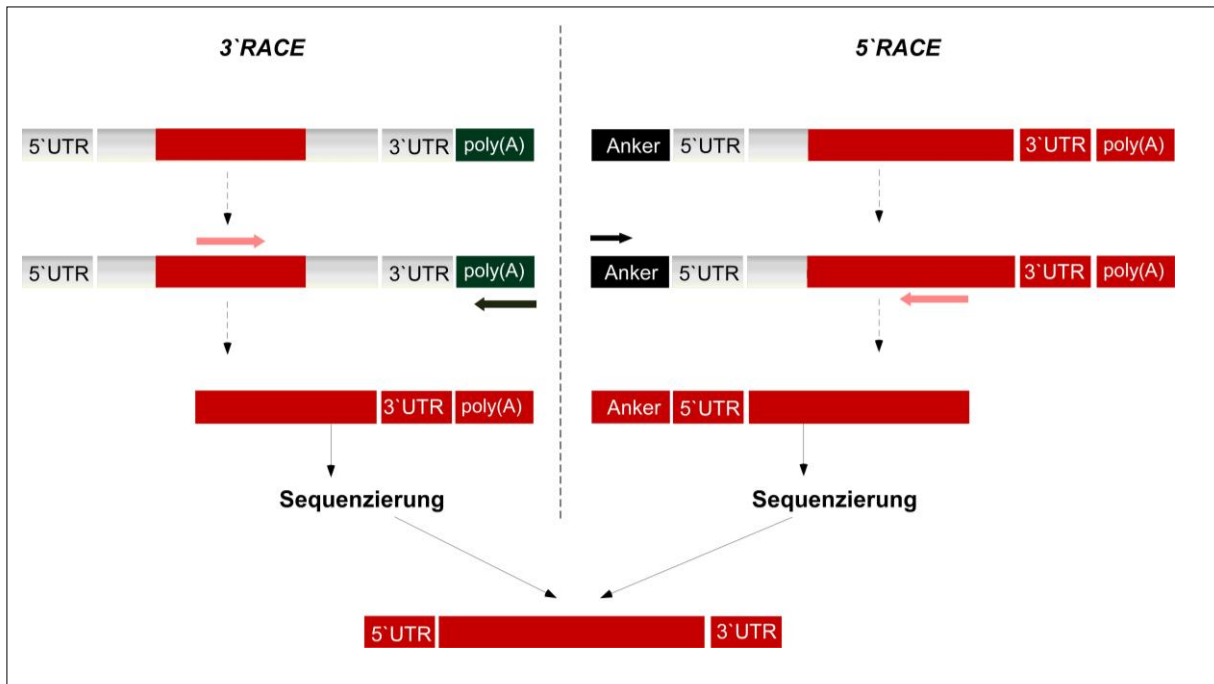


Abbildung 7: Identifizierung eines zentralen DNA-Abschnitts des unbekanntes Gens mithilfe von 3' / 5' RACE. Sowohl 3' RACE als auch 5' RACE basieren auf einer einfachen PCR-Reaktion mithilfe eines genspezifischen Primers (rote Pfeile), der anhand der schon identifizierten Sequenz (in rot dargestellt) generiert wurde, und einem Primer, der entweder an die Poly(A)-Sequenz (grüner Pfeil) oder eine manuell angefügte Ankersequenz (schwarzer Pfeil) spezifisch bindet. Nach einem Klonierungsschritt wird das entstandene DNA-Fragment einer Sequenzierung unterzogen.

2.1.2.3. Identifizierung des 3'-Bereiches: 3' RACE

Die Bestimmung des 3'-Bereiches der jeweiligen cDNA folgte dem Prinzip der 3' RACE. Ausgangspunkt für diese Methode bildet die poly(A)-Sequenz einer eukaryotischen, cytoplasmatischen mRNA. An dieser Verlängerung wird ein oligo (dT)-Primer angelagert und somit die eigentliche cDNA Synthese gestartet. Dieser Primer kann in der später folgenden Amplifikation des 3'-Endes des Gens als *reverse* Primer verwendet werden. Für das *forward* gerichtete Gegenstück wird eine kurze DNA-Sequenz aus dem bereits bekannten Abschnitt (in Abb. 7 in rot dargestellt) gewählt. Nach erfolgter PCR-Reaktion sollte nun im amplifizierten Produkt (vom genspezifischen Primer an) der 3'-Bereich des Gens inklusive der 3'-UTR enthalten sein. Das PCR-Produkt konnte nun wiederum nach einer *Taq-Tailing*-Reaktion und darauffolgender Klonierung in den *pCR™2.1-TOPO®* Vektor zur Sequenzierung herangezogen werden.

2.1.2.4. Identifizierung des 5`-Bereiches: 5` RACE

Für die 5` RACE war es notwendig, die vorhandene cDNA zu modifizieren. Dies geschah mithilfe des *5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends* (Thermo Fisher Scientific). Hierbei erfolgt nach cDNA-Synthese die Ligation einer spezifischen Ankersequenz an das 5`-Ende. Diese fungiert in der anschließenden PCR-Reaktion als Bindestelle für den *forward* Primer. Ähnlich der 3` RACE wird der *reverse* Primer spezifisch anhand der schon bekannten Sequenz generiert. Nach der Amplifikation sollte nun ein DNA-Fragment entstanden sein, welches das komplette 5`-Ende der cDNA inklusive der 5`-UTR enthält. Es folgte erneut nach einer *Taq-Tailing*-Reaktion die Klonierung in den *pCR™2.1-TOPO®* Vektor und die Sequenzierung des amplifizierten Produktes.

Es standen nun Sequenzdaten für den 5`-Bereich sowie den 3`-Bereich der jeweiligen cDNA zur Verfügung, die digital zu jeweils einer Gesamtsequenz zusammengefasst wurden. Anschließend konnten anhand dieser Gesamtsequenz spezifische Primer generiert werden, um den kompletten codierenden Bereich für ein Protein aus der cDNA amplifizieren zu können.

2.1.3 Klonierungsmethoden

2.1.3.1. Klonierung der cDNA für die Tat-Komponenten aus Spinat

Die codierenden Bereiche für die Tat-Komponenten aus Spinat wurden durch PCR basierend auf der synthetisierten cDNA amplifiziert (PCR-Ansatz und Programm: siehe Kapitel 2.1.2.2), mittels Taq-Polymerase mit einer Poly-A-Sequenz versehen und mittels des *Topo TA cloning Kits* in den *pCR™2.1-TOPO®* Vektor kloniert. Die Fragmente wurden anschließend mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (siehe Kapitel 1.5) ausgeschnitten und nach einem Reinigungsschritt über Ligation in den vorgeschrittenen pET28a / pET30a - Vektor inseriert. Die erhaltenen Plasmide wurden mittels Transformation in *E. coli*-Zellen gebracht und der Erfolg der Transformation durch eine Kolonie-PCR überprüft.

2.1.3.2. Konstruktion der TatA-Chimären über RF cloning

Für die Erstellung der TatA-Chimären wurde die Methode des *RF-clonings* (*restriction free cloning*, van den Ent und Löwe, 2006) angewendet. Diese bietet die Möglichkeit, DNA-Fragmente innerhalb eines Vektors direkt aneinander zu fusionieren (ohne dazwischen liegende Restriktionsstellen oder Linkersequenzen). In Abb. 8 ist das Prinzip dieser Methode am Beispiel der Chimäre ch Ara L27 *Sp* TatA dargestellt. Die Methode basiert auf zwei nacheinander folgenden PCR-Reaktionen. Im ersten PCR-Lauf wird zunächst das 5`-Ende des chimären TatA-Konstruktes amplifiziert, für das dargestellte Beispiel ist dies der codierende Bereich für den *Arabidopsis*-Anteil der Chimäre. Dieses PCR-Produkt besitzt durch spezifisches Primerdesign entsprechende Überhänge für den Zielvektor und den 3`-Bereich des TatA-Konstruktes (siehe Abb. 8) In einer darauffolgenden PCR wurde das gereinigte PCR-Produkt als Primer eingesetzt. Als *Template* dient im gezeigten Beispiel ein Plasmid, das die codierende Sequenz für Spinat-TatA trägt. Durch die entsprechenden Überhänge wird eine Bindung der Primer an den jeweiligen komplementären Strang vermittelt. Durch die anschließende Elongation entlang der *Template*-DNA wird direkt anschließend an den *Arabidopsis*-Teil der Spinat-Teil des TatA-Konstruktes amplifiziert. Es entsteht ein offenes Plasmid, das den codierenden Bereich für die entsprechende TatA-Chimäre beinhaltet. Dieses kann dann über Transformation in *E.coli* gebracht und vermehrt werden.

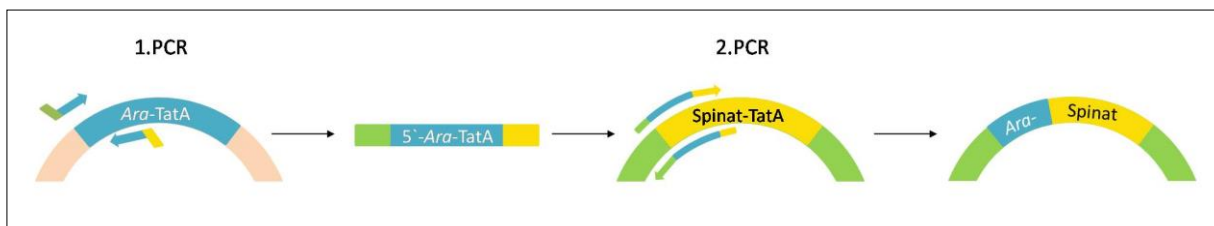


Abbildung 8: Schema des RF-clonings am Beispiel der Chimäre Ara L27 *Sp* TatA. In der ersten PCR-Reaktion wird der 5`-Bereich des TatA-Konstruktes (hier der *Arabidopsis*-Teil, in blau dargestellt) amplifiziert. Hierfür wurden spezielle Primer verwendet, die im resultierenden PCR-Produkt entsprechende Überhänge für den Zielvektor (in grün dargestellt) und den 3`-Bereich des TatA-Konstruktes (hier den Spinat-Teil, in gelb dargestellt) generieren. Dieses PCR-Produkt kann nun in einer zweiten PCR als Primer verwendet werden. Somit wird durch Amplifikation der 3`-Bereich direkt an den Primer fusioniert und es entsteht ein offenes Plasmid, das den codierenden Bereich für die gewünschte TatA-Chimäre beinhaltet.

Der PCR-Ansatz und das entsprechende Programm sind der genannten Publikation zu entnehmen. Die PCR-Produkte wurden anschließend unter Nutzung von SureClean Plus (Bioline, Luckenwalde) gereinigt (Elution in 30 µl Wasser). Die DNA-Konzentration wurde photometrisch unter Nutzung des NanoPhotometers (Implen, München) bestimmt (Absorption bei 260 nm). Die gereinigten PCR-Produkte wurden in einer zweiten PCR-Reaktion als Primer eingesetzt (siehe Abb. 8). Auch die zweite Reaktion wurde nach den Angaben in der Publikation durchgeführt.

Anschließend wurden 9 µl des Amplifikats mit 1 µl *DpnI* versetzt und für 1 - 1,5 h bei 37°C inkubiert. Der komplette *DpnI*-Verdau wurde in chemokompetente *E. coli* DH5α-Zellen transformiert.

2.1.4 *In vitro*-Synthese von Proteinen

Für die Synthese radioaktiv markierter Proteine waren zwei aufeinanderfolgende Reaktionen notwendig. Die *in vitro*-Transkription sowie die *in vitro*-Translation erfolgten wie in Molik (2005) und in Frielingsdorf (2003) beschrieben. Während der *in vitro*-Translationsreaktionen mit dem *Flexi*[®] *Rabbit Reticulocyte Lysate System* (Promega, Mannheim) sowie dem *RTS 100 Wheat Germ CECF Kit* (5 Prime, Hilden) wurden die synthetisierten Vorläuferproteine durch das Vorhandensein von ³⁵S-Methionin im Ansatz radioaktiv markiert.

2.2 Biochemische Methoden

2.2.1 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese

Puffer	Bestandteile	Konzentration
10x SDS-Laufpuffer	Tris/HCl pH 6,8	250 mM
	Glycin	1,92 M
	SDS	1 % (w/v)
4x SDS-Probenpuffer	Tris / HCl pH 6,8	250 mM
	Glycerin	40 % (v/v)
	SDS	8 % (w/v)
	β -Mercaptoethanol	20 % (v/v)
	Bromphenolblau	0,016 % (w/v)

Für einfache Analysen über SDS-PAGE wurden kontinuierliche SDS-Gele mit einer PAA-Konzentration von 15 % verwendet. Diese wurden nach erfolgter Elektrophorese entweder für 30 – 60 min fixiert und anschließend mittels Coomassie-Colloidal-Lösung gefärbt oder für Immunoblot-Analysen weiterverwendet. Für die Transportversuche wurden Gele verwendet, die einen PAA-Konzentrationsgradienten von 10-17,5 % beinhalteten (Dissertation Sabine Molik, 2005). Die Elektrophorese erfolgte basierend auf der Methode nach Laemmli (1970).

2.2.2 Native Polyacrylamid-Elektrophorese

Zur Auftrennung von Membrankomplexen der Thylakoidmembran wurde die *Blue Native*-PAGE (BN-PAGE) und zur Trennung der löslichen Proteinkomplexe des Stromas die *Colorless Native*-PAGE (CN-PAGE) angewendet (Schägger et al., 1994; Schägger und von Jagow, 1991). Beide Elektrophoresen wurden basierend auf den Protokollen von Molik (2005) durchgeführt.

2.2.3 BN-PAGE

Puffer	Bestandteile	Konzentration
Lysepuffer	ε-Aminocaprinsäure	1 M
	Bis-Tris	50 mM
	EDTA	5 mM
	DTT	1 mM
	MgCl ₂	0,5 mM
Digitonin-Lösung	Digitonin in H ₂ O	5 % (w/v)
BN-Probenpuffer	Coomassie G-250	5 % (w/v)
	ε-Aminocaprinsäure	500 mM
Kathodenpuffer I	Tricin	50 mM
	Bis-Tris	15 mM
	Coomassie G-250	0,0075 % (w/v)
Kathodenpuffer II	Tricin	50 mM
	Bis-Tris	15 mM
Anodenpuffer	Bis-Tris	50 mM

Um Proteinkomplexe der Thylakoidmembran aufzutrennen, wurden die Thylakoide (einer Chlorophyllmenge von 30 µg entsprechend) zunächst pelletiert und in 15 µl Lysepuffer resuspendiert. Unmittelbar danach wurden 7,5 µl Digitonin-Lösung zugegeben. Es folgte ein Inkubations-Schritt für 1 Stunde bei 4 °C auf dem Rotator (Saur, Reutlingen) sowie ein Zentrifugationsschritt für 20 Minuten bei 4 °C und 55000 rpm (Zentrifuge: OptimaTMMAX Ultracentrifuge, Rotor: MLA-80; Beckman coulter, Krefeld). Die Proteinkomplexe wurden so von nicht-solubilierten Membranen getrennt. Der erhaltene Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1,5 µl BN-Probenpuffer versetzt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 5 Minuten bei 4 °C und 55000 rpm (Zentrifuge: OptimaTMMAX Ultracentrifuge, Rotor: MLA-80; Beckman coulter, Krefeld). Der gesamte Überstand wurde auf ein *Blue Native*-Gradienten-Gel (5-13 % PAA) geladen. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel entweder für die Autoradiographie getrocknet oder für 2D- oder Immunoblot-Analysen weiterverwendet.

2.2.4 CN-PAGE

Puffer	Bestandteile	Konzentration
4x CN-Probenpuffer	Bis-Tris pH 7,0	250 mM
	Glycerin	50 % (v/v)
	Ponceau S	0,004 % (w/v)

Der für die *Colorless Native*-PAGE verwendete stromale Extrakt wurde (einer Chlorophyllmenge von 15 – 30 µg entsprechend) direkt mit CN-Probenpuffer versetzt und auf ein Gradientengel geladen, welches kein Digitonin enthielt. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht bei 4°C. Das CN-Gel wurde für eine 2D-Analyse weiterverwendet.

2.2.5 Auftrennung in der zweiten Dimension (2D-PAGE)

Puffer	Bestandteile	Konzentration
Denaturierungspuffer	1 x Laemmli-Laufpuffer	90 % (v/v)
	SDS	1 % (w/v)
	β-Mercaptoethanol	0,1 % (v/v)

Die 2D-PAGE schließt direkt an die Auftrennung in erster Dimension an und wird analog zur SDS-PAGE (Laemmli, 1970) durchgeführt. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei 40 °C in Denaturierungspuffer wurde der entsprechende Gelstreifen auf das vorbereitete SDS-Gel arrangiert und mit 1 % iger Agarose fixiert. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel entweder für die Autoradiographie getrocknet oder für Immunoblot-Analysen weiterverwendet.

2.3 **Visualisierung von Proteinen im Polyacrylamidgel**

Die kontinuierlichen PAA-Gele wurden entweder nach der Coomassie-Colloidal-Methode (Neuhoff *et al.*, 1985) oder mithilfe der Zink-Imidazol-Methode (Ferrerias *et al.*, 1993) gefärbt. Zur eindeutigen Detektion von Proteinen wurde eine Immunoblot-Analyse durchgeführt. Für Transportexperimente erstellte Gradientengele wurden entweder mittels Immunoblot oder Autoradiographie analysiert.

2.3.1 Coomassie-Colloidal-Färbung

Puffer	Bestandteile	Konzentration
Fixierlösung	Methanol	50 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
Coomassie-Colloidal-Färbelösung	Methanol	20 % (v/v)
	Coomassie Brilliant Blue G250	0,08 % (w/v)
	Ammoniumsulfat	6,7 % (w/v)
	Phosphorsäure	0,9 % (v/v)

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele 30-60 min in Fixierlösung inkubiert und anschließend mindestens drei Stunden in der Coomassie-Colloidal-Lösung gefärbt. Die Entfärbung erfolgte mit Wasser.

2.3.2 Immunoblot

Die Immunoblot-Analyse dient zum eindeutigen Nachweis von Proteinen. Die Übertragung der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte mithilfe eines 3-Puffer-Systems und wurde nach den Angaben der Firma Merck Millipore (Darmstadt) für einen *semi-dry*-Blot durchgeführt (*Protein Blotting Handbook*, 2012). Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran für mindestens 1 h in Blockierlösung inkubiert. Die Behandlung mit dem primären Antikörper (Verdünnung 1:1000) erfolgte für 2 h. Nicht gebundener Antikörper wurde durch viermaliges Waschen für 5 min mit Waschlösung I entfernt. Es folgte die Inkubation der Membran mit sekundärem Antikörper (*AntiRabbit-IgG* Peroxidase-Konjugat, Verdünnung 1:10000; Sigma-Aldrich, Deisenhofen) für 1 h und anschließend vier Waschschrte für 5 min mit Waschlösung II. Zur Visualisierung der Signale wurde die Membran mit ECL-Lösung versetzt, für 1 min inkubiert und in Frischhaltefolie auf einem ECL-Film (Hyperfilm-ECL, Amersham Biosciences, GE-Healthcare, Uppsala) für 30 min - 1 h exponiert. Der Film wurde abschließend mithilfe der entsprechenden Lösungen entwickelt (Entwickler und Fixierer; Sigma-Aldrich, Deisenhofen).

2.3.3 Autoradiographie

Diese Methode wurde zur Detektion von radioaktiv markierten Proteinen verwendet. Im Anschluss an die Auftrennung der Proben folgte eine 30-60 minütige Fixierung der Gele (Fixierlösung siehe Kapitel 2.3.1), bevor sie im Vakuum für 1,5-2,5 Stunden bei 80 °C getrocknet wurden. Zur Visualisierung wurden die getrockneten Gele für 2 - 3 Tage auf Phosphorimager Screens exponiert, welcher mittels Fujifilm FLA-3000 (Fujifilm (Düsseldorf)) und mithilfe des Programms BASReader (Raytest (Straubenhardt)) ausgelesen wurde. Zur Berechnung und Auswertung von Transportraten war eine Quantifizierung der erhaltenen Banden erforderlich. Dies wurde mit dem Programm AIDA Image Analyzer (Version 5,0; Raytest, Straubenhardt) ermöglicht.

2.4 Heterologe Überexpression und Reinigung der Tat-Antigene / TatA-Proteine

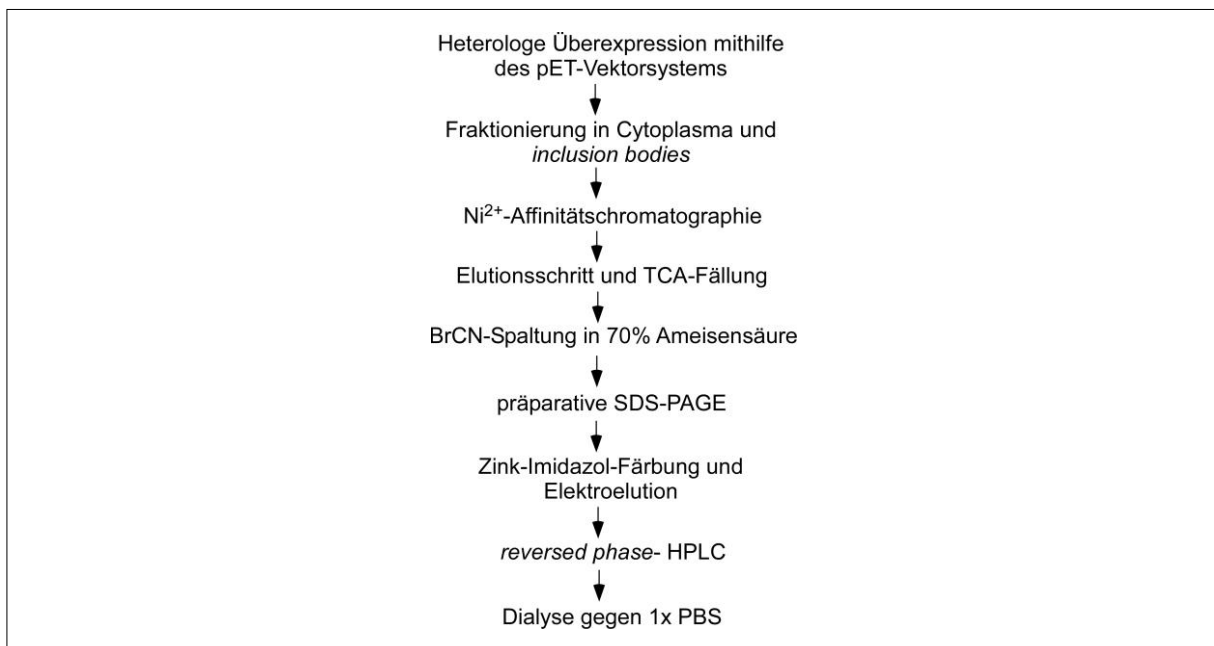


Abbildung 9: Prinzip der Reinigung der Tat-Antigene / TatA-Proteine aus Spinat nach heterologer Überexpression in *E. coli*. Für alle überexprimierten Proteine wurden die angegebenen Reinigungsschritte für die Cytoplasma-Fraktion durchgeführt, die *inclusion bodies*-Fraktion wurde nicht weiter bearbeitet. Für die Aufreinigung der Antigene wurde auf eine *Tag*-Abspaltung und die weitere Reinigung über *rp*-HPLC verzichtet. Die Reinheit der Proteine wurde über SDS-PAGE überprüft.

Der generelle Ablauf zur Synthese der Tat-Antigene und der reifen TatA-Proteine orientierte sich an dem beschriebenen Protokoll in Hauer *et al.* (2013) und beinhaltet verschiedene, auf unterschiedlichen Trennprinzipien basierende Reinigungsmethoden. In Abb. 9 ist der

generelle Ablauf schematisch dargestellt. Im Ergebnis sollte eine Proteinlösung mit zureichender Reinheit für die Quantifizierung mittels Bradford erhalten werden.

Die Expression wurde in LB-Medium durchgeführt. Für die Synthese der Antigene ist zu beachten, dass im Zuge der Reinigung auf eine *Tag*-Abspaltung und die weitere Reinigung über *rp*-HPLC verzichtet wurde. Die Antigene wurden direkt nach der präparativen SDS-PAGE und anschließenden Elektroelution lyophilisiert und der Firma Innovagen (Lund) zur Immunisierung übersandt.

2.5 Pflanzliche Methoden

2.5.1 Isolierung von Chloroplasten aus Spinat

Puffer	Bestandteile	Konzentration
Spinat-Isolationsmedium	Sorbit	330 mM
	HEPES / KOH pH 7,6	50 mM
	EDTA	2 mM
	MgCl ₂	1 mM
	MnCl ₂	1 mM
	Natriumascorbat	5 mM
PBF-Percoll-Stammlösung	PEG 6000	3 % (w/v)
	BSA	1 % (w/v)
	Ficoll	3 % (w/v)
	gelöst in Percoll	
45 % Percoll-Stufengradient	PBF-Percoll-Stammlösung	45 % (v/v)
	Sorbit	330 mM
	HEPES / KOH pH 7,6	50 mM
	EDTA	2 mM
	MgCl ₂	1 mM
85 % Percoll-Stufengradient	PBF-Percoll-Stammlösung	85 % (v/v)
	Sorbit	330 mM
	HEPES / KOH pH 7,6	50 mM
	EDTA	2 mM
	MgCl ₂	1 mM

Für die Isolierung von Chloroplasten aus Spinat (beschrieben in Dissertation Sabine Molik, 2005) wurden Blätter von 3-4 Monate alten Spinatpflanzen (*Spinacia oleracea*, Sorte „Lina“) verwendet (ca. 60 g ohne Mittelrippe). Alle Schritte erfolgten stets bei 4 °C oder auf Eis und unter Verwendung von abgeschnittenen Pipettenspitzen. Für die Sedimentation wurden die Zentrifugen Heraeus™ Multifuge™ X3 Universalzentrifuge (Rotoren: F14-6x 250 LE, F15-6x 100y) sowie Avanti™ J-25 (Rotoren: JA 14, JS 13.1, JA 25-50) verwendet.

2.5.2 Isolierung von Chloroplasten aus Erbse

Puffer	Bestandteile	Konzentration
SIM-Puffer	Saccharose	350 mM
	HEPES / KOH pH 7,8	25 mM
	EDTA	2 mM
5x SRM-Puffer	HEPES / KOH pH 8,0	250 mM
	Sorbit	1,65 M
1x SRM-Puffer	5x SRM-Puffer	20 % (v/v)
35 % iges Percollkissen	5x SRM-Puffer	20 % (v/v)
	Percoll	35 % (v/v)
	ddH ₂ O	45 % (v/v)

Für die Präparation von Chloroplasten und Thylakoiden wurden Erbsenkeimlinge (*Pisum sativum* L., Var. „Feltham First“) in Erde und unter Langzeitbedingungen angezogen und nach 7 – 8 Tagen geerntet (ca. 70 g). Die Isolierung der Chloroplasten (beschrieben in Diplomarbeit Stefan Frielingsdorf, 2003) erfolgte stets bei 4 °C oder auf Eis und unter Verwendung von abgeschnittenen Pipettenspitzen. Sämtliche Zentrifugationsschritte wurden mit der Zentrifuge Heraeus™ Multifuge™ X3 Universalzentrifuge (Rotoren: F14-6x 250 LE, F15 6x 100y) durchgeführt.

2.5.3 Bestimmung der Chlorophyllkonzentration

Je 5 µl der Chloroplastensuspension wurden mit je 995 µl 80 % igem Aceton versetzt, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge: Heraeus Biofuge fresco). Anschließend wurden die Absorptionswerte des Überstandes bei den Wellenlängen 645 nm und 663 nm photometrisch bestimmt (SHIMADZU UV-1602). Die Messung wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt, die erhaltenen Mittelwerte wurden zur Bestimmung der Chlorophyllkonzentration in folgende Formel eingesetzt (Arnon, 1949):

$$c_{\text{Chl}} [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = (20,2 \times A_{645} + 8,02 \times A_{663}) / 5$$

2.5.4 Präparation von Thylakoiden

Puffer	Bestandteile	Konzentration
HM-Puffer	HEPES / KOH pH 8,0	10 mM
	MgCl ₂	5 mM

Die Thylakoidpräparation erfolgte stets auf Eis oder bei 4 °C und mit entsprechend vorgekühltem Puffer. Für die Präparation wurde ein Volumen an Chloroplastensuspension entsprechend einer Chlorophyllkonzentration von 0,75 µg/µl in der finalen Thylakoidlösung abzentrifugiert (1 min bei 10000 rpm, Zentrifuge: Heraeus Biofuge fresco) und die Chloroplasten für 10 min in HM-Puffer osmotisch lysiert. Es folgte die Abtrennung des stromalen Extraktes durch Zentrifugation (5 min bei 10000 rpm). Anschließend wurden die Thylakoide mit HM-Puffer gewaschen (im Regelfall zwei Waschschriffe, wenn abweichend ist die Anzahl der Waschvorgänge im Experiment angegeben). Die finale Chlorophyllkonzentration im Ansatz betrug stets 0,75 µg/µl.

2.5.5 TatA-Antikörperbehandlung der Thylakoide zur Inhibierung des Tat-Transports

Ein benötigtes Volumen der Thylakoidsuspension wurde mit dem jeweiligen Antikörper versetzt (αTatA (*Arabidopsis*): 0,25 Vol.; αTatA (Spinat): 0,5 Vol.) Der Ansatz wurde für 30 - 45 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Thylakoide für 4 min bei 4 °C und 10000 rpm sedimentiert (Zentrifuge: Heraeus Biofuge fresco), zweimal mit HM-Puffer gewaschen und schließlich in HM-Puffer zu einer Ausgangskonzentration von 0,75 µg Chlorophyll /µl resuspendiert.

2.5.6 Rekonstitution des Tat-Transports durch Zugabe von überexprimiertem TatA

Für jeden Rekonstitutionsansatz wurden 40 µl mit Antikörper behandelte Thylakoide für 4 min bei 4 °C und 10000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge: Heraeus Biofuge fresco). Das Thylakoidsediment wurde anschließend entweder in 45 µl HM-Puffer oder TatA-Lösung resuspendiert. Dabei wurden zuvor für jeden Ansatz einzelne Verdünnungsstufen von überexprimiertem TatA in HM-Puffer in einer bestimmten Endkonzentration hergestellt. Die Konzentrationsbestimmung der Tat-Stammlösung beruhte auf der Bradford-Methode (Bradford, 1976) und wurde jeweils unmittelbar vor Verwendung durchgeführt.

2.5.7 In thylakoido-Transportexperimente

Puffer	Bestandteile	Konzentration
HME-Puffer	1x HM-Puffer	
	EDTA	10 mM
Thermolysin-Lösung	Thermolysin	2 mg/ml
	CaCl ₂	25 mM

Der *in thylakoido*-Transportansatz wurde jeweils in einem Volumen von 50 µl angesetzt. Diese setzten sich für den Fall der Transportkontrolle aus 40 µl einer frisch präparierten Thylakoidsuspension (Konzentration: 0,75 µg Chlorophyll/µl), versetzt mit 5 µl HM-Puffer zusammen. Für die Rekonstitutionsansätze wurden 45 µl der bereits mit Antikörper vorbehandelten und mit HM-Puffer oder TatA-Lösung versetzten Thylakoide verwendet. Durch Zugabe von 5 µl *in vitro*-translatiertem und radioaktiv markierten Substrat wurde die Transportreaktion gestartet. Die Ansätze wurden für eine bestimmte Zeit bei 25 °C im belichteten Wasserbad inkubiert, zum Stoppen des Transports mit 50 µl HM-Puffer versetzt und sofort zentrifugiert (4 min bei 4 °C und 10000 rpm, Zentrifuge: Heraeus Biofuge fresco). Daraufhin wurde das Thylakoidsediment mit 170 µl HM-Puffer gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 200 µl HM-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 100 µl einer Fraktion (+) mit 10 µl Thermolysin-Lösung versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Proteasebehandlung wurde durch die Zugabe von 100 µl HME-Puffer gestoppt. Die übrigen 100 µl stellten die unbehandelte Fraktion (-) dar. Beide Ansätze wurden für 4 min bei 4 °C und 10000 rpm sedimentiert und in jeweils 50 µl 2 x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen. Abschließend wurden sämtliche Proben für 4 min bei 95 °C denaturiert und je 25 µl auf ein SDS-PAA-Gradientengel geladen.

ERGEBNISSE

1 Untersuchung des Tat-abhängigen Proteintransports im Modellorganismus *Spinacia oleracea*

Um die Tat-abhängige Transportkompetenz der Thylakoide von Spinat (*Spinacia oleracea*) zu testen, wurden zunächst Chloroplasten von jungen Blättern in Hydrokultur angezogener, 4 - 16 Wochen alter Pflanzen gewonnen. Das für die Präparation verwendete Protokoll stammt aus Transportversuchen mit intakten Spinatchloroplasten (Dissertation Sabine Molik, 2005). Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf die sorgfältige Abtrennung von Stärke aus der Plastidensuspension gelegt, da aufgrund des Entwicklungsstadiums der Blätter im Vergleich zu den parallel verwendeten 7-8 Tage alten Erbsenkeimlingen der Stärkeanteil wesentlich höher war und für die Transportversuche störend sein könnte. Die Gewinnung von Erbsenchloroplasten und -thylakoiden erfolgte nach Hou *et al.* (2006). Die Präparation von Spinatthylakoiden wurde nach dem Protokoll für das Erbsensystem durchgeführt.

1.1 Erste *in thylakoido*-Transportexperimente

Die mit dem gewonnenen Thylakoidmaterial durchgeführten Versuche zum Tat-abhängigen Proteintransport orientierten sich grundlegend am Standardprotokoll. So wurde zunächst die frisch präparierte Thylakoidsuspension mit radioaktiv markiertem und *in vitro*-synthetisiertem Vorläuferprotein versetzt. Die Transportreaktion erfolgte im belichteten Wasserbad bei 25 °C. Auf diese Weise wird ein Protonengradient über der Thylakoidmembran aufrechterhalten, welcher für den Tat-abhängigen Transport notwendig ist. Das Vorläuferprotein wird mithilfe der Tat-Translokase über die Thylakoidmembran transportiert und auf der luminalen Seite durch die Thylakoidprozessierungspeptidase zum reifen Protein umgesetzt (siehe Abb. 4). Zur Überprüfung eines erfolgreichen Transports wurde der Ansatz fraktioniert und ein Teil der Thylakoidsuspension einer Proteasebehandlung unterzogen. Hierfür wurde in den gezeigten Versuchen Thermolysin verwendet. Dadurch werden Vorläuferproteine, die nur an die Thylakoidmembran gebunden sind, aber den eigentlichen Transportvorgang noch nicht durchlaufen haben, proteolytisch abgebaut. Über SDS-PAGE und Autoradiographie kann das radioaktiv markierte Substratprotein in seiner

Für das 16/16 Protein (Abb. 10 (a)) zeigt sich ein erfolgreicher Transport in Erbsen- und Spinatthylakoide. Das Vorläuferprotein (p; 25 kDa) wurde zum reifen Protein (m; 16 kDa) umgesetzt, welches proteasegeschützt und somit auf der luminalen Seite der Thylakoidmembran lokalisiert ist. Auch das 16/23 Protein (Abb. 10 (b)) konnte erfolgreich in das Thylakoidlumen transportiert werden. Das Vorläuferprotein (p; 29 kDa) hat erfolgreich an die Thylakoidmembran gebunden, es folgte eine Tat-abhängige Translokation über die Membran und schließlich die Prozessierung zum reifen Protein (m; 23 kDa). Auffällig sind hier zwei zusätzlich auftretende Banden nach Thermolysinbehandlung. Diese Degradationsprodukte stellen die Translokationsintermediate Ti-1 und Ti-2 dar, welche erstmals von Berghöfer und Klösken (1999) beschrieben wurden. Allerdings ist zu beachten, dass Ti-1 als frühes Translokationsintermediat nach einer Transportdauer von ca. 10 min nur noch sehr schwach zu erkennen ist. Die Signalstärke von Ti-2 unterscheidet sich zwischen Erbsen- und Spinatthylakoiden deutlich. Dies wird im nachfolgenden Kapitel 1.2 näher erläutert.

Während unter Verwendung von Erbsenthylakoiden die Transportrate für die beiden eingesetzten Substratproteine stets relativ konstant ist (Daten nicht gezeigt), fällt für die Ansätze mit Spinatthylakoiden auf, dass die Signalstärke des reifen Proteins für beide Substrate von Versuch zu Versuch stark schwankt. Diese Variabilität in der Transportrate war so nicht zu erwarten, denn für jedes einzelne Experiment wurden die Präparations- und Transportbedingungen konstant gehalten. Nun stellt sich die Frage, worin die Unterschiede in der Transportrate begründet sind. Eine Möglichkeit wäre das Alter der Spinatpflanzen. Die für die Transportexperimente verwendeten Erbsenkeimlinge wurden jeweils nach 7-8 Tagen geerntet. Dagegen stehen für die Präparation von Spinatchloroplasten Pflanzen unterschiedlicher Alters- und Entwicklungsstufen (4-16 Wochen) zur Verfügung. Für jede Präparation wurde stets Blattmaterial sowohl von jüngeren als auch älteren Pflanzen verwendet, um die Bedingungen für den Transport stets möglichst konstant zu halten. Da das Verhältnis hier aber von Versuch zu Versuch schwanken kann, könnten dennoch unterschiedlich hohe Transportraten auftreten. Um diesen Sachverhalt zu klären, wurde der Transportversuch für das 16/23 Protein in Spinat wiederholt, wobei für die Präparation der Chloroplasten zwei unterschiedliche Altersstufen der Spinatpflanzen gewählt wurden (siehe Abb. 11; „jung“: < 4 Wochen; „alt“: > 12 Wochen). Alle weiteren Bedingungen wurden konstant gehalten, die Transportexperimente wurden in identischer Weise durchgeführt.

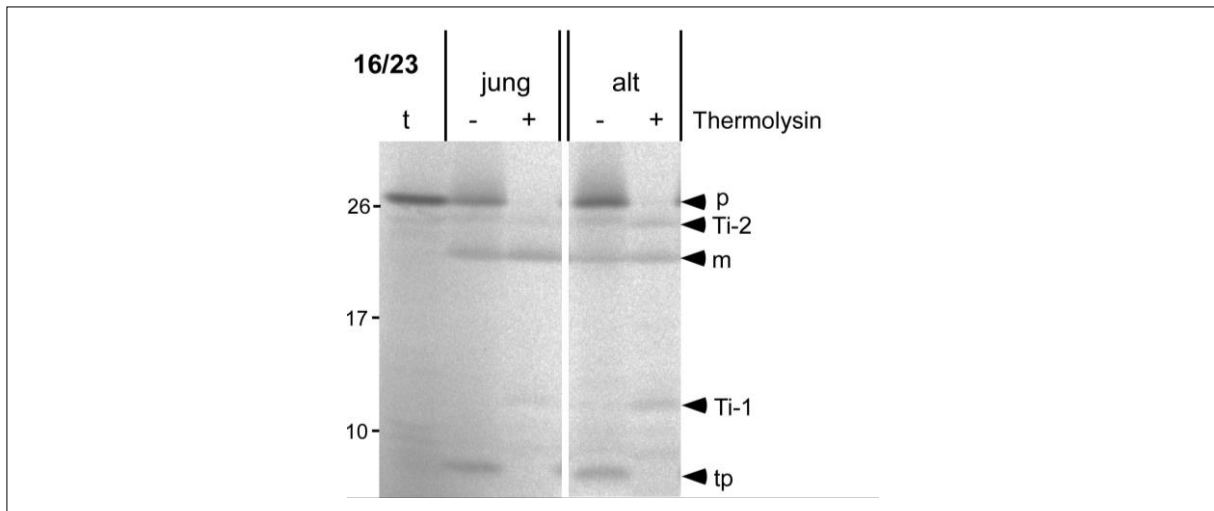


Abbildung 11: Vergleich des Tat-abhängigen Proteintransports in Thylakoiden aus „jungen“ und „alten“ Spinatpflanzen. Die Transportreaktion wurde mit Thylakoiden durchgeführt, die von Chloroplastenpräparationen aus Spinatpflanzen unterschiedlicher Altersstufen („jung“: < 4 Wochen; „alt“: > 12 Wochen) stammten. Die Transportdauer betrug 10 min. Auf der rechten Seite der Abbildung sind die entsprechenden Signale für reifes Protein (m), die Translokationsintermediate (Ti-1 und Ti-2) sowie das abgespaltene Transitpeptid (tp) gekennzeichnet. Für weitere Details, siehe Abb. 10.

Es zeigte sich, dass der *in thylakoido*-Transport des 16/23 Proteins mit Thylakoidmaterial von „jungen“ und auch „alten“ Spinat-Pflanzen in gleichem Maße erfolgreich war (siehe Abb. 11). Das Signal des reifen Proteins ist deutlich zu erkennen und es zeigen sich nur geringe Unterschiede in der Intensität zwischen beiden Ansätzen. Lediglich das gebundene Vorläuferprotein in der (-) Spur und die Translokationsintermediate in der (+) Spur sind für den Transport mit Thylakoiden aus „altem“ Pflanzenmaterial etwas deutlicher zu erkennen. Somit ist die in Abb. 10 beobachtete starke Variabilität in der Transportrate von Spinatthylakoiden nicht auf mögliche altersspezifische Ungleichmäßigkeiten in der Zusammensetzung des Blattmaterials zurückzuführen.

1.2 Zeitabhängigkeit des Tat-abhängigen Transports in Spinat

Zur weiteren Untersuchung des zu etablierenden Modellsystems Spinat wurde eine zeitabhängige Analyse des Transports angeschlossen (siehe Abb. 12). Hierfür wurde das 16/23 Protein als Substrat verwendet. Dessen retardiertes Transportverhalten bedingt im Autoradiogramm das Auftreten von zwei Translokationsintermediaten und erlaubt eine Aussage über den zeitlichen Verlauf und eventuelle Zwischenschritte des Transports. Da schon in Abb. 10 eine unterschiedliche Ausprägung der Translokationsintermediate in Erbsen- und

Spinatthylakoiden beobachtet werden konnte, wurde das folgende Experiment zum Vergleich ebenfalls mit Erbsenthylakoiden durchgeführt.

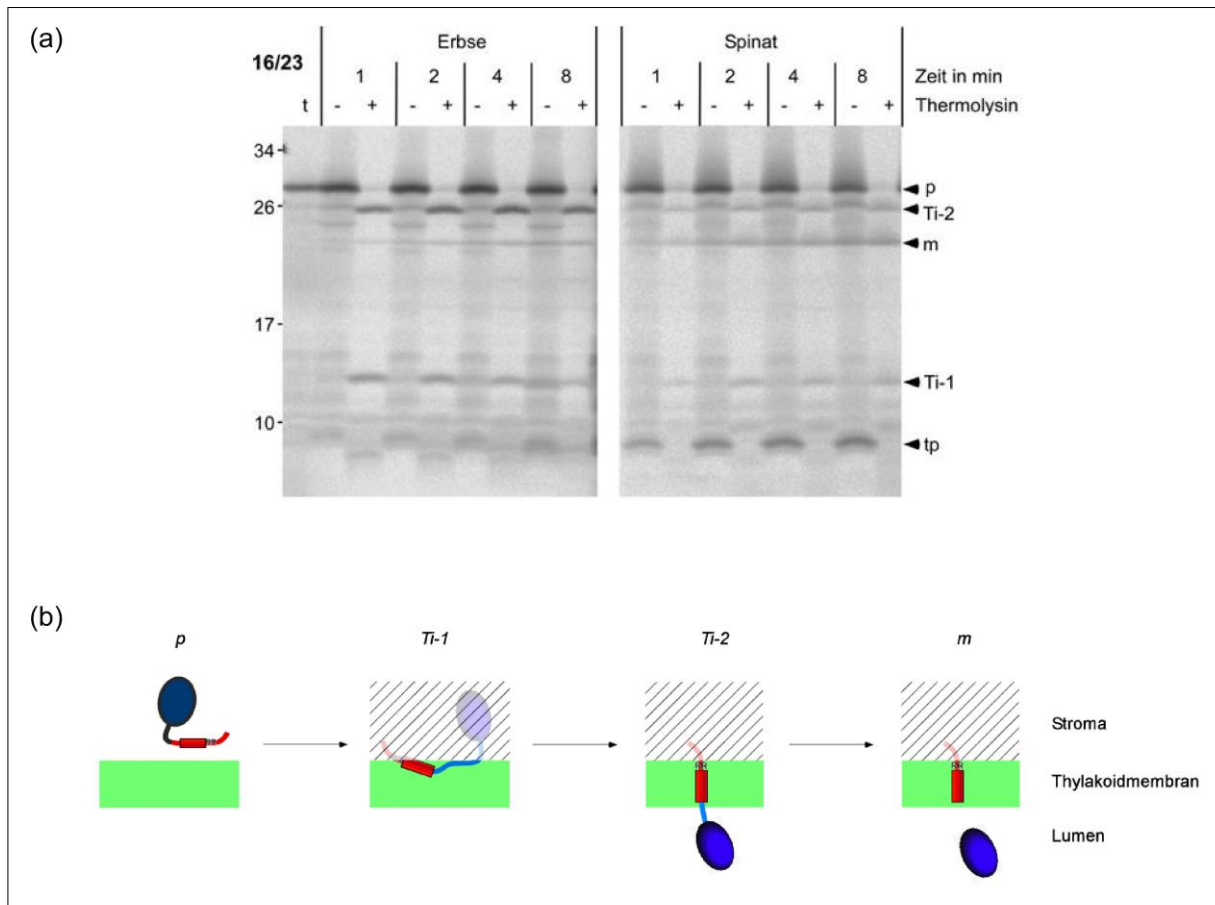


Abbildung 12: Zeitabhängigkeit des in thylakoido-Transports des 16/23 Proteins in Erbsen- und Spinatthylakoiden. (a) Die Transportreaktion erfolgte entsprechend dem Versuch in Abb. 10, allerdings variierten die Transportzeiten (1-8 min). (b) Die Entstehung der für das 16/23 Protein beobachteten Translokationsintermediate durch Proteasebehandlung (schrattierte Bereiche) ist schematisch dargestellt. Ti-1 als frühes Translokationsintermediat entsteht durch den proteolytischen Abbau des noch stromal exponierten Teils des Substrates und eines Teils des Signalpeptids und ist ca. 14 kDa groß. Da im Falle von Ti-2 der reife Teil des Substrates bereits die Thylakoidmembran passiert hat, wird durch die Proteasebehandlung lediglich ein kleiner, stromal exponierter Teil des Signalpeptides abgebaut. Es resultiert daraus ein ca. 26 kDa großes Fragment.

Zunächst zeigt sich für den Transport des 16/23 Proteins in Erbsenthylakoiden das erwartete zeitabhängige Verhalten (Abb. 12 (a)). Die Signalstärke des reifen Proteins (m), das sich proteasegeschützt im Lumen befindet, nimmt mit der Zeit zu und erreicht bei einer Transportdauer von acht Minuten ihr Maximum. Das Vorläuferprotein wird je nach Phase des Transports durch Thermolysin zu zwei unterschiedlichen Degradationsprodukten umgesetzt. Das kleinere Fragment mit einem Molekulargewicht von ca. 14 kDa (Ti-1) ist schon bei kurzen Transportzeiten zu erkennen, im Laufe der Zeit nimmt die Signalstärke ab. Ausgehend von der

Ti-1-Konformation wird der Passagier über die Thylakoidmembran transloziert, sodass der N-Terminus noch stromal und der C-Terminus bereits im Lumen lokalisiert ist. Diese bitope Konformation wird als Translokationsintermediat 2 (Ti-2) bezeichnet. Das entsprechende Signal bei etwa 26 kDa akkumuliert mit steigender Transportzeit. Außerdem ist nach erfolgreicher Prozessierung des Vorläuferproteins das Transitpeptid (tp) in der (-) Spur bei etwa 8 kDa zu sehen.

Für Spinatthylakoide zeigen sich die Translokationsintermediate in einer anderen Ausprägung. Die Signalstärke des Ti-1 ist generell etwas geringer und bleibt ab einer Transportzeit von zwei Minuten relativ konstant. Wie in Erbsenthylakoiden auch, zeigen Ti-2 und reifes Protein eine zeitabhängige Akkumulation, allerdings ist hier das Verhältnis stark zum reifen Protein hin verschoben. Dies könnte darauf hindeuten, dass in Spinatthylakoiden eine effizientere Prozessierung vom Vorläuferprotein zum reifen Protein stattfindet. Diese Vermutung wird durch die deutlich höhere Signalintensität des Transitpeptids im Vergleich zu Erbsenthylakoiden bekräftigt. Das zeitabhängige Verhalten von Ti-1 deutet jedoch darauf hin, dass der eigentliche Transport über die Membran etwas langsamer verläuft als in Erbsenthylakoiden.

1.3 Analyse der Tat-Translokasekomplexe mittels BN-PAGE

Um den Tat-abhängigen Transport in Spinat weiter charakterisieren zu können, ist eine native Analyse hinsichtlich der Tat-Translokasekomplexe erforderlich. Dies geschieht mittels Solubilisierung der Thylakoidmembranen mithilfe des milden Detergens Digitonin und anschließender nicht denaturierender Elektrophorese (*Blue Native PAGE*; BN). So bleiben thylakoidäre Proteine innerhalb ihrer funktionellen Komplexe erhalten und können abhängig von ihrer Größe aufgetrennt werden (Schägger und von Jagow, 1991). Für die Untersuchung der Tat-Translokasekomplexe wird zunächst ein Transportexperiment mit Erbsen- bzw. Spinatthylakoiden unter Verwendung des 16/23 Proteins durchgeführt. Darauf schließt sich eine Solubilisierung der Thylakoidmembranen und die elektrophoretische Auftrennung über eine *Blue native PAGE* an. Da das radioaktiv markierte Vorläuferprotein an die TatBC-Rezeptorkomplexe bindet, können diese mittels Autoradiographie sichtbar gemacht werden (siehe Abb. 13).

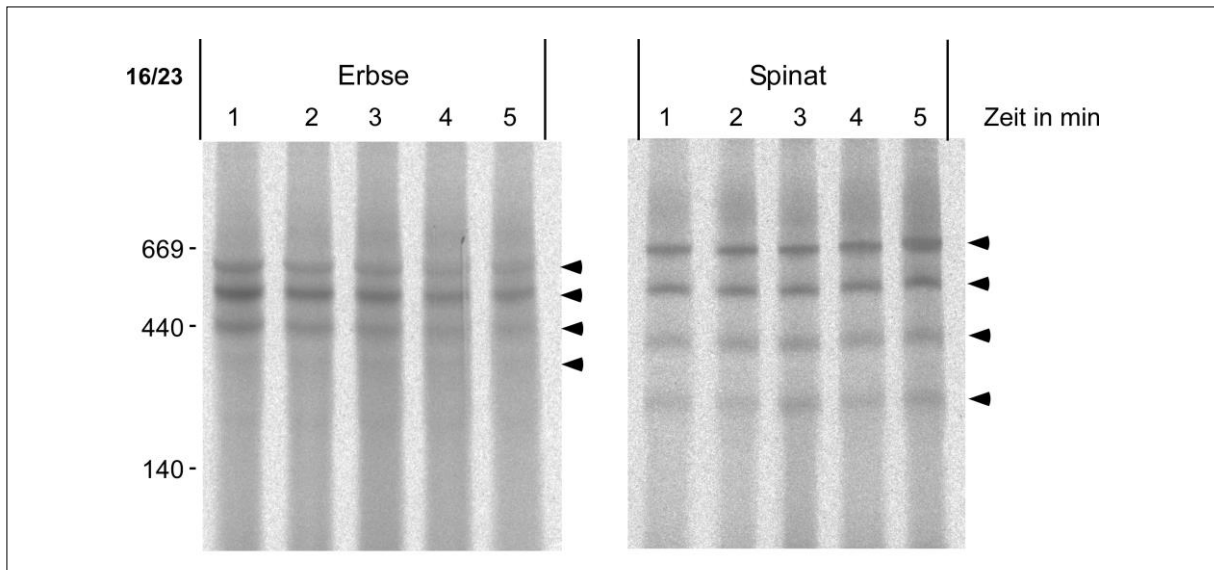


Abbildung 13: Detektion von Tat-Translokasekomplexen in Erbsen- und Spinatthylakoiden mittels Blue-Native-PAGE-Analyse. Frisch präparierte Thylakoide (einer Chlorophyllmenge von 30 µg entsprechend) wurden mit 5 µl *in vitro*-translatiertem und ^{35}S -Methionin-markiertem 16/23 Protein versetzt. Nach Inkubation der Proben für unterschiedliche Zeitspannen (oberhalb der Autoradiogramme angegeben) bei 25 °C im belichteten Wasserbad wurde die Transportreaktion durch Zugabe von eiskaltem HM-Puffer gestoppt, die Ansätze einmalig gewaschen und schließlich mit 1 % (w/v) Digitonin solubilisiert. Im Folgenden wurden die Proben ultrazentrifugiert und mittels BN-PAGE über ein 5-13 % iges Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel in Entfärbelösung II inkubiert, bei 80 °C im Vakuum getrocknet und auf einem *Phosphorimager Screen* exponiert. Mittels Autoradiographie können jeweils die Banden der putativen TatBC-Rezeptorkomplexe (mit schwarzen Pfeilspitzen gekennzeichnet) sichtbar gemacht werden.

In Abb. 13 ist zu erkennen, dass für Erbsen- und Spinatthylakoide jeweils vier substratmarkierte Komplexe auftreten, die sich in ihrer Größe unterscheiden. Für das Erbsen-System sind drei Komplexe mit einem Molekulargewicht im Bereich von 440 bis 630 kDa deutlich zu erkennen, ein viertes Signal ist sehr schwach unterhalb der 440 kDa-Markierung sichtbar. Die Signale dieser spezifisch mit dem 16/23 Protein beladenen Komplexe werden mit zunehmender Transportdauer schwächer. Zwei dieser Komplexe wurden bereits von Berghöfer und Klösgen (1999) beschrieben und mit der Transportmaschinerie in Verbindung gebracht. Dass diese Komplexe tatsächlich TatB und TatC enthalten, wurde durch Jakob *et al.* (2009) mittels BN-PAGE von *Arabidopsis*-Thylakoiden mit anschließender Immundetektion nachgewiesen. In dieser Publikation werden auch zwei weitere Komplexe bei ca. 310 und 370 kDa benannt, wobei diese wahrscheinlich nicht substratbindend sind. Die hier beobachteten Signale entsprechen in ihrer Größe den beschriebenen Komplexen und repräsentieren mit großer Wahrscheinlichkeit TatBC-Rezeptorkomplexe.

Die für Spinatthylakoide detektierten Signale (Abb. 13) könnten also ebenfalls Translokasekomplexe darstellen. Die Banden sind im Vergleich zu Erbsenthylakoiden sogar

stärker zu erkennen, allerdings weichen im Vergleich beider Organismen die Komplexe in ihrer Größe stark voneinander ab. Weiterhin ist auffällig, dass die Intensität der Signale der putativen Tat-Translokasekomplexe in Spinat im Laufe der Zeit nicht wie erwartet abnimmt, sondern eher konstant bleibt. Die aufgezeigten Unterschiede werfen somit die Frage auf, ob die für Spinatthylakoide gezeigten Signale tatsächlich als spezifisch für TatBC-Rezeptorkomplexe betrachtet werden könnten.

1.4 2D-Analyse von Tat-Translokasekomplexen in Spinat mithilfe des 16/23 Proteins

Um zu untersuchen, ob die in Kapitel 1.3 für Spinat beschriebenen Komplexe tatsächlich Vorläuferprotein gebunden haben, wurde im Anschluss an ein weiteres Transportexperiment eine 2D-Analyse durchgeführt. So erfolgte zunächst eine native Elektrophorese der solubilisierten Proben analog zu Abb. 13 und anschließend eine weitere Auftrennung (in zweiter Dimension) unter denaturierenden Bedingungen.

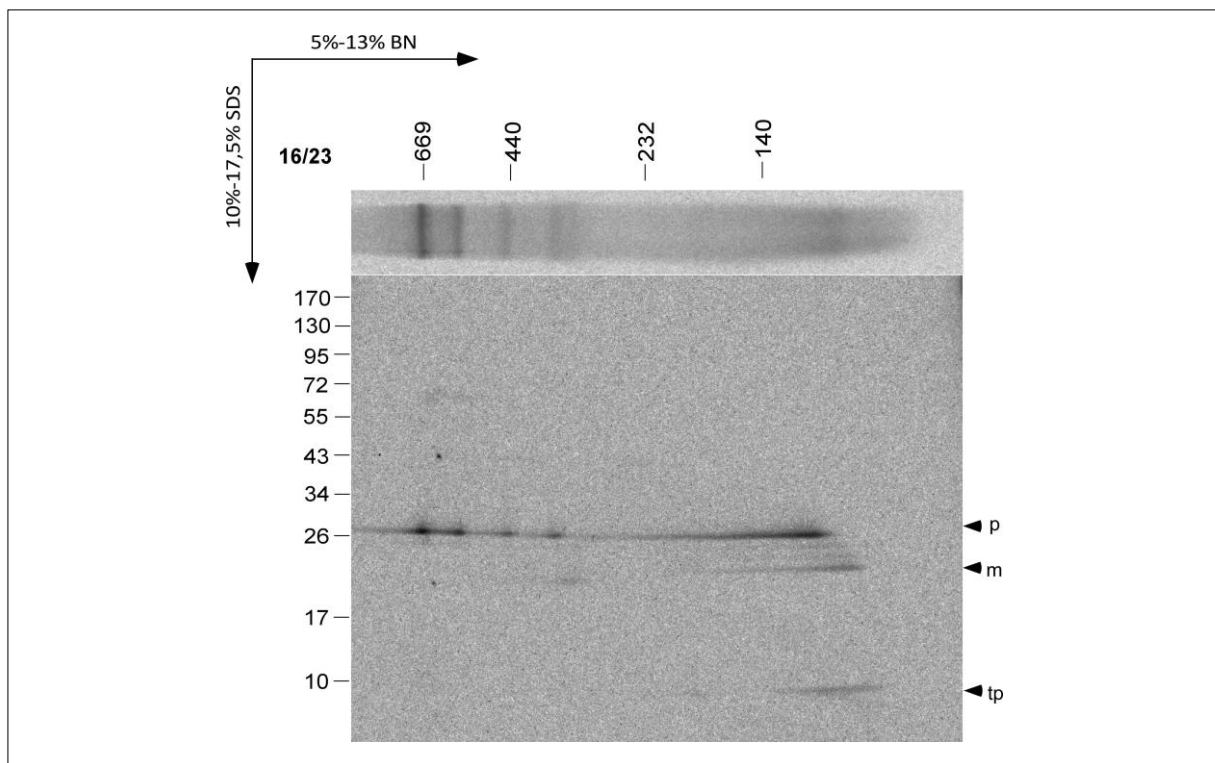


Abbildung 14: 2D-Analyse von substratmarkierten Proteinkomplexen in Spinatthylakoiden. Die Transportreaktion erfolgte analog zu Abb. 13, die Transportdauer betrug 5 min. Solubilisiertes Thylakoidmaterial (einer Chlorophyllmenge von 30 µg entsprechend) wurde zuerst über ein 5-13,5 % iges Polyacrylamid-BN-Gel und anschließend in zweiter Dimension unter denaturierenden Bedingungen (10-17,5 % iges SDS-Gel) aufgetrennt. Im oberen Bereich der Abbildung ist das Autoradiogramm der eindimensionalen Auftrennung gezeigt. Für weitere Details, siehe Abb. 10.

Das Autoradiogramm der zweidimensionalen Auftrennung zeigt vier distinkte punktförmige Signale, die den Banden im BN-Gel zuzuordnen sind und in denaturierter Form der Größe des

16/23 Vorläuferproteins (p; 29 kDa) entsprechen. Weiterhin ist reifes Protein im niedermolekularen Bereich des Nativgels (> 140 kDa) zu erkennen, das vermutlich nach erfolgtem Transport und nachfolgender Prozessierung von der Translokase dissoziiert ist. Passend dazu ist im gleichen Bereich auch ein Signal zu erkennen, welches das Transitpeptid repräsentiert. In Abb. 14 zeigt sich also, dass die zur Frage stehenden Komplexe tatsächlich Vorläuferprotein gebunden haben, der im nächsten Schritt den Transport durchlaufen würde oder bereits transportiert ist und noch prozessiert werden muss. Dies ist ein klarer Hinweis darauf, dass es sich hierbei um Tat-Translokasekomplexe handelt. Eindeutig kann dies aber nur durch den Nachweis der Tat-Komponenten in den Komplexen bestätigt werden.

1.5 Notwendige Schritte zum Erhalt spezifischer Antikörper für die Tat-Proteine aus Spinat

Für notwendige Western-Analysen und für zahlreiche weitere Untersuchungen ist die Verfügbarkeit von Antikörpern notwendig, die an die Tat-Proteine aus Spinat binden können. Bereits in der Arbeitsgruppe vorhandene Antikörper für die Tat-Komponenten aus *Arabidopsis thaliana* zeigten keine spezifische Erkennung der Tat-Proteine aus Spinat. Daher sollten für dieses System spezifische Antikörper generiert werden. Dies erfolgt auf der Basis heterolog überexprimierter und aufgereinigter Fragmente, die den Bereichen der Tat-Proteine entsprechen, welche dem Antikörper zugänglich sind (im membrangebundenen Zustand sind dies die stromal exponierten Bereiche). Hier ergab sich aber für das Spinat-System ein weiteres Problem, da zum Zeitpunkt der hier gezeigten Versuche das Genom von *Spinacia oleracea* noch nicht sequenziert vorlag und so die DNA-Sequenzen für die Tat-Komponenten nicht zur Verfügung standen. Aus diesem Grund war zunächst eine Identifizierung dieser Sequenzbereiche notwendig. Daraufhin konnten dann mithilfe dieser Sequenzen die codierenden Bereiche für die Antigene in die entsprechenden Zielvektoren kloniert und mit der Synthese der Antigene begonnen werden.

1.5.1 Klonierung der codierenden Bereiche für die Tat-Komponenten aus Spinat

Für die Klonierung der Gene, die für die Tat-Komponenten codieren, waren drei Einzelschritte notwendig, die im Gesamten zur Sequenz des kompletten Gens (inklusive der untranslatierten Bereiche) führten. Der erste Schritt stellt die Klonierung eines internen Bereiches im jeweiligen Gen dar. Aus einer in der Arbeitsgruppe angefertigten Arbeit (Bachelorarbeit Kristin Schönefeld, 2010) stand bereits ein ca. 50 bp großes DNA-Fragment aus dem codierenden Bereich für TatA zur Verfügung. Für TatB und TatC war es dagegen nötig, einen solchen Abschnitt auf Basis einer selbst generierten cDNA-Bibliothek aus Spinat zu amplifizieren. In den weiteren Schritten wurden dann die 5`- und 3`-Bereiche durch Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung identifiziert (5`-RACE und 3`-RACE, siehe Abschnitt: Material und Methoden, Kapitel 2.1.2). Nach der erfolgreichen Identifizierung wurden die einzelnen Sequenzen aus den drei Identifizierungsschritten zu einer Gesamtsequenz zusammengefügt.

Die Abbildungen 15, 16 und 17 zeigen die erhaltenen Aminosäuresequenzen für jedes einzelne Tat-Protein aus Spinat im Vergleich zu zwei weiteren pflanzlichen Homologen (es ist jeweils nur der reife Teil des Proteins dargestellt). Für Spinat-TatA (Abb. 15) ist eine hohe Sequenzähnlichkeit zu den Erbsen- und *Arabidopsis*-Proteinen zu erkennen, insbesondere die Bereiche der Transmembranhelix, der *Hinge*-Region und der amphipathischen Helix sind stark konserviert. Für Spinat-TatA fallen lediglich drei Aminosäuren an Position 33 (N), 34 (F) und 53 (T) auf (rot markiert), die zur Sequenz der beiden anderen homologen Proteine einen Unterschied ausmachen. Eine höhere Variabilität in der Sequenz zeigt sich jeweils für den C-terminalen Bereich.

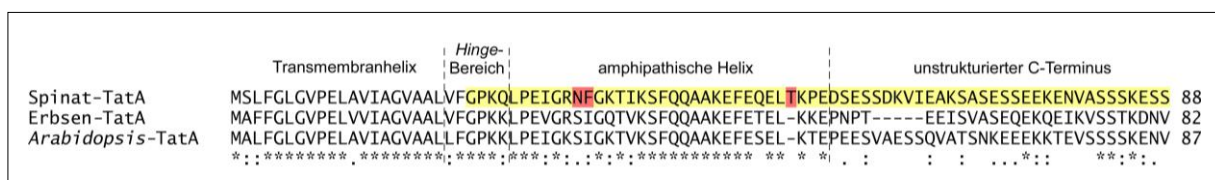


Abbildung 15: Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener TatA-Proteine. Das Alignment (über das Protein-Alignment-Tool *Clustal Omega*) enthält die Aminosäuresequenzen der reifen TatA-Proteine aus Spinat, Erbse und *Arabidopsis*. Der Sequenzbereich, der für die Generierung des TatA-Antigens für Spinat ausgewählt wurde, ist gelb unterlegt. Die Aminosäuren an den Positionen 33 (N), 34 (F) und 53 (T), die im Bereich der amphipathischen Helix im Vergleich zu den beiden anderen TatA-Homologen einen Unterschied zeigen, sind rot markiert. Die Unterteilung in einzelne Strukturbereiche der Proteine ist schematisch dargestellt und orientiert sich an der für *E. coli*-TatA vorhandenen NMR-Struktur (Rodriguez *et al.*, 2013).

Die für die Antigene ausgewählten Sequenzbereiche sind im Alignment dargestellt. Sie repräsentieren die Bereiche der Proteine, die stromal exponiert und somit dem Antikörper zugänglich sind. Die entsprechend codierenden DNA-Fragmente wurden schließlich in die Zielvektoren kloniert und die entstandenen Plasmide für eine heterologe Überexpression eingesetzt.

1.5.2 Heterologe Überexpression und Reinigung der Antigene

Nach der erfolgreichen Identifizierung der DNA-Sequenzen der Tat-Komponenten aus Spinat konnte nun mit den Vorbereitungen für die Generierung der Antikörper begonnen werden. Hierfür wurden die Antigene zunächst über heterologe Expression in *E. coli* in großer Menge synthetisiert. Anschließend wurde eine Fraktionierung in *inclusion bodies* und lösliche Fraktion vorgenommen. Als erster Reinigungsschritt erfolgte eine Ni²⁺-Affinitätschromatographie für beide Fraktionen. Voraussetzung dafür war ein N-terminal an jedes Antigen fusionierter hexa-Histidin-*tag*, über den eine spezifische Bindung an die Ni-NTA-Sepharose-Matrix der Säule möglich war. Mithilfe eines Imidazol-haltigen Puffers konnten die Antigene von der Säule eluiert werden und lagen nun in hoch konzentrierter Form vor. Für alle weiteren Schritte wurde jeweils nur eine Elutionsfraktion der Cytoplasma-Fraktion verwendet, da diese ca. 90 % des synthetisierten Proteins enthielt, die *inclusion bodies*-Fraktion wurde verworfen. Um Verunreinigungen durch eventuelle Fremdproteine zu entfernen, folgte ein weiterer Reinigungsschritt für das Cytoplasma über eine präparative SDS-PAGE und eine darauffolgende Elektroelution. Für das TatC-Antigen wurde auf den letzten Schritt verzichtet und stattdessen eine *reversed-phase*-HPLC durchgeführt. Mithilfe einer abschließenden SDS-PAGE wurden Ausbeute und Reinheit der Proben überprüft (siehe Abb. 18).

Die Antigene für TatA und TatB zeigen jeweils ein starkes Signal und keinerlei Verunreinigungen durch Fremdproteine. Mittels Quantifizierung und Vergleich mit dem Mengenstandard konnte für das TatA-Antigen eine Ausbeute von 1,44 mg Protein, für das TatB-Antigen von 0,54 mg Protein ermittelt werden. Da für die Immunisierung von jedem Antigen mindestens 0,5 mg Protein benötigt werden, war die Menge an Antigen ausreichend. Für das TatC-Antigen war trotz geringer Konzentration der Lösung die erhaltene Menge an Protein mit 0,84 mg ebenfalls ausreichend für die Immunisierung.

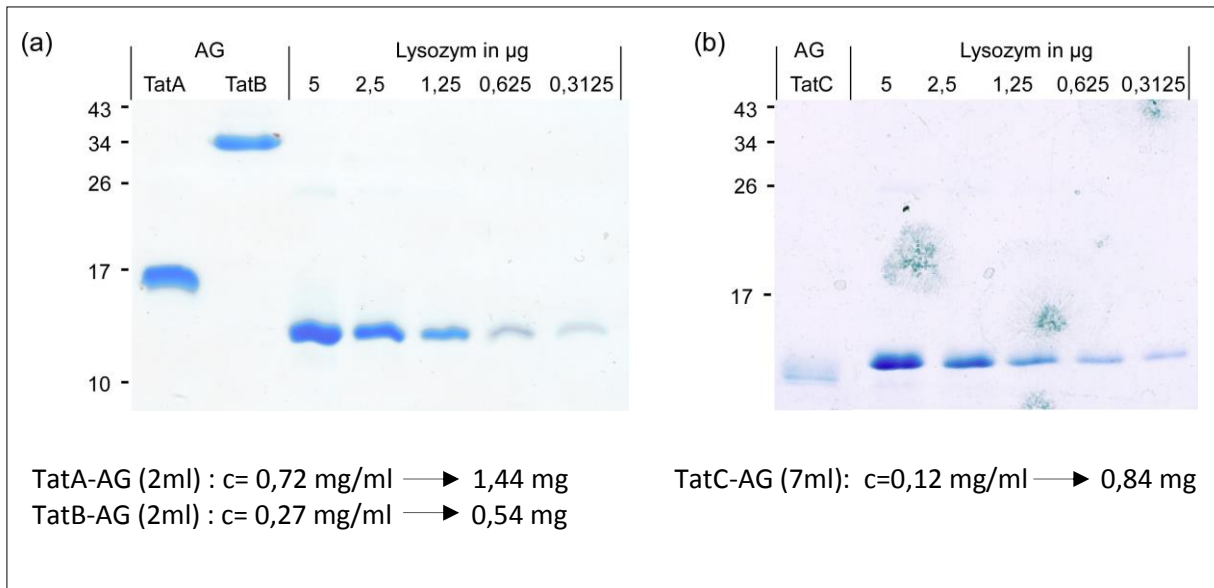


Abbildung 18: Endausbeute der aufgereinigten Antigene für TatA, TatB (a) und TatC (b) aus Spinat nach heterologer Überexpression in *E. coli*. Nach Dialyse gegen 1xPBS wurden jeweils 10 µl der Antigenlösung (AG) auf ein 15 % iges Polyacrylamid-SDS-Gel geladen. Als Mengenstandard für eine quantitative Aussage diente Lysozym (0,3125-5 µg). Die Gele wurden anschließend einer Coomassie-Colloidal-Färbung unterzogen. Für das TatC-Antigen wurde eine modifizierte SDS-PAGE angewandt, bei der das Polyacrylamidgel mit Saccharose versetzt wurde, um die Auflösung zu erhöhen (persönliche Mitteilung: Mario Jakob). Die Konzentrationen der jeweiligen Antigenlösungen und die berechnete Ausbeute sind unterhalb der Abbildungen angegeben.

Auffällig ist das Laufverhalten der Antigene in der SDS-PAGE. So ist für das TatA-Antigen mit einer errechneten Molekülmasse von 7,3 kDa ein Signal bei ca. 17 kDa zu erkennen (siehe Abb. 18). Dieses Phänomen zeigt sich ebenfalls für das TatB-Antigen. Hier wird ein Signal bei ca. 21 kDa erwartet, zeigt sich allerdings bei etwa 37 kDa. Schließlich weicht auch das Laufverhalten des TatC-Antigens (Signal bei ca. 11 kDa) von den Erwartungen ab (berechnetes Molekulargewicht: ca. 8 kDa). Dieser Effekt wurde bereits von Jakob *et al.* (2009) für die Antigene der Tat-Komponenten aus *Arabidopsis* beschrieben und kann als mutmaßlicher Lauf-Artefakt in der SDS-PAGE zusammengefasst werden. Die Identität der Proteinfragmente konnte jedoch mittels Massenspektrometrie bestätigt werden. Die gereinigten Antigene wurden schließlich der Firma Innovagen (Schweden) übersandt, um sie für die Immunisierung einzusetzen. Die auf diese Weise gewonnenen Antikörper wurden dann in einem ersten Versuch auf deren Spezifität überprüft.

1.5.3 Qualitätstests der erhaltenen Antikörper

Mithilfe der erhaltenen polyklonalen Antikörper war es nun möglich, erste Analysen mittels Western Blotting und anschließender Immunodetektion durchzuführen (diese Methode wird im weiteren Verlauf als „Immunoblotting“ zusammengefasst, die daraus resultierenden Bilder werden als „Immunoblots“ bezeichnet). Dazu folgte zunächst eine Aufreinigung der Antiseren mithilfe von Antigen-gekoppelten Sepharose-Säulen auf Basis der Affinität zum jeweiligen Antigen. So sollten spezifisch auf das Ursprungprotein reagierende Antikörper gewonnen werden, die nun für einen ersten Qualitätstest verwendet wurden. In Abb. 19 ist eine Immunoblot-Analyse der aufgereinigten Antigene und jeweils einer Thylakoidprobe gezeigt. Für TatA und TatB wurde ebenfalls eine Analyse von stromalem Extrakt durchgeführt.

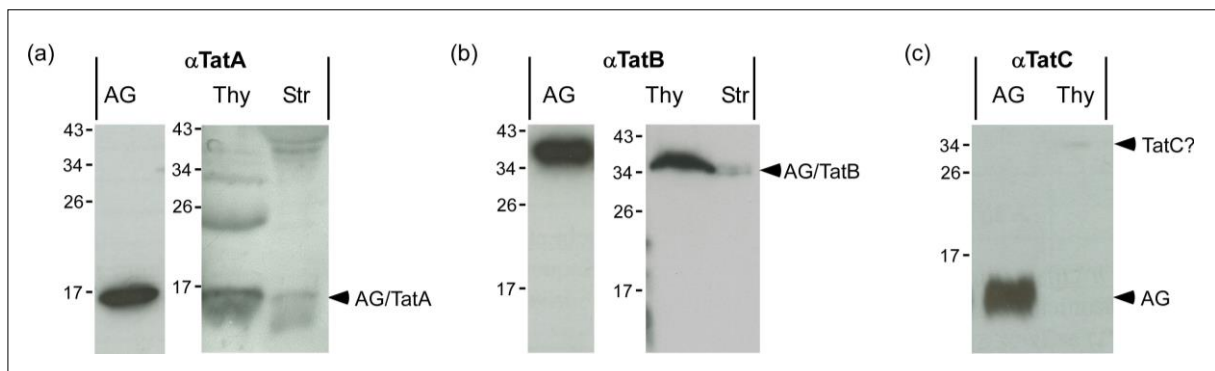


Abbildung 19: Analyse von Antigen-, Thylakoid- und Stromaprobe mittels Immunoblotting gegen TatA (a), TatB (b) und TatC (c). Jeweils 0,5 µl Antigenlösung (AG) und Thylakoide (Thy) (einer Chlorophyllmenge von 15 µg entsprechend) wurden auf ein 15 % iges SDS-Gel aufgetragen. Für TatA und TatB wurde außerdem stromaler Extrakt (Str) (entsprechend einer Chlorophyllmenge von 15 µg) ultrazentrifugiert und auf das Gel geladen. Nach erfolgter Elektrophorese schloss sich ein Western Blot an, danach die Immunodetektion mit den oben angegebenen primären Antikörpern. Diese wurden in einer 1:1000-Verdünnung eingesetzt. Der sekundäre Antikörper (*AntiRabbit*-IgG Peroxidase-Konjugat) kam in einer Verdünnung von 1:10000 zum Einsatz. Die Visualisierung der Signale erfolgte über eine ECL-Reaktion. Die Signale der Antigene (AG) und der entsprechenden reifen Proteine in den Thylakoid-/Stromafraktionen (TatA/TatB, TatC: vermutlich unspezifisches Signal) sind jeweils durch schwarze Pfeile gekennzeichnet.

In Abb. 19 ist deutlich zu erkennen, dass die Tat-Antikörper spezifisch an ihr jeweiliges Antigen binden, da im Immunoblot jeweils ein deutliches Signal sichtbar ist. Die Detektion durch den Antikörper kann in allen Fällen als sehr gut bewertet werden. Jedoch gilt das nicht für die Detektion der authentischen Tat-Proteine in der Thylakoidmembran. Während für TatB (siehe Abb. 19(b)) ein deutliches Signal bei ca. 37 kDa zu erkennen ist, zeigt sich für TatA (a) ein moderat ausgeprägtes Signal bei etwa 16 kDa und zahlreiche weitere, unspezifische Signale. Auffällig ist, dass für TatA und TatB das Laufverhalten der Antigene mit dem der authentischen Proteine übereinstimmt, trotz deutlich unterschiedlicher Molekulargewichte (TatA-Antigen:

7,3 kDa, reifes Protein (ohne Transitpeptid): 9,3 kDa; TatB-Antigen: 20,9 kDa, reifes Protein (ohne Transitpeptid): 22,9 kDa). Da aber die Tat-Proteine selbst bereits für ihr besonderes Laufverhalten bekannt sind, stellt dieser Effekt ein zufälliges Ereignis dar und wird in der vorliegenden Arbeit nicht näher betrachtet.

Für die Detektion von TatC weist die Thylakoidfraktion lediglich eine äußerst schwache Bande bei ca. 34 kDa auf (siehe Abb. 19(c)). Ein spezifisches Signal für TatC wäre allerdings bei ca. 23 kDa zu erwarten. So kann nicht von einem deutlichen Nachweis des Proteins gesprochen werden. Dies kann eventuell in einer zu geringen Proteinmenge innerhalb der Thylakoide begründet sein, ist jedoch aufgrund der postulierten 1:1-Stöchiometrie von TatB zu TatC nicht sehr wahrscheinlich (Bolhuis *et al.*, 2001; Jakob *et al.*, 2009). Vermutlich liegt der Grund eher in einer suboptimalen Detektionsleistung des reifen Proteins durch den Antikörper. Weiterhin könnte auch die Übertragung des Proteins auf die Membran unvollständig erfolgt sein. Die folgenden Immunoblots gegen TatC wurden daher generell mit einer erhöhten Menge an Ausgangsmaterial durchgeführt.

Für den stromalen Extrakt wurde ebenfalls ein Immunoblot gegen TatA vorgenommen. Frielingsdorf *et al.* (2008) erbrachten den Beweis für das Vorhandensein von stromalem TatA in Erbsen-Chloroplasten und belegten dessen Funktionalität im *in vitro* Transportversuch. Daher war ein Signal für TatA im stromalen Extrakt von Spinat zu erwarten. Die Detektion gegen TatB wurde als Negativkontrolle mitgeführt, da TatB bisher nicht im Stroma nachgewiesen werden konnte. Mit dieser Kontrolle sollte überprüft werden, ob der stromale Extrakt frei von Thylakoidmembranen ist.

TatA ist, wie zu erwarten, im stromalen Extrakt nachweisbar, allerdings ist das Signal ebenfalls nur sehr schwach zu erkennen. Dies und die relativ geringe Signalstärke in der Thylakoidfraktion können auf eine ineffiziente Detektion des reifen Proteins durch den TatA-Antikörper hindeuten. Jedoch ist für die eindimensionale Auftrennung von TatA in stromalem Extrakt bereits bekannt, dass die Detektion durch den Antikörper durch die sehr abundante kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (RuBisCO) gestört werden kann, da diese das TatA-Protein maskiert (persönliche Mitteilung: Mario Jakob). Deshalb wurde für Thylakoide und auch stromalen Extrakt eine zweidimensionale Elektrophorese angestrebt. Entgegen der Erwartungen zeigte sich für TatB ebenfalls ein Signal im Stroma. Mehrere Wiederholungen des Experiments zeigten ein ähnliches Ergebnis. In Stroma-Proben aus Erbse konnte TatB jedoch bisher nicht nachgewiesen werden. Für nähere

Untersuchungen in Spinat wurde deshalb ebenfalls ein Immunoblot der Auftrennung des stromalen Extraktes (gegen TatB) in zweiter Dimension durchgeführt, um eventuelle Kreuzreaktionen auszuschließen. Dieser Versuch wird in Kapitel 1.6.2 beschrieben.

1.6 2D-Analyse von Thylakoid- und Stroma-Proben mittels Immunoblotting

1.6.1 Nachweis von TatBC-Rezeptorkomplexen mittels 2D-Analyse und Immunoblotting

Die Analysen in Kapitel 1.4 deuten darauf hin, dass die in der BN-PAGE sichtbaren Signale für Spinat TatBC-Rezeptorkomplexe darstellen könnten. Für einen eindeutigen Beleg ist es jedoch notwendig, TatB und TatC in diesen Komplexen nachzuweisen. Da die benötigten Antikörper nun zur Verfügung standen, war eine Detektion der Tat-Komponenten möglich. Der Versuchsansatz in Kapitel 1.4 wurde also wiederholt, nach Transport des 16/23 Proteins erfolgte eine zweidimensionale Auftrennung der Thylakoidproben, zunächst über eine BN-PAGE und in zweiter Dimension unter denaturierenden Bedingungen. Es wurden drei identische BN-Streifen über SDS-PAGE aufgetrennt. Alle drei SDS-Gele wurden zum Immunoblotting eingesetzt, wobei jeweils auf eine der drei Tat-Komponenten detektiert wurde. Zusätzlich wurde ein Autoradiogramm der eindimensionalen Trennung (BN-PAGE) erstellt, um die putativen Signale von Substrat bindenden TatBC-Rezeptorkomplexen zum Vergleich zur Verfügung zu stellen.

Im Autoradiogramm des BN-Streifens sind wiederum die in Abb. 13 und 14 beobachteten Signale des 16/23 Proteins im Bereich von 250-700 kDa erkennbar. Dabei ist zu beachten, dass die unterste Komplexbande sehr diffus erscheint und durchaus auch mehrere Einzelsignale darstellen könnte. Im Vergleich mit der eindimensionalen Auftrennung fallen in der zweiten Dimension für die TatC-Detektion vier distinkte punktförmige Signale auf, die in der BN-Dimension ein vergleichbares Laufverhalten besitzen wie die durch das Vorläuferprotein markierten TatBC-Rezeptorkomplexe. In der denaturierenden Auftrennung sind die *spots* bei ca. 25 kDa zu erkennen. Außer einem weiteren punktförmigen Signal, das sich bei 26 kDa zeigt und keinem den Vorläufer enthaltenden Komplex zuzuordnen ist, sind keine weiteren Signale zu sehen.

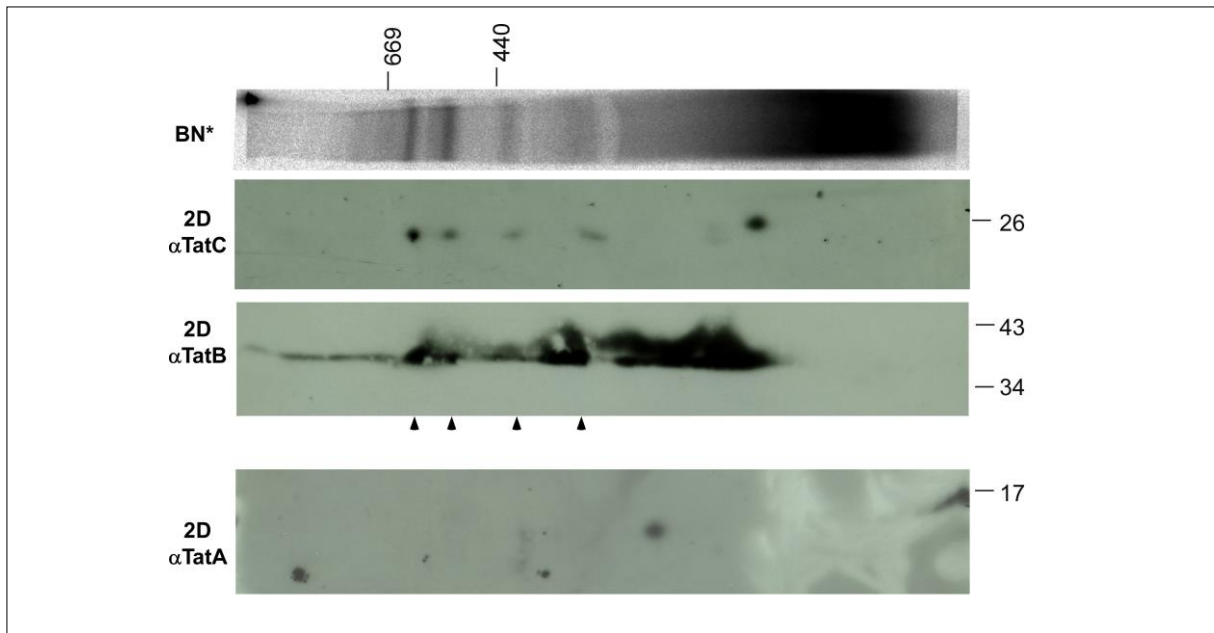


Abbildung 20: 2D-Analyse von Spinatthylakoiden nach erfolgreichem Transport mit anschließendem Immunoblotting gegen Tata, TatB und TatC. Die Transportreaktion erfolgte analog zu Abb. 10. Solubilisiertes Thylakoidmaterial (einer Chlorophyllmenge von 30 µg entsprechend) wurde zuerst über ein 5-13,5 % iges PAA-BN-Gel und anschließend in zweiter Dimension unter denaturierenden Bedingungen (10-17,5 % iges SDS-Gel) aufgetrennt. Darauf folgten ein Western-Blot und eine anschließende Immunodetektion über ECL. Die verwendeten primären Antikörper sind links angegeben. Diese wurden in einer 1:1000-Verdünnung eingesetzt. Der sekundäre Antikörper (*AntiRabbit*-IgG Peroxidase-Konjugat) kam in einer Verdünnung von 1:10000 zum Einsatz. Am oberen Rand der Abbildung ist zum Vergleich das Autoradiogramm (BN*) der eindimensionalen Auftrennung gezeigt, welches das Vorläuferprotein bindende Komplexe abbildet. Die TatB, TatC und Substrat enthaltenden Komplexe sind mit schwarzen Pfeilspitzen gekennzeichnet.

Da die vier in der TatC-Detektion beobachteten Signale auch in der TatB-Analyse auftreten (in der zweiten Dimension bei ca. 37 kDa erkennbar), ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich hier um spezifische Signale handelt, die Substrat bindende TatBC-Rezeptorkomplexe darstellen. Allerdings ist hier zu erwähnen, dass die Signalstärke im TatB-Blot weit höher ist und die *spots* deutlich diffuser erscheinen. Außerdem gibt es weitere diffuse Signale, die allerdings keine Entsprechung in der TatC-Detektion oder dem Autoradiogramm finden. Für TatA sind in der zweidimensionalen Trennung nur wenige Signale zu erkennen. Das einzig relevante ist ein längliches Signal am rechten Bildrand (in der zweiten Dimension bei ca. 17 kDa), das vermutlich monomeres TatA repräsentiert. Folglich scheint TatA nicht in den TatB und TatC enthaltenden Komplexen vorhanden zu sein. Diese Beobachtung passt zu den von Jakob *et al.* (2009) gezeigten Ergebnissen einer 2D-Immunoblot-Analyse von *Arabidopsis*-Thylakoiden.

1.6.2 2D-Analyse von stromalem Extrakt mittels Immunoblotting gegen TatA/TatB

Die Ergebnisse aus Abb. 19 weisen außer auf das Vorhandensein von TatA auch auf die Existenz von TatB in stromalem Extrakt hin. Um dieses Phänomen weiter zu untersuchen, wurde im Folgenden stromaler Extrakt über eine zweidimensionale PAGE aufgetrennt und mittels Immunoblotting auf TatA und TatB untersucht. Die Auftrennung in erster Dimension erfolgte dabei über eine *Colorless Native-PAGE* (CN-PAGE). Dieses Gelsystem wird vorzugsweise für lösliche Proteinkomplexe verwendet (Schägger *et al.*, 1994).

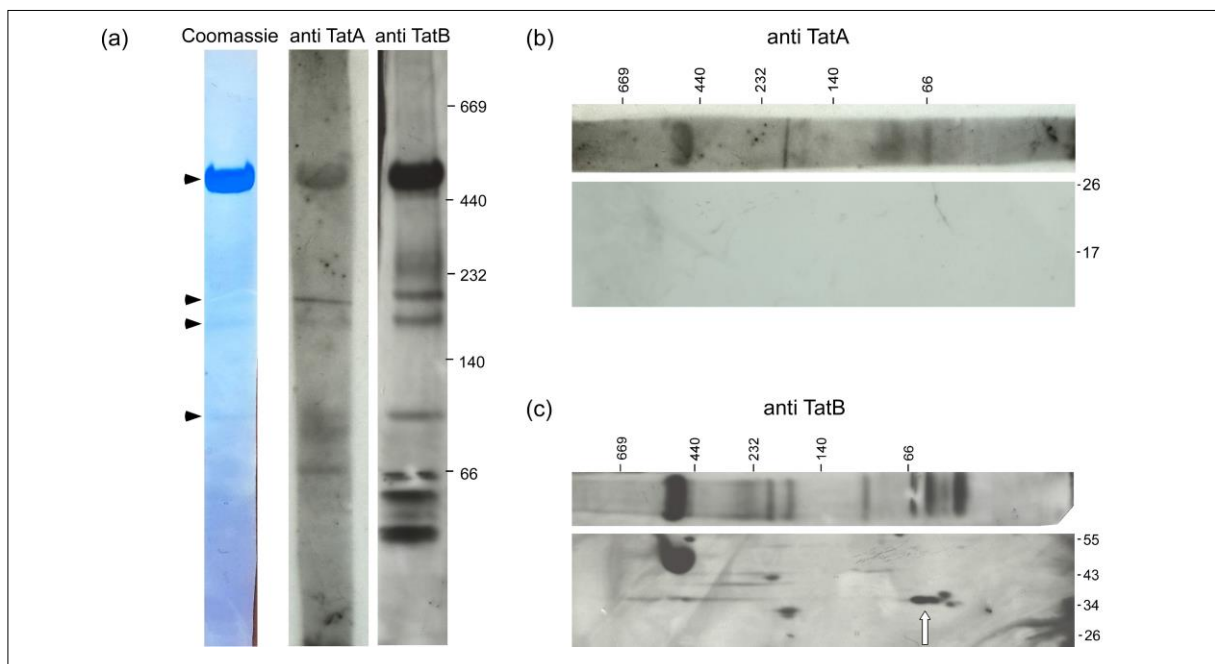


Abbildung 21: CN-PAGE-Auftrennung (a) und 2D-Analyse von stromalem Extrakt aus Spinat mit anschließendem Immunoblotting gegen TatA (b) und TatB (c). (a) Stromaler Extrakt (einer Chlorophyllmenge von 30 µg entsprechend) wurde zuerst über ein 5-13,5 % iges Polyacrylamid-CN-Gel und anschließend in zweiter Dimension unter denaturierenden Bedingungen (10-17,5 % iges SDS-Gel) aufgetrennt. Darauf folgten ein Immunoblot gegen TatA oder TatB. Die primären Antikörper wurden in einer 1:1000-Verdünnung eingesetzt. Der sekundäre Antikörper (*AntiRabbit*-IgG Peroxidase-Konjugat) kam in einer Verdünnung von 1:10000 zum Einsatz. Oberhalb der 2D-Immunoblots ist jeweils die erste Dimension abgebildet. Das Signal, das ein putatives TatB-Oligomer darstellt, ist mit einem weißen Pfeil gekennzeichnet.

In der ersten Dimension (Abb. 21 (a)) sind vor allem für die Detektion von TatB einige Signale sichtbar, die allerdings ebenfalls in der Coomassie-Färbung auftreten (entsprechende Signale sind mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet). Dies könnte auf unspezifische Reaktionen des Antikörpers hindeuten. Zum Beispiel wird RuBisCO (Signal bei ca. 500 kDa) sowohl vom TatA-Antikörper als auch vom TatB-Antikörper erkannt. Daher sind für putative TatA- oder TatB-Komplexe nur diese Signale interessant, die deutlich hervortreten und keine entsprechenden Banden in der Coomassie-Färbung vorweisen. Für die TatA-Detektion ist kein deutliches Signal zu erkennen. Für die Detektion gegen TatB fallen mehrere Banden im Bereich

von 30-60 kDa auf. Eine eindeutige Identifizierung dieser Signale als TatB enthaltende Komplexe / Oligomere ist mithilfe der zweiten Dimension (Abb. 21 (c)) möglich. In Abb. 21 (b) dagegen ist zu sehen, dass Spinat-TatA im Stroma über die 2D-Trennung nicht nachgewiesen werden konnte. Die für Erbsen-Stroma beobachteten TatA-Signale im Bereich der ersten Dimension von 300-880 kDa (Dissertation Stefan Frielingsdorf, 2008) waren nicht zu sehen. Dies kann einerseits in einer unsteady TatA-Menge im Spinat-Stroma begründet sein, andererseits ist aber auch die Detektionsleistung des Antikörpers nicht immer gleichmäßig. Auf eine Wiederholung des Experiments wurde aber in diesem Fall verzichtet.

Für TatB hingegen sind einige *spots* erkennbar. Auch in der zweiten Dimension zeigen sich unspezifische Signale, die die für Abb. 21 (a) bereits beschriebenen Kreuzreaktionen des Antikörpers repräsentieren und jeweils den schon benannten Komplexen zuzuordnen sind. Zusätzlich ist ein spezifischer *spot* zu erkennen (Abb. 21 (c)), der mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 37 kDa gut zu dem beobachteten Laufverhalten von TatB in Kapitel 1.5.3 passt. Da die Signale in der ersten Dimension im niedermolekularen Bereich zu finden sind, kann angenommen werden, dass sich TatB im Stroma als Dimer oder in kleinen Oligomeren zeigt. Ob diese Beobachtung einen funktionellen Hintergrund hat, wird im Abschnitt Diskussion (Kapitel 3) näher erörtert.

1.7 Die Rolle von TatA als limitierender Faktor für den *in thylakoido*-Transport in Spinat

Bisher wurden Besonderheiten des Tat-abhängigen Proteintransports in Spinatthylakoiden aufgezeigt. Für *in thylakoido*-Transportexperimente war insbesondere eine hohe Variabilität in der Transportrate innerhalb mehrerer unabhängiger Experimente auffällig (siehe Abb. 10). Dieses Phänomen soll im Folgenden näher ergründet werden. Die einzelnen Transportversuche wurden zwar unter identischen Bedingungen und mit den gleichen Pufferkomponenten aber jeweils mit frisch präparierten Thylakoiden durchgeführt. Die Präparation folgt jeweils einem festgelegten Protokoll und beginnt mit der osmotischen Lyse frisch präparierter Chloroplasten. Dadurch werden die stromalen Proteine freigesetzt und durch eine Zentrifugation von der Membranfraktion abgetrennt. Im Folgenden wird die Thylakoidsuspension zwei Waschschritten unterzogen, d.h. abzentrifugiert und erneut in HM-Puffer resuspendiert. Schließlich kann die Suspension für Tat-abhängige Transportexperimente verwendet werden. Nun ist es vorstellbar, dass das Waschen von Thylakoiden zu einem Verlust von einzelnen Faktoren aus der Thylakoidmembran führen kann,

die für den Transportvorgang essentiell sind. Je nach Intensität der Waschschrte kann also der Verlust von wichtigen Komponenten von Versuch zu Versuch unterschiedlich hoch sein. Zudem können z.B. TatA und TatB nach der osmotischen Lyse im stromalen Extrakt von Spinat nachgewiesen werden (siehe Abb. 19). Diese Beobachtung könnte auch einen „Wascheffekt“ in dem Sinne darstellen, dass die beiden Tat-Proteine während der Präparation aus der Thylakoidmembran herausgelöst werden. Für TatA ist bereits bekannt, dass es, im Gegensatz zu TatB, durch den Einsatz von chaotropen Salzen, wie z.B. Natriumbromid, aus der Membran herausgelöst werden kann (Frielingsdorf *et al.*, 2008). Alternativ wäre nun auch vorstellbar, dass TatA durch mehrmaliges Waschen aus den Thylakoiden verloren gehen könnte. Um diesen Sachverhalt zu überprüfen, wurde der Transportansatz des 16/16 Proteins in Erbsen- und Spinatthylakoide in modifizierter Form durchgeführt. Für die Transportansätze wurden unterschiedliche Thylakoidfraktionen verwendet, die sich in der Anzahl der vorangegangenen Waschschrte während der Präparation unterscheiden. So wurden Thylakoide entweder direkt nach der Lyse der Chloroplasten verwendet oder bis zu vier Mal gewaschen, um eventuelle Extraktionsprozesse nachverfolgen zu können. Darüber hinaus wurde ein Ansatz der vierfach gewaschenen Thylakoide kurz vor der Transportreaktion mit *in vitro*-synthetisiertem TatA-Protein (über *RTS: rapid translation system*) aus Erbse versetzt. Nach Frielingsdorf *et al.* (2008) kann lösliches TatA die Transportaktivität von Thylakoiden, aus denen TatA vorher entfernt wurde, wiederherstellen. Daher war zu erwarten, dass im Falle eines verminderten Transports durch den Verlust von TatA während der Waschschrte die Zugabe des löslichen Proteins wieder zu einer Erhöhung der Transportrate führt.

Um die Transportraten der einzelnen Ansätze zu vergleichen, wurden jeweils die Signale des reifen Teils des 16/16 Proteins in jeder Thermolysin behandelten Fraktion (+) quantifiziert und der erhaltene Wert für die Fraktion der lysierten Chloroplasten als Bezugswert gesetzt.

In den Thylakoidfraktionen aus Erbse (Abb. 22 (a)) ist für die Transportrate des 16/16 Proteins zu erkennen, dass diese mit steigender Anzahl an Waschvorgängen leicht abnimmt. Schließlich erreichen vierfach gewaschene Thylakoide noch 67 % der Transportrate von lysierten Chloroplasten, die keinem Waschschrte unterzogen worden sind. Es zeigt sich ebenfalls, dass die Abnahme der Transportaktivität nach den ersten beiden Waschvorgängen nur minimal ist. Erst ab dem dritten Schritt reduziert sich die Transportrate deutlicher.

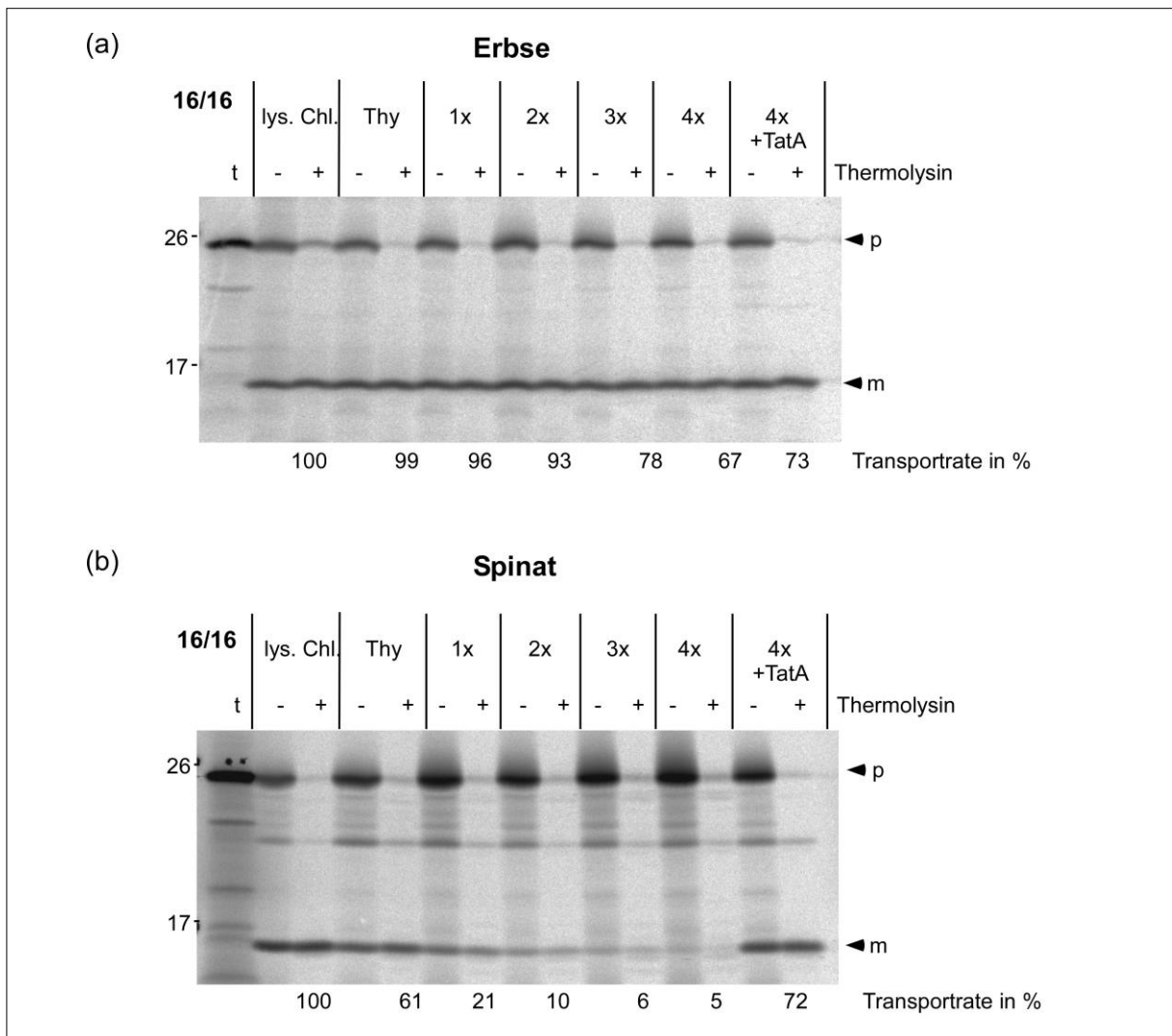


Abbildung 22: Transport des 16/16 Proteins in (a) Erbsen-/ (b) Spinatthylakoide mit Untersuchung einer möglichen Extraktion von TatA. Die Transportreaktion wurde für 10 min mit Thylakoidfraktionen durchgeführt, die während der Präparation eine unterschiedliche Anzahl von Waschschritten durchlaufen haben. In der jeweils letzten Fraktion wurden vierfach gewaschene Thylakoide vor dem Transportversuch mit 5 μ l *in vitro*-synthetisiertem TatA (*RTS-TatA*) aus Erbse versetzt. Die Signale des reifen Proteins (m) in der (+) Fraktion wurden quantifiziert, die erhaltenen Werte sind unterhalb des Autoradiogramms angegeben.

Wird nun *RTS-TatA* (aus Erbse) zu den vierfach gewaschenen Thylakoiden zugegeben, nimmt die Transportaktivität wieder leicht zu (auf 73 %), erreicht aber nicht den Ausgangswert von Thylakoiden, die keinen Waschschritten unterzogen wurden. Dies ist mit der Tatsache zu erklären, dass durch die nacheinander folgenden Zentrifugations- und Resuspensionsvorgänge Thylakoidmaterial an Gefäßwand und Pipettenspitzen haftet und somit verloren geht und ein Teil auch zerstört wird. Messungen des Chlorophyllgehalts zeigen, dass vierfach gewaschene Thylakoidfraktionen nur noch 70 % der Chlorophyllmenge im Vergleich zu lysierten Chloroplasten aufweisen, was für einen Verlust von Thylakoidmaterial im Größenbereich von ca. 30 % spricht (persönliche Mitteilung: Julia Dittmar). Die

entsprechende Fraktion zeigt im Transportansatz eine ebenfalls um 30% verminderte Transportrate des 16/16 Proteins. So kann geschlussfolgert werden, dass diese Abnahme vermutlich mit dem Verlust von Thylakoidmaterial während der Präparation zusammenhängt. Ein komplett anderes Bild zeigt sich in diesem Experiment für Spinatthylakoide (Abb. 22 (b)). Hier ist mit jedem Waschschrift eine wesentlich deutlichere Abnahme der Transportrate zu erkennen, wobei schon zweimalig gewaschene Thylakoide nur noch 10 % Transportaktivität im Vergleich zur Kontrolle besitzen. Diese Beobachtung beruht natürlich auch auf dem Verlust an Thylakoidmaterial während der Präparation (wie für Erbsenthylakoide beschrieben). Zudem scheint für Spinatthylakoide tatsächlich eine Extraktion von TatA aus der Thylakoidmembran durch die Waschvorgänge zu erfolgen, was einen deutlichen Effekt auf die Transportrate hat. Durch Zugabe von *RTS*-TatA kann wiederum eine Transportaktivität von 72 % erreicht werden, was vergleichbar mit der entsprechenden Fraktion in Erbsenthylakoiden ist. So kann *in vitro*-synthetisiertes und von außen zugegebenes TatA (aus Erbse) den Effekt der Extraktion für Spinatthylakoide wieder aufheben.

Da sich der Extraktionseffekt in Erbsenthylakoiden bei gleicher Behandlung nicht in demselben Maße zeigt wie in Spinat, stellt sich die Frage, worin der Grund für diesen Unterschied liegt. Nun ist es möglich, dass der beobachtete Effekt für TatA ein organismusspezifisches Problem für Spinat darstellt (wie z.B. geringe Gesamtmenge von TatA in der Thylakoidmembran im Vergleich zu Erbse). Alternativ könnte jedoch auch das TatA-Protein aus Spinat über besondere Eigenschaften verfügen, die den Extraktionseffekt hervorrufen. Beispielsweise ist es möglich, dass Spinat-TatA nicht so fest in der Thylakoidmembran verankert ist wie das Pendant aus Erbse und daher weniger „Kraft“ notwendig ist, um es aus der Membran zu extrahieren. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass sich die TatA-Proteine aus Erbse und Spinat in ihrer Aktivität unterscheiden und somit eine vergleichbare Extraktion beider Proteine aus der Membran unterschiedlich ausgeprägte Effekte auf die Transportrate haben kann.

Sollte der limitierende Effekt von TatA spezifisch für das Protein aus Spinat auftreten, müsste dieser unabhängig von der Herkunft der jeweiligen Thylakoide sein. Im folgenden Experiment soll daher die Extrahierbarkeit von Spinat-TatA und Erbsen-TatA aus Spinat- oder Erbsenthylakoiden untersucht und verglichen werden. Der Versuchsansatz (siehe Abb. 23) basiert auf der Zugabe von *in vitro*-synthetisiertem Spinat- oder Erbsen-TatA zu isolierten Thylakoiden. Nach bisherigen Erkenntnissen bindet von außen zugegebenes TatA innerhalb kürzester Zeit an die Thylakoidmembran (Frielingsdorf *et al.*, 2008; Hauer *et al.*, 2013).

Ausgehend von diesem gebundenen Zustand (Abb. 23, Schritt II) kann durch mehrere Waschschrte (Schritt III) eine eventuelle Extraktion der TatA-Proteine hervorgerufen werden. Für die *in vitro*-Synthese der TatA-Proteine wurde das *RTS*-System verwendet (im Vorfeld wurde zunächst eine Klonierung der cDNA für TatA aus Spinat in den pIVEX-Vektor durchgeführt). Die Expression über die *RTS*-Reaktion verspricht eine besonders hohe Ausbeute des Zielproteins, sodass die TatA-Proteine im Transportansatz jeweils im Überschuss eingesetzt werden können. Außerdem kann über das *RTS*-System mit relativ einfachen Mitteln die radioaktive Markierung der synthetisierten TatA-Proteine realisiert werden. So können die Signale des membrangebundenen TatA im Autoradiogramm sichtbar gemacht werden, was eine genaue Quantifizierung der TatA-Menge in jeder einzelnen Fraktion ermöglicht.

Parallel erlaubt der Versuchsansatz auch eine Aussage über den Effekt einer möglichen Extraktion von TatA auf die Transportaktivität der jeweiligen Thylakoidfraktionen. Die jeweiligen mit TatA-Protein versetzten Thylakoidfraktionen wurden für ein Transport-Rekonstitutionsexperiment verwendet. Dazu wurden die Thylakoidfraktionen vor der TatA-Zugabe einer Behandlung mit anti-TatA-Antikörpern unterzogen (siehe Abb. 23, Schritt I). Dies führt nach Hauer *et al.* (2013) zu einer Blockierung der natürlichen TatA-Funktion innerhalb der Thylakoide.

Durch Zugabe der *RTS*-TatA-Proteine aus Spinat oder Erbse (Schritt II) kann der Transport rekonstituiert werden. So kann die Transportrate in Abhängigkeit des membrangebundenen *RTS*-TatA-Proteins in jeder Fraktion bestimmt werden. Hierzu wurde wiederum eine Quantifizierung der Signale des transportierten Proteins (m und Ti-2) durchgeführt und der erhaltene Wert für die Fraktion, die keine Waschschrte durchlaufen hat (0x) jeweils als Bezugswert gesetzt.

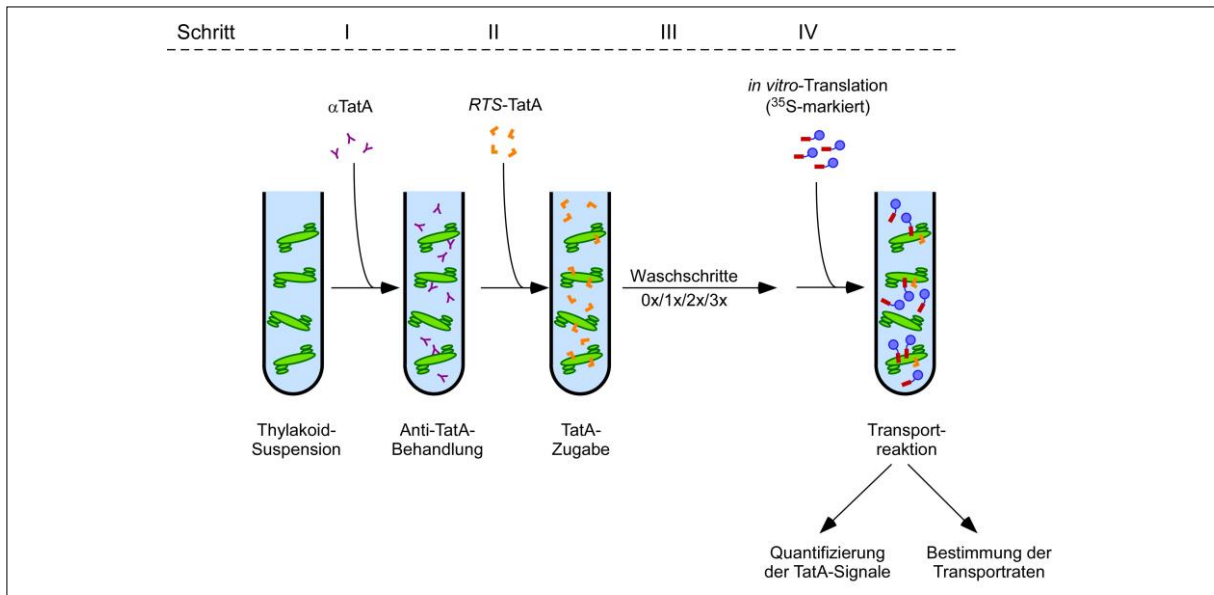


Abbildung 23: Schema für einen Transport-Rekonstitutionansatz mittels Zugabe von RTS-TatA mit nachfolgenden Waschschritten. Der Rekonstitutionsansatz beginnt mit einer Antikörper-Behandlung der frisch präparierten Thylakoide, wodurch die Funktion der intrinsischen TatA-Proteine blockiert wird. Nach vollständiger Entfernung überschüssigen Antikörpers durch Waschen wurden die Thylakoidfraktionen mit RTS-TatA versetzt. Dabei wurde jegliche Kombination von TatA aus Spinat oder Erbse mit Spinat- oder Erbsenthylakoiden verwendet. Auf die TatA-Zugabe folgte (je nach Fraktion) eine bestimmte Anzahl an Waschschritten und anschließend der Transport des Vorläuferproteins. Das erhaltene Autoradiogramm wurde für die Quantifizierung der TatA-Signale und der Banden des transportierten Proteins (m und Ti-2) verwendet.

In Abb. 24 sind die Autoradiogramme für das Rekonstitutionsexperiment in Erbsen- (a) und Spinatthylakoiden (b) zu sehen. Zusätzlich sind die erhaltenen Quantifizierungswerte für membrangebundenes TatA (c) und transportiertes Protein (d) graphisch dargestellt. Betrachtet man nun erst einmal ohne Berücksichtigung der Transportreaktion nur die Signale der membrangebundenen RTS-TatA-Proteine, so ist zu erkennen, dass für jede Kombination von TatA mit Thylakoiden beider Spezies die Signale für membrangebundenes TatA mit steigender Anzahl an Waschschritten stetig schwächer werden. Dies spricht für eine Extraktion von RTS-TatA aus den Thylakoiden durch Zentrifugieren. Mithilfe einer Quantifizierung der TatA-Signale sind abhängig von der Wahl des TatA-Proteins durchaus Unterschiede zu erkennen (Abb. 24 (c)). Für Spinat-TatA (in Rottönen dargestellt) ist im Vergleich zum TatA-Protein aus Erbse (in Grüntönen dargestellt) jeweils ein etwas größerer Verlust zu verzeichnen. Dagegen scheint die Herkunft der verwendeten Thylakoide für den Grad der Extraktion unerheblich zu sein, denn Spinat-TatA wird durch Waschen der Thylakoide in ähnlichem Maße aus den Thylakoidmembranen von Spinat (in dunkelrot dargestellt) und Erbse (in hellrot dargestellt) herausgelöst. Gleiches gilt für die Extraktion von Erbsen-TatA aus Spinat- (in dunkelgrün dargestellt) und Erbsenthylakoiden (in hellgrün dargestellt).

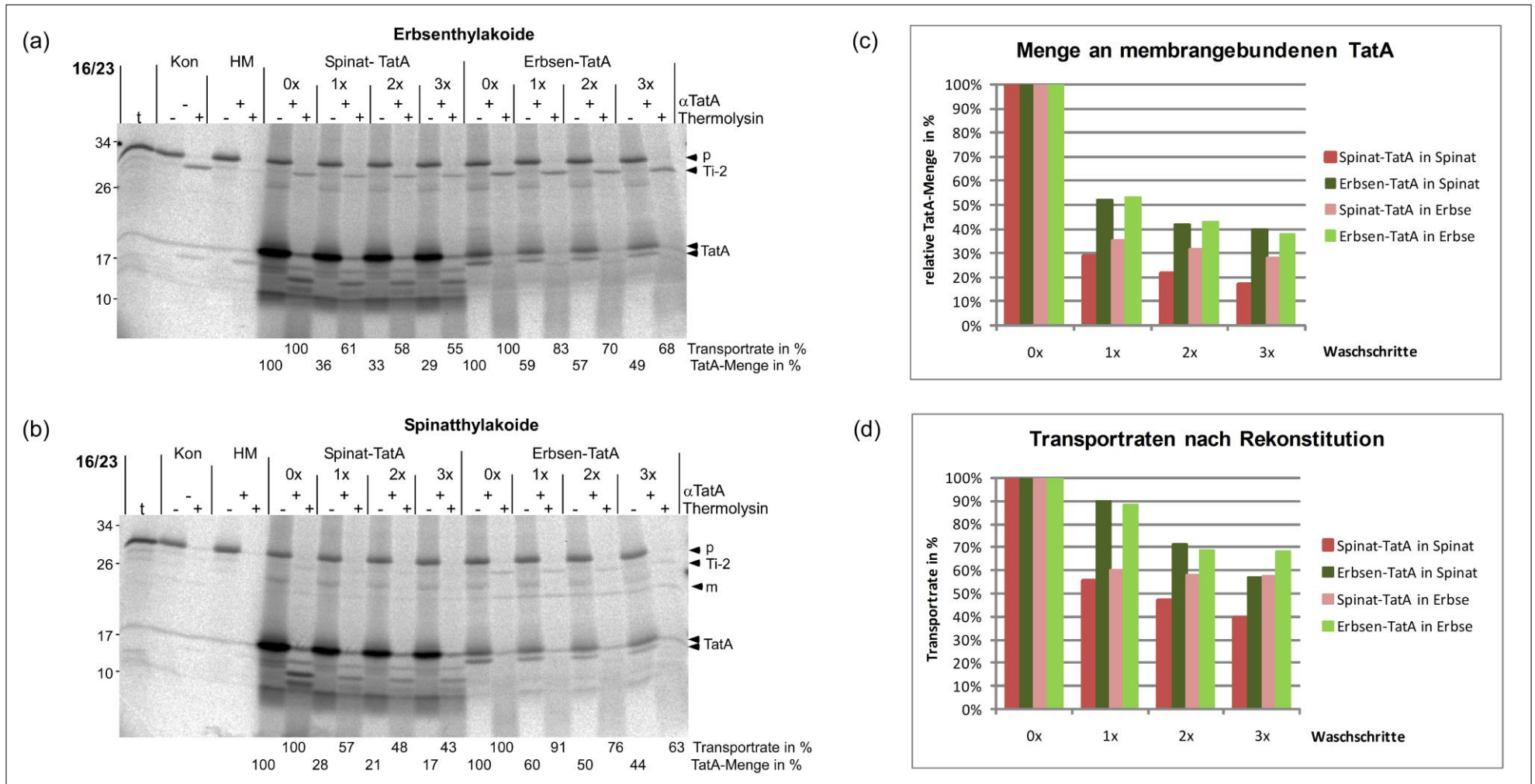


Abbildung 24: Rekonstitution des Transports des 16/23 Proteins in Erbsen- (a) oder Spinatthylakoide (b) mittels *RTS*-TatA-Zugabe mit nachfolgenden Waschschritten. Mit anti-TatA-Antikörper (α TatA, Spinat: 1:2, Erbse: 1:4 eingesetzt) behandelte Thylakoidfraktionen wurden wechselseitig mit radioaktiv translatiertem *RTS*-TatA aus Spinat oder Erbse versetzt und daraufhin einer unterschiedlichen Anzahl von Waschschritten unterzogen. Die anschließende Transportreaktion des 16/23 Proteins wurde für 2 min durchgeführt. Die Kontrolle (Kon) stellt zweifach gewaschene Thylakoide dar (vgl. „2x“ in Abb. 22), die HM-Fraktion (HM) beinhaltet Antikörper-behandelte Thylakoide. Die Signale des Vorläuferproteins (p), Translokationsintermediates (Ti-2) und reifen Proteins (m) sind mit schwarzen Pfeilspitzen, die Signale des jeweiligen TatA-Proteins mit weißen Pfeilspitzen gekennzeichnet. Die Quantifizierungswerte für transportiertes Protein (m und Ti-2) sowie für die TatA-Signale sind unterhalb der Autoradiogramme angegeben und wurden in (c) und (d) graphisch dargestellt. Dabei wurde die Thylakoidfraktion, die nach der TatA-Zugabe nicht gewaschen wurde, als Referenz benutzt.

Es scheint also, dass Spinat-TatA tatsächlich deutlich leichter durch Waschen der Thylakoide aus der Membran herausgelöst wird als Erbsen-TatA, was auf eine schwächere Bindung an die Thylakoidmembran hinweist. Nun ist es interessant zu sehen, ob diese Extraktion wiederum solch einen drastischen Effekt auf die Transportrate in Spinatthylakoiden hat wie in Abb. 22 gezeigt wurde. Betrachtet man die durch die membrangebundenen TatA-Proteine erreichten Transportraten in Abhängigkeit von der Anzahl der Waschschriffe, fällt auch hier zunächst eine allgemeine Abnahme der Transportaktivität mit zunehmender Anzahl der Waschschriffe auf. Nach Quantifizierung der Transportraten zeigen sich ebenfalls Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen. Bei der Verwendung von Erbsen-TatA (in Grüntönen dargestellt) wird nach jedem Waschschriff eine deutlich höhere Transportrate erreicht als mit Spinat-TatA (in Rottönen dargestellt). Auf die Rekonstitution des Transports durch die TatA-Proteine scheint die Herkunft der verwendeten Thylakoide ebenfalls kaum Einfluss zu haben, denn auch hier ähneln sich die durch dasselbe TatA-Protein erreichten Transportraten für Spinat- und Erbsenthylakoide.

Für den Transport in Abb. 24 ist zu beachten, dass aufgrund der kurzen Transportdauer von 2 Minuten die Transportraten relativ gering sind. Daher könnten die Quantifizierungswerte für Ti-2 und reifes Protein Ungenauigkeiten aufweisen. So ist für die Verwendung von Erbsenthylakoiden das reife Protein kaum bis gar nicht zu erkennen, da dessen Signalintensität unterhalb der Detektionsgrenze liegt. Allerdings kann man trotz dessen von einem erfolgreichen Transport sprechen, da das Ti-2 als „Vertreter“ des bereits transportierten Proteins deutlich sichtbar ist.

Weiterhin ist zu beachten, dass sich die Signalstärke von membrangebundenem *RTS*-TatA aus Spinat und Erbse stark unterscheidet. Dies bedeutet, dass Spinat-TatA in diesem Versuch in wesentlich höherer Menge verfügbar ist als Erbsen-TatA. Das könnte dazu führen, dass eine Extraktion von Erbsen-TatA ausgehend von einer deutlich geringeren Gesamtmenge in der Membran einen größeren Effekt auf die Transportrate hat. Trotz dieser Schwierigkeit zeigt sich ein deutlicherer Effekt bei Verwendung von Spinat-TatA, was die limitierende Wirkung dieses Proteins noch einmal bestätigt. Die leichtere Extrahierbarkeit von Spinat-TatA aus der Thylakoidmembran im Vergleich zu Erbsen-TatA hat also auch einen Effekt auf die Transportaktivität der Thylakoide. Ob dieser Effekt tatsächlich nur in den Eigenschaften des TatA-Proteins selbst begründet ist oder noch weitere Faktoren Einfluss haben können, wird im Abschnitt Diskussion (Kapitel 2) diskutiert.

2 Vergleich der Aktivitäten unterschiedlicher TatA-Homologe

Anhand der Ergebnisse aus Kapitel 1.7 wurde bereits eine schwächere Bindung von Spinat-TatA an die Thylakoidmembran im Vergleich zum TatA-Protein aus Erbse postuliert. Weiterhin ist es interessant zu untersuchen, ob sich die Aktivitäten verschiedener TatA-Homologe unterscheiden, das heißt, ob sie in gleichem Maße den Transport eines Substratproteins über die Thylakoidmembran vermitteln können. Innerhalb der Arbeitsgruppe stehen für einen solchen Vergleich die TatA-Proteine aus Erbse, *Arabidopsis* und nach erfolgreicher Klonierung im Rahmen dieser Arbeit nun auch Spinat-TatA zur Verfügung. Diese drei Homologe sollen mithilfe der folgenden Versuche zunächst auf ihre allgemeine Funktionalität und später konkret auf ihre katalytische Aktivität in der Rolle eines Coenzym in Interaktion mit dem substratgebundenen TatBC-Rezeptorkomplex untersucht werden.

2.1 Vergleich der Funktionalität unterschiedlicher TatA-Versionen mittels *in vitro*-Synthese

Die einfachste Methode zum Vergleich der Effizienzen der TatA-Homologe stellt ein Transport-Rekonstitutionsexperiment dar. In solch einem Versuch soll der Transport eines Substratproteins ausschließlich durch das von außen zugegebene TatA-Protein vermittelt werden. Dafür wird vor dem eigentlichen Transportansatz eine Behandlung der Thylakoide mit anti-TatA-Antikörpern durchgeführt, um die intrinsischen TatA-Moleküle in ihrer Funktion zu blockieren. Die Zugabe von exogenem TatA führt dann zur Wiederherstellung der Transportfähigkeit. Dafür wurden die drei oben genannten TatA-Homologe über das *RTS*-System synthetisiert. Dieser Versuch stellt nur einen allgemeinen Test dar, ob die einzelnen TatA-Homologe in der Lage sind, den Tat-Transport vollständig zu rekonstituieren, wenn sie im Überschuss zum Transportansatz zugesetzt werden.

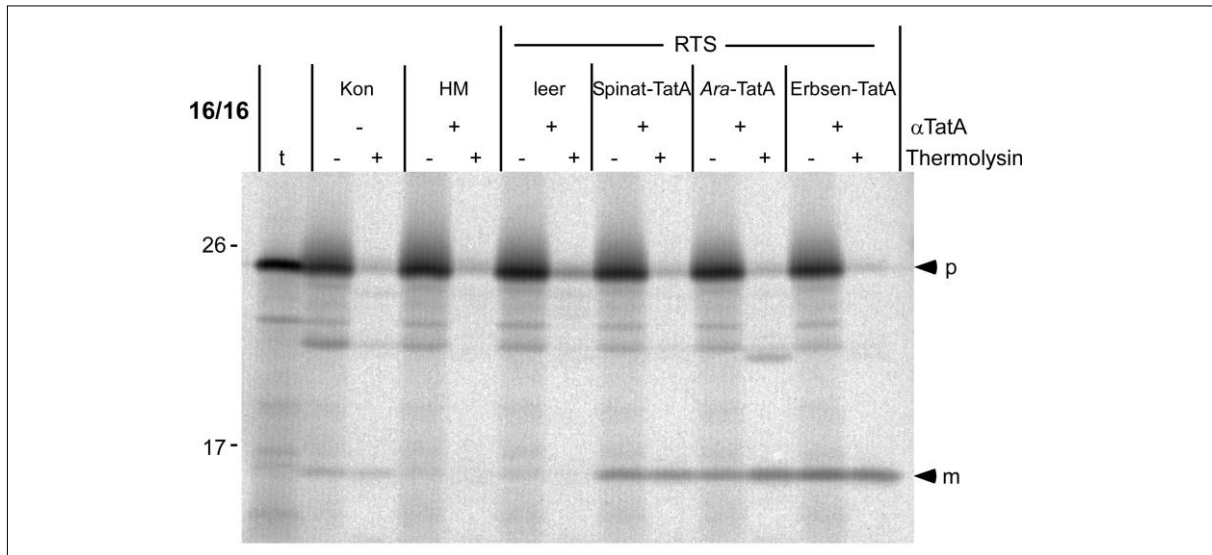


Abbildung 25: Rekonstitution des Transports des 16/16 Proteins in Spinatthylakoiden mittels Zugabe von RTS-TatA. Mit anti-TatA-Antikörpern (α TatA, im Verhältnis 1:2 eingesetzt) behandelte Thylakoidfraktionen wurden mit RTS-TatA aus Spinat, *Arabidopsis* (Ara TatA) oder Erbse versetzt und daraufhin die Transportreaktion durch Zugabe des 16/16 Proteins gestartet. Die „leer“-Fraktion enthielt zur Kontrolle nur die RTS-Komponenten ohne synthetisiertes Protein. Die Transportdauer betrug 10 min. Die Kontrolle (Kon) stellt unbehandelte, nach zwei Waschschrritten erhaltene Thylakoide dar (vgl. Fraktion „2x“ in Abb. 22), die HM-Fraktion (HM) beinhaltet Antikörper-behandelte Thylakoide. Die Signale des Vorläuferproteins (p) und des reifen Proteins (m) sind mit schwarzen Pfeilspitzen gekennzeichnet.

Die Kontrollfraktion in Abb. 25 zeigt, dass die verwendeten Thylakoide zwar transportkompetent waren, der Transport ist allerdings vergleichsweise schwach. Vermutlich liegt das am bereits beschriebenen Extraktionseffekt für TatA (siehe Kapitel 1.7), da diese Fraktion zweifach gewaschene Thylakoide beinhaltet. Für spätere Versuche sollte daher die Wahl der Thylakoide für die Kontrollfraktion überdacht werden. Die Inkubation der Thylakoide mit anti-TatA-Antikörpern (HM) führt zur vollständigen Inhibierung des Transports. Für jedes der drei TatA-Proteine ist eine erfolgreiche Transportrekonstitution zu erkennen, wogegen mittels „leer“-RTS-Ansatz ohne synthetisiertes Protein die Transportfähigkeit nicht wiederhergestellt werden kann. Die Rekonstitution des Transports ist also ausschließlich auf das synthetisierte TatA-Protein zurückzuführen. Im Vergleich der TatA-Ansätze zeigen sich für die Intensität des reifen Proteins in der (+) Fraktion Unterschiede. Es scheint, dass Spinat-TatA eine etwas geringere Transportrate des 16/16 Proteins erreichen kann als TatA aus *Arabidopsis* oder Erbse. Diese Beobachtung wurde in mehreren Wiederholungen des Experiments bestätigt und stellt also keinen Einzelfall dar. Für die anderen beiden TatA-Proteine sind die Signalintensitäten des reifen Proteins vergleichbar. So weist dieses Ergebnis schon darauf hin, dass alle drei TatA-Proteine den Transport erfolgreich rekonstituieren können, aber nicht in gleicher Effizienz arbeiten.

2.2 Vergleich der Aktivitäten unterschiedlicher TatA-Proteine (gereinigte Form)

Um die genaue Aktivität für die unterschiedlichen TatA-Proteine zu untersuchen, war es zunächst notwendig, Spinat-TatA in hoher Konzentration, löslicher Form und frei von Verunreinigungen zu gewinnen. Hierzu wurde für die Zielproteine eine heterologe Überexpression in *E. coli* durchgeführt. Im zugehörigen SDS-Gel (Abb. 26, „heterol. ÜE“) ist nach der Induktion mit IPTG („n.l.“, rot markiert) eine zusätzliche Bande bei ca. 19 kDa sichtbar, die das Spinat-TatA-Protein repräsentiert.

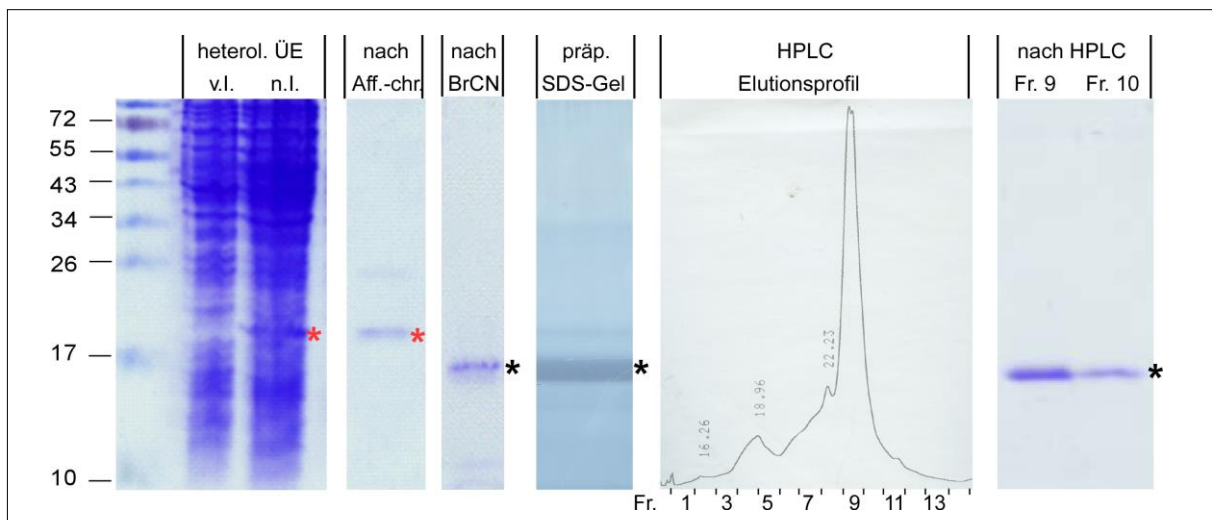


Abbildung 26: Heterologe Überexpression und Aufreinigung des TatA-Proteins aus Spinat. Die Gewinnung des Spinat-TatA-Proteins begann mit der heterologen Überexpression eines Konstruktes aus Spinat-TatA und einem N-terminal fusionierten Hexa-Histidin-tag (v.l.: vor Induktion, n.l.: nach Induktion mit IPTG). Die Cytoplasma-Fraktion wurde für eine Ni^{2+} -Affinitätschromatographie verwendet und die erhaltene Elutionsfraktion (nach Aff.-chr.) einer BrCN-Behandlung unterzogen. Nach erfolgreicher Abspaltung des tags (nach BrCN) folgte eine weitere Aufreinigung über präparative SDS-PAGE und Elektroelution. Abschließend wurde für die eluierten Proben eine *reversed-phase*-HPLC durchgeführt, in dessen Ergebnis zwei Fraktionen große Mengen an TatA ohne weitere Verunreinigungen enthielten. Nach jedem Reinigungsschritt wurden die Proben mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Colloidal-Färbung analysiert. Das Signal des den tag enthaltenden Fusionsproteins ist jeweils rot, das des erfolgreich gespaltenen Zielproteins in schwarz markiert.

Nach der Fraktionierung in lösliche und Membranfraktion stellte sich heraus, dass die Cytoplasma-Fraktion einen Großteil des synthetisierten Zielproteins enthielt (Daten nicht gezeigt), daher wurde die *inclusion bodies*-Fraktion verworfen. Die Cytoplasma-Fraktion wurde für eine Ni^{2+} -Affinitätschromatographie eingesetzt, wobei das synthetisierte Protein mithilfe eines N-terminal fusionierten Hexa-Histidin-tags spezifisch an die Ni-NTA-Sepharose-Matrix binden konnte. Nach der Elution in einem Imidazol-haltigen Puffer wurde mittels SDS-PAGE die Reinheit der Proteinlösung überprüft (siehe Abb. 26, „nach Aff.-Chr.“). Es zeigt sich ein Signal, das wiederum das TatA-Protein aus Spinat repräsentiert

(rot markiert) und eine weitere, schwache Bande oberhalb des Signals für das Zielprotein. Die gereinigte Cytoplasma-Fraktion wurde nun für eine BrCN-Behandlung eingesetzt, um den für die Ni²⁺-Affinitätschromatographie benötigten Hexa-Histidin-*tag* vom Zielprotein abzuspalten, da dieser in den folgenden Transport-Rekonstitutionsexperimenten störend wirken könnte. Nach erfolgreicher Spaltung zeigt das TatA-Protein aus Spinat eine etwas höhere Mobilität im SDS-Gel (Abb. 26, „nach BrCN“, schwarz markiert). Nach Lyophilisation der Proben folgte ein weiterer Reinigungsschritt über präparative SDS-PAGE. Die prägnante Bande im Zink-Imidazolgefärbten Gel (Abb. 26, „präp. SDS-Gel“) wurde ausgeschnitten und die Proteine durch Elektroelution gewonnen, um den abgespaltenen *tag* und weitere Protein-Kontaminationen zu entfernen. Die Elutionsfraktionen wurden anschließend für eine *reversed-phase*-HPLC verwendet, um eine Abtrennung des Zielproteins von Komponenten des SDS-Probenpuffers und eventuellen weiteren Verunreinigungen zu erreichen. Im Elutionsprofil zeigt sich ein deutlicher *Peak*, die zugehörigen Fraktionen 9 und 10 zeigten im Coomassie-Colloidalgefärbten Gel ein einziges Signal, das Spinat-TatA repräsentiert (Abb. 26, „nach HPLC“). Die so aufgereinigte TatA-Probe wurde bis zur Verwendung im Rekonstitutionsansatz bei 4° C in einem Acetonitril-Wasser-Gemisch aufbewahrt.

Bevor nun mit den Experimenten zum Vergleich der TatA-Aktivitäten begonnen werden konnte, war ein Vorversuch notwendig, der die geeignete Transportdauer für die Rekonstitution festlegte. Für die Ermittlung und den Vergleich von TatA-Aktivitäten ist es wichtig, dass die Transportexperimente mit der höchstmöglichen Reaktionsgeschwindigkeit ablaufen. Es sollte also vermieden werden, dass der Transport bereits durch irgendeinen Faktor limitiert wird, wie z.B. durch die Konzentration an zur Verfügung stehendem Substrat, den vorliegenden Protonengradienten oder der Stabilität der Thylakoide. Daher sollte eine möglichst geringe Transportdauer gewählt werden, bei der jedoch die Signalstärken des reifen Proteins hoch genug für eine verlässliche Quantifizierung sind. Dazu wurde ein Versuch ähnlich zu Abb. 12 konzipiert, in dem die zeitliche Abhängigkeit des Tat-Transports in Spinat analysiert werden soll. Es wurden anti-TatA-behandelte Thylakoide verwendet, die mit Spinat-TatA versetzt wurden, sodass eine finale TatA-Konzentration von 3 µM im Transportansatz eingestellt ist. Vorausgegangene Experimente zeigten, dass diese Konzentration einen Überschuss an TatA für die Transportreaktion darstellt.

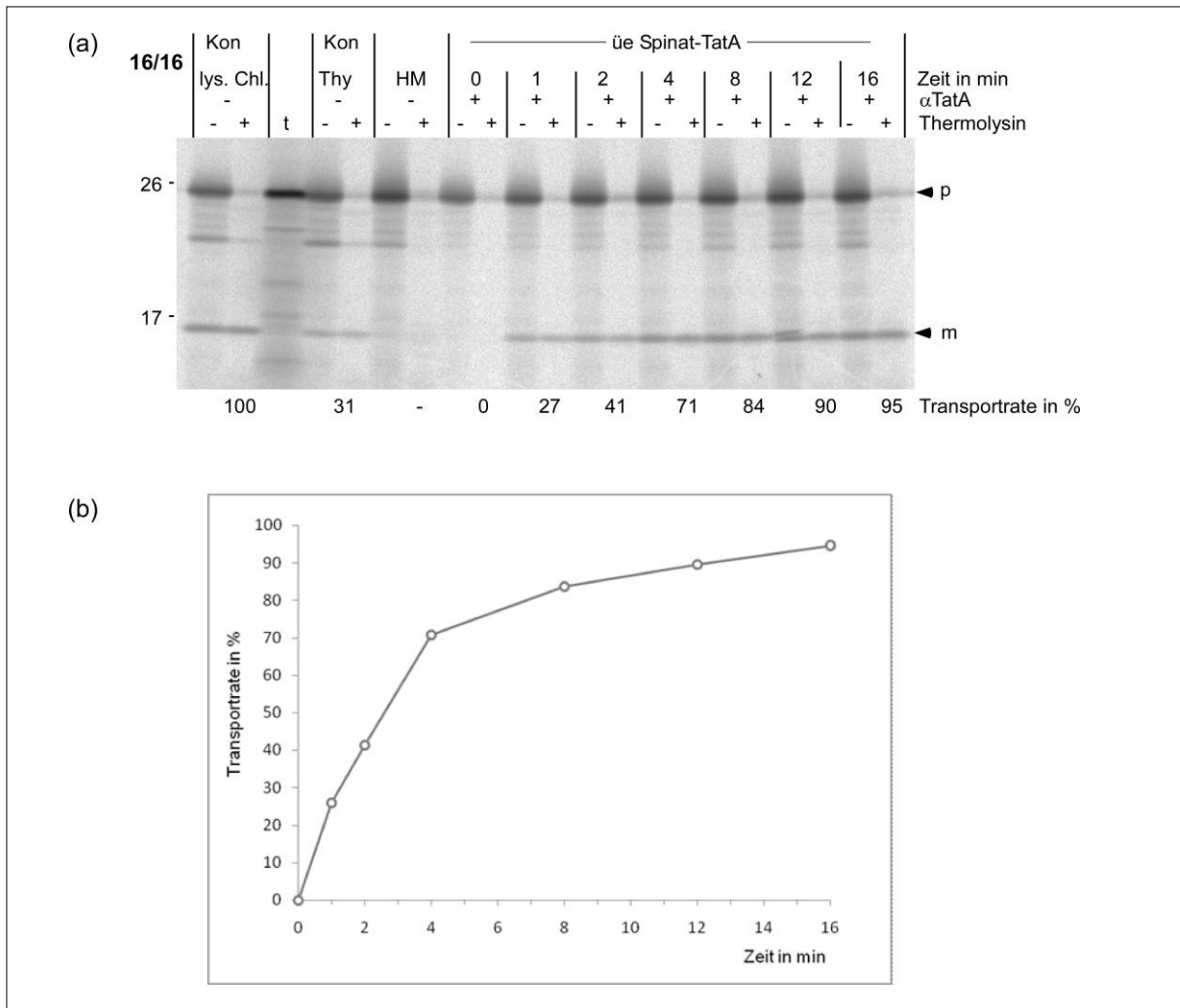


Abbildung 27: Rekonstitution des Transports des 16/16 Proteins in Spinatthylakoiden mittels Zugabe von gereinigtem TatA in Abhängigkeit von der Zeit. (a) Mit anti-TatA-Antikörpern (α TatA, im Verhältnis 1:2 eingesetzt) behandelte Thylakoidfraktionen wurden mit überexprimiertem und gereinigtem TatA aus Spinat (üe Spinat-TatA) in einer Endkonzentration von 3 μ M im Ansatz versetzt und daraufhin die Transportreaktion durch Zugabe des 16/16 Proteins gestartet. Die Transportzeiten sind über dem Autoradiogramm angegeben. Die Kontrollen (Kon) stellen unbehandelte, direkt aus der Lyse der Chloroplasten (lys. Chl.) oder nach darauffolgender Sedimentation erhaltene Thylakoide (Thy) dar, die Transportzeit für diese Kontrollen betrug 16 min. Die Signale des Vorläuferproteins (p) und des reifen Proteins (m) sind mit schwarzen Pfeilspitzen gekennzeichnet. Die Quantifizierungswerte für transportiertes Protein (m) sind unterhalb des Autoradiogramms angegeben und wurden in (b) in Abhängigkeit von der Zeit graphisch dargestellt.

Für den gezeigten und für alle weiteren Versuche wurde anders als in Abb. 25 ein alternativer Kontrollwert festgelegt. Unter Beachtung des in Kapitel 1.7 beschriebenen Effektes des TatA-Verlustes durch die Waschschrte während der Thylakoidpräparation scheint es sinnvoll, eine Thylakoidfraktion als Bezugswert zu wählen, die keine Waschschrte durchlaufen hat (vgl. lys. Chl. in Abb. 22). Für die Antikörper-Behandlung hingegen ist es wichtig, die Thylakoidmembranen zumindest durch Zentrifugation vom stromalen Extrakt abzutrennen, da die löslich vorkommenden TatA-Moleküle mit dem membranständigen Anteil um den

Antikörper konkurrieren würden und dadurch die Blockierung des Transports vermutlich nicht vollständig erreicht werden kann. Deshalb wurden im Folgenden zwei Kontrollfraktionen mitgeführt, wobei die erste (lys.Chl.) als Bezugswert für die Quantifizierung dient und die zweite (Thy, vgl. Abb. 22) die eigentliche Transportkontrolle darstellt.

Anhand der beiden Kontrollen ist in Abb. 27 (a) zu erkennen, dass die verwendeten Thylakoide transportkompetent waren. Die Inkubation mit anti-TatA-Antikörpern führte zur vollständigen Inhibierung des Tat-abhängigen Transports und durch Zugabe von gereinigtem Spinat-TatA konnte dieser rekonstituiert werden. Des Weiteren folgt die Transportrate dem erwarteten zeitlichen Verlauf (Abb. 27 (b)). Kurz nach Zugabe des Vorläuferproteins steigt die Transportrate rasch an. Ab einer Transportdauer von vier Minuten ist nur noch ein geringer Anstieg zu erkennen. Ausgehend von diesem Kurvenverlauf wurde eine Transportdauer von zwei Minuten für die Untersuchung der TatA-Aktivitäten festgelegt. Für diesen Zeitpunkt ist die Transportgeschwindigkeit (d. h. der Anstieg der Transportrate pro Zeiteinheit) maximal und das Signal des reifen Proteins ist deutlich erkennbar. Eine Transportdauer von einer Minute wäre durchaus noch günstiger, ist aber aus praktischen Gründen nicht durchführbar.

2.2.1 Theoretischer Ansatz für die Aktivitätsuntersuchung - TatA als Coenzym

Die genaue Funktion von TatA im Transportprozess ist noch nicht vollständig geklärt und wird intensiv diskutiert. Ein innerhalb der Arbeitsgruppe unterstütztes Modell beschreibt TatA als Coenzym, welches durch Interaktion mit dem substratgebundenen TatBC-Rezeptorkomplex den Transportprozess katalysiert und nach erfolgter Reaktion wieder freigesetzt wird. Dabei könnte durch die Interaktion mit TatA beispielsweise eine Konformationsänderung im Rezeptor ausgelöst werden, die zum Transport des Substrates über die Membran führt.

In diesem Modell wird der TatBC-Rezeptorkomplex selbst als Enzym definiert und der Transportprozess kann als enzymatische Reaktion beschrieben werden. Um nun Aussagen über die Aktivität von TatA als Coenzym treffen zu können, kann die Michaelis-Menten-Gleichung genutzt werden, welche die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit (v) von der Substratkonzentration $[S]$ beschreibt.

$$v = \frac{V_{\max} * [S]}{[S] + K_m}$$

Dabei stellt v die Reaktionsgeschwindigkeit dar sowie V_{\max} den hierfür maximal erreichbaren Wert. K_m wird als Michaelis-Konstante bezeichnet und ist ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat. Der Zahlenwert bezeichnet die Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit gemessen wird.

Für den Thylakoidtransport selbst müssen hier einige Anpassungen dieser Formel vorgenommen werden. Für die Aktivitätsanalyse von TatA als Coenzym wird die Reaktionsgeschwindigkeit v durch die relative Transportrate y eines bestimmten Substrates ausgedrückt und in Abhängigkeit von der Coenzym-Konzentration $[TatA]$ dargestellt. Dies ist dann möglich, wenn die Substratkonzentration im Reaktionsansatz konstant ist und das Substrat im deutlichen Überschuss zur Enzymmenge vorliegt. So kann ein direkter Einfluss der TatA-Konzentration auf die rekonstituierte Transportrate untersucht werden.

$$y = \frac{y_{\max} * [TatA]}{[TatA] + K_m}$$

Da bereits durch Hauer *et al.* (2013) für das TatA-Protein eine positive Kooperativität bewiesen werden konnte, wird die Gleichung um den Hill-Koeffizienten n ergänzt. Dieser liefert Informationen über die Kooperativität des Enzyms. Ist $n > 1$, besteht positive Kooperativität, bei $n < 1$ spricht man von negativer Kooperativität.

$$y = \frac{y_{\max} * [TatA]^n}{[TatA]^n + K_m}$$

Wenn nun für jedes TatA-Protein die Transportrate in Abhängigkeit von der TatA-Konzentration untersucht wird, so können über nichtlineare Regression der erhaltenen Messwerte nach der oben genannten Gleichung jeweils die Parameter K_m und y_{\max} bestimmt werden. Dabei liefert K_m Informationen über die Affinität von TatA zum substratgebundenen TatBC-Rezeptorkomplex, y_{\max} gibt die maximal erreichte Transportrate (in Abhängigkeit des eingesetzten TatA-Proteins) an. Mithilfe dieser beiden Parameter kann die **katalytische Aktivität** der eingesetzten TatA-Proteine ermittelt werden. Sie ergibt sich ursprünglich durch den Quotienten $\frac{k_{\text{cat}}}{K_m}$, wobei k_{cat} als Wechselzahl bezeichnet wird und den Substratumsatz pro Sekunde beschreibt. Für k_{cat} gilt der Zusammenhang: $k_{\text{cat}} = \frac{y_{\max}}{E}$. Dabei bezeichnet der Parameter E die Enzymkonzentration. Da innerhalb der Transportansätze die „Menge“ der

TatBC-Rezeptorkomplexe als konstant angenommen wird, ergibt sich für k_{cat} und y_{max} eine Proportionalität und somit kann y_{max} stellvertretend für k_{cat} zur Bestimmung der katalytischen Aktivität verwendet werden. Es gilt also:

$$\text{katalytische Aktivität: } \frac{y_{\text{max}}}{K_{\text{m}}}$$

Dieser Quotient dient dazu, die katalytische Aktivität eines TatA-Proteins in einem relativen Zahlenwert auszudrücken und so die Aktivitäten einzelner Homologe miteinander vergleichen zu können. Er erlaubt allerdings aufgrund der oben genannten Übertragungen der Parameter keinen Vergleich mit der katalytischen Aktivität anderer Enzyme.

2.2.2 Die TatA-Proteine aus Spinat und Arabidopsis unterscheiden sich in ihrer katalytischen Aktivität

Die folgenden Versuche dienen dem Vergleich der Aktivitäten der einzelnen TatA-Proteine aus Spinat, Erbse und *Arabidopsis*. Dazu sollten Transportrekonstitutionsexperimente durchgeführt und die Abhängigkeit der erreichten Transportraten von der TatA-Konzentration ermittelt werden. Es folgen mehrere im Grundaufbau identische Versuche. Der Unterschied liegt jeweils in der Herkunft der verwendeten Thylakoide oder der zugesetzten TatA-Proteine. Vor dem eigentlichen Transportversuch wurden anti-TatA-behandelte Thylakoidansätze mit TatA in verschiedenen Konzentrationsstufen von 0,025 μM bis 3 μM ergänzt. Durch Zugabe des 16/16 Proteins wurde die Transportreaktion gestartet. Die erhaltenen Signale für das reife Protein wurden quantifiziert. In Abb. 28 ist zunächst das resultierende Autoradiogramm des Rekonstitutionsversuchs in Spinatthylakoiden unter Verwendung von Spinat-TatA gezeigt.

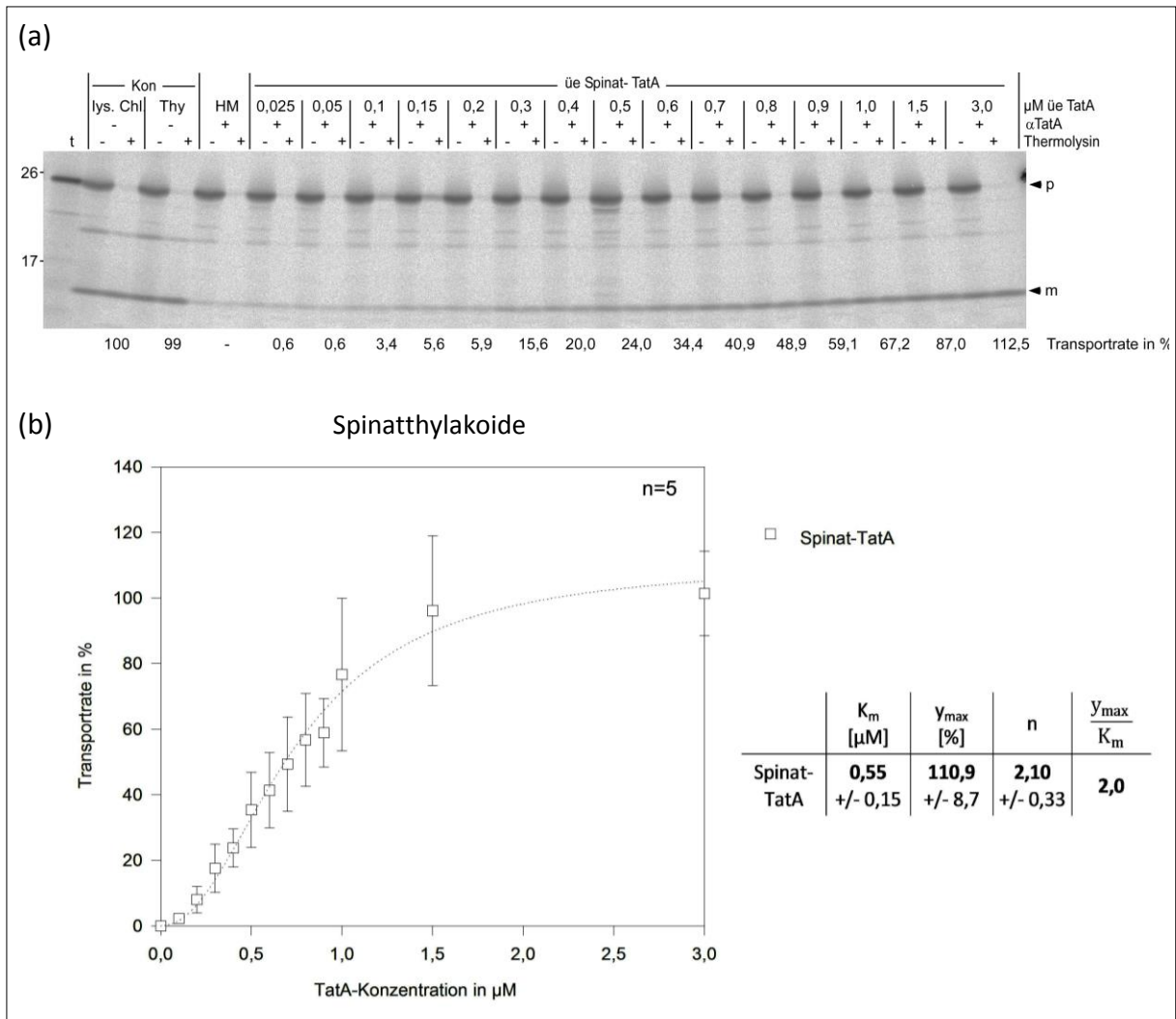


Abbildung 28: Transportrekonstitutionsexperiment und Ermittlung der Aktivität für Spinat-TatA unter Verwendung von Spinatthylakoiden. (a) Mit anti-TatA-Antikörpern (α TatA, im Verhältnis 1:2 eingesetzt) behandelte Thylakoidfraktionen wurden mit überexprimiertem und gereinigtem TatA aus Spinat (üe Spinat-TatA) in verschiedenen Konzentrationsstufen versetzt. Daraufhin wurde die Transportreaktion durch Zugabe des 16/16 Proteins gestartet. Die Transportdauer betrug 2 min. Die Kontrollen (Kon) stellen unbehandelte, direkt aus der Lyse der Chloroplasten (lys. Chl.) oder nach darauffolgender Sedimentation erhaltene Thylakoide (Thy) dar. Die Signale des Vorläuferproteins (p) und des reifen Proteins (m) sind mit schwarzen Pfeilspitzen gekennzeichnet. Die Quantifizierungswerte für transportiertes Protein (m) sind unterhalb des Autoradiogramms angegeben. In (b) wurden die Quantifizierungswerte für fünf unabhängige Wiederholungen des Experiments in (a) zusammengefasst und mithilfe der Mittelwerte und Standardabweichungen in Abhängigkeit von der TatA-Konzentration graphisch dargestellt. Die als gepunktete Kurve dargestellte nichtlineare Regression basiert auf der Hill-Gleichung ($y = \frac{y_{max} \times [TatA]^n}{[TatA]^n + K_m}$), die entsprechenden Parameter K_m (in μ M), y_{max} (in %) und n sowie der Quotient für die katalytische Aktivität y_{max}/K_m sind angegeben.

Wiederum erkennt man hier einen erfolgreichen Transport in beiden Kontrollansätzen (lys. Chl.; Thy). Auch die anti-TatA-Behandlung erzielte den erwünschten Effekt, sodass in der Negativkontrolle (HM) der Transport nahezu vollständig inhibiert ist. Betrachtet man die nachfolgenden Fraktionen in Abbildung 28, zeigt sich, dass Spinat-TatA in niedrigen Konzentrationsbereichen nicht oder nur geringfügig in der Lage ist, die Transportfähigkeit wiederherzustellen. Erst ab einer Konzentration von 0,3 μ M erkennt man eine deutliche

Rekonstitution des Transports. Mit aufsteigenden TatA-Mengen verstärkt sich diese dann stetig, bis nur noch ein leichter Anstieg zu verzeichnen ist (etwa ab 1,5 μM TatA).

Das gezeigte Experiment wurde viermal wiederholt, die aus den Datensätzen resultierenden Mittelwerte und Standardabweichungen wurden graphisch dargestellt (Abb. 28 (b)). Mithilfe der Daten wurde eine nichtlineare Regression nach der Hill-Gleichung durchgeführt. Die resultierenden Parameter sind jeweils neben dem Diagramm angegeben.

Für die erhaltene Kurve und auch die berechneten Parameter für Spinat-TatA zeigen sich deutliche Unterschiede zu den in Hauer *et al.* (2013) dargestellten Daten (zum Vergleich in Abb. 29 gezeigt).

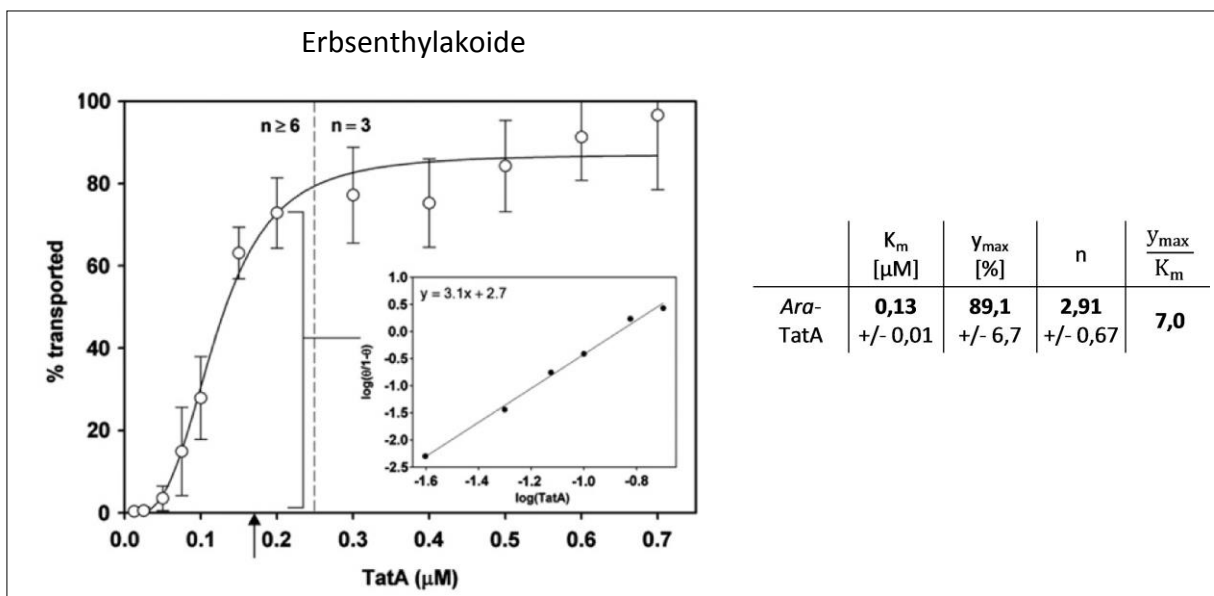


Abbildung 29: Vergleichsabbildung zu Abb. 28, übernommen aus Hauer *et al.* (2013), unter Verwendung von *Arabidopsis*-TatA. Der Versuchsablauf entspricht den Angaben aus Abb. 28, allerdings wurden hier Erbsenthylakoide verwendet. Als Substrat wurde das 16/23 Protein ausgewählt, für die Rekonstitution kam *Arabidopsis*-TatA zum Einsatz. Die Kontrolle repräsentierte zweifach gewaschene Thylakoide. Die Quantifizierungswerte für 3 (ab 0,25 μM) bzw. 6 (bis 0,25 μM) unabhängige Wiederholungen des Experiments wurden zusammengefasst und mithilfe der Mittelwerte und Standardabweichungen in Abhängigkeit von der TatA-Konzentration graphisch dargestellt. Die Details der nichtlinearen Regression sind der Publikation zu entnehmen. Die entsprechenden Parameter K_m (in μM), y_{\max} (in %) und n sowie der Quotient für die katalytische Aktivität y_{\max}/K_m sind angegeben.

Obwohl beide Kurven der Transportraten einen sigmoidalen Verlauf besitzen, erzielt das dort eingesetzte *Arabidopsis*-TatA in sehr geringen Konzentrationen erheblich höhere Transportraten im Vergleich zu Spinat-TatA. Auch die über die nichtlineare Regression ermittelten Parameter weisen Unterschiede auf. Neben leicht voneinander abweichenden y_{\max} -Werten (für *Arabidopsis*-TatA: ca. 89 %; für Spinat-TatA: ca. 111 %) weichen die K_m -Werte (0,13 μM für *Arabidopsis*-TatA vs. 0,55 μM für Spinat-TatA) stark voneinander ab.

Dies führt auch zu unterschiedlichen Werten für die katalytische Aktivität, für *Arabidopsis*-TatA beträgt der berechnete Quotient mit 7,0 mehr als das Dreifache des Wertes für Spinat-TatA (2,0). Ausgehend von diesem Ergebnis könnten bereits unterschiedliche Aktivitäten der beiden Tat-Proteine vermutet werden.

Aufgrund mehrerer Unterschiede in den Versuchsdetails ist allerdings die Vergleichbarkeit der beiden Experimente eingeschränkt. Während in Hauer *et al.* (2013) Erbsenthylakoide verwendet wurden, stammt das Thylakoidmaterial für den in Abb. 28 gezeigten Versuch aus Spinat. Es besteht die Möglichkeit, dass die beiden Spezies einen unterschiedlichen TatA-Bedarf für einen erfolgreichen Tat-abhängigen Transport besitzen, was die Messergebnisse beeinflussen könnte. Weiterhin wurden im von Hauer *et al.* (2013) gezeigten Experiment und dem in Abb. 28 dargestellten Versuch unterschiedliche Transportsubstrate verwendet. Ein Einfluss des eingesetzten Substratproteins auf den TatA-Bedarf ist bisher noch nicht hinreichend untersucht worden. Für ein zu Abb. 28 vergleichbares Experiment wurde der Rekonstitutionsversuch für *Arabidopsis*-TatA mit Spinatthylakoiden und dem 16/16 Protein als Substrat wiederholt (siehe Abb. 30). Die in Abb. 28 gezeigte Kurve für Spinat-TatA mit Thylakoidmaterial aus Spinat ist zum Vergleich ebenfalls dargestellt.

In Abb. 30 ist zu erkennen, dass *Arabidopsis*-TatA auch in Spinatthylakoiden schon in sehr geringen Konzentrationen den Transport rekonstituieren kann. Deutliche Signale des reifen Proteins sind hier bereits ab einer TatA-Konzentration von 0,025 μM zu erkennen. Mit steigender TatA-Konzentration erhöht sich die Transportrate drastisch, ab einer Konzentration von 0,5 μM ist nur noch eine degressive Steigung zu erkennen. Mittels nichtlinearer Regression ergeben sich im Vergleich zu den Daten für Spinat-TatA stark abweichende Werte für K_m und die katalytische Aktivität (K_m : 0,14 μM für *Arabidopsis*-TatA vs. 0,55 μM für Spinat-TatA, kat. Aktivität: 8,9 für *Arabidopsis*-TatA vs. 2,0 für Spinat-TatA). Der gesamte Kurvenverlauf für *Arabidopsis*-TatA entspricht ungefähr den Beobachtungen von Hauer *et al.* (2013) in Erbsenthylakoiden (siehe Abb. 29). Auch K_m für den hier gezeigten Versuch (0,14 μM) ähnelt dem beschriebenen Wert in der Publikation (0,13 μM). Die beiden Quotienten für die katalytische Aktivität (*Arabidopsis*-TatA mit Spinatthylakoiden: 8,9; *Arabidopsis*-TatA mit Erbsenthylakoiden: 7,0) sind ebenfalls vergleichbar. Diese Beobachtung würde dafür sprechen, dass für die TatA-Aktivitätsanalyse die Herkunft des Thylakoidmaterials keine Rolle spielt.

wurde auf die Darstellung der Autoradiogramme verzichtet und nur die Transportraten in Abhängigkeit von der TatA-Konzentration graphisch dargestellt.

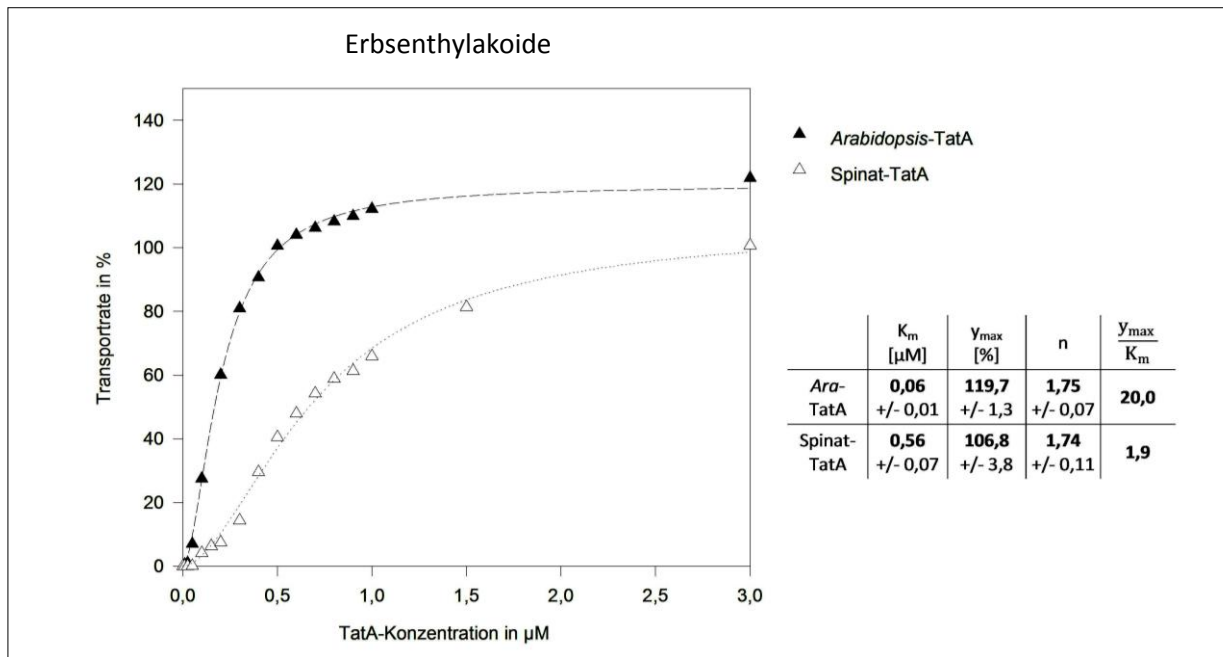


Abbildung 31: Vergleich der Rekonstitution und der ermittelten Aktivitäten für Spinat-/Arabidopsis-TatA unter Verwendung von Erbsenthylakoiden. Mit anti-TatA-Antikörpern (αTatA , im Verhältnis 1:4 eingesetzt) behandelte Thylakoidfraktionen wurden mit gereinigtem Spinat-/Arabidopsis-TatA in verschiedenen Konzentrationsstufen versetzt und daraufhin die Transportreaktion durch Zugabe des 16/16 Proteins gestartet. Die Kontrolle stellt zweifach gewaschene Thylakoide dar. Für die Transportbedingungen, siehe Abb. 28. Die Quantifizierungswerte für transportiertes Protein sind in Abhängigkeit von der TatA-Konzentration graphisch dargestellt. Die als gestrichelte bzw. gepunktete Kurven dargestellten nichtlinearen Regressionen basieren auf der Hill-Gleichung ($y = \frac{y_{\text{max}} \times [\text{TatA}]^n}{[\text{TatA}]^n + K_m}$), die entsprechenden Parameter K_m (in μM), y_{max} (in %) und n sowie der Quotient für die katalytische Aktivität y_{max}/K_m sind jeweils angegeben.

Im Vergleich der erhaltenen Graphen (Abb. 31) mit den Ergebnissen in Abb. 30 ergibt sich ein ähnliches Bild. Unter der Verwendung von *Arabidopsis*-TatA erhöht sich die Transportrate mit steigender Konzentration stärker als für Spinat-TatA. Der ermittelte K_m -Wert zeigt sich mit $0,06 \mu\text{M}$ deutlich geringer als der für Spinat-TatA ermittelte K_m ($0,56 \mu\text{M}$) und deutet somit auf eine höhere Affinität zum Rezeptorkomplex hin. Die katalytische Aktivität der beiden Proteine unterscheidet sich um einen Faktor von 10. Da diese Diskrepanz jeweils unter der Verwendung von Erbsen- und Spinatthylakoiden auftritt, ist hiermit bewiesen, dass die Herkunft der eingesetzten Thylakoide keinen Einfluss auf die Aktivitätsunterschiede der beiden TatA-Proteine hat.

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Unterschiede in der TatA-Aktivität substratspezifisch sind oder generell gelten, wurde der Versuch aus Abb. 28 unter Verwendung des 23/23 Proteins als Transportsubstrat wiederholt. Da die Kurvenverläufe für jedes einzelne TatA-

Protein unabhängig von der Herkunft der verwendeten Thylakoide sind, wurde das folgende und alle weiteren Experimente zum Vergleich der TatA-Aktivitäten mit Erbsenthylakoiden durchgeführt. Dies hatte nicht nur den Vorteil, dass die Präparation von Erbsenchloroplasten weniger aufwändig ist, hierbei muss auch kein Extraktionseffekt (wie für Spinat) berücksichtigt werden und somit kann auf die Standard-Kontrolle zurückgegriffen werden. Zudem kann durch die Verwendung von Erbsenthylakoiden ein Vergleich zu den Werten von Hauer *et al.* (2013) gezogen werden.

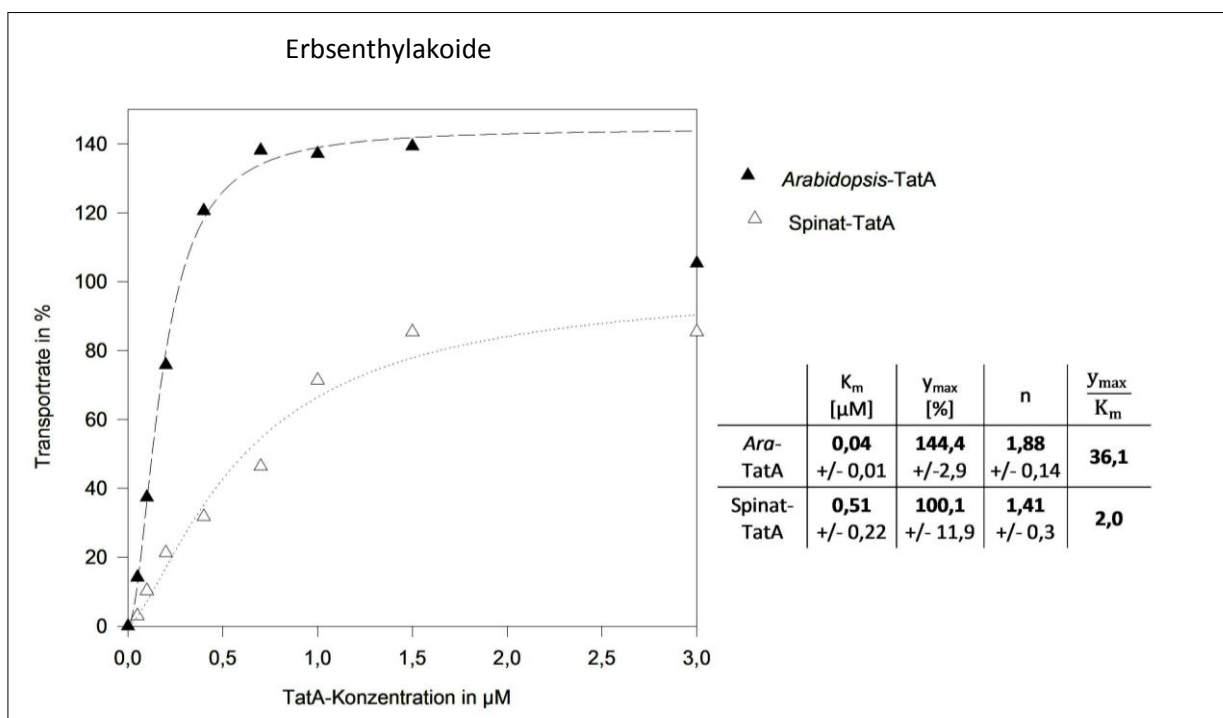


Abbildung 32: Vergleich der Rekonstitution und der ermittelten Aktivitäten für Spinat-/Arabidopsis-TatA unter Verwendung von Erbsenthylakoiden und des 23/23 Proteins. Mit anti-TatA-Antikörpern (αTatA , im Verhältnis 1:4 eingesetzt) behandelte Thylakoidfraktionen wurden mit gereinigtem Spinat-/Arabidopsis-TatA in verschiedenen Konzentrationsstufen versetzt und daraufhin die Transportreaktion durch Zugabe des 23/23 Proteins gestartet. Die Kontrolle stellte zweifach gewaschene Thylakoide dar. Für die Transportbedingungen, siehe Abb. 28. Die Quantifizierungswerte für transportiertes Protein sind in Abhängigkeit von der TatA-Konzentration graphisch dargestellt. Die als gestrichelte bzw. durchgängige Kurven dargestellten nichtlinearen Regressionen basieren auf der Hill-Gleichung ($y = y_{\text{max}} \times [\text{TatA}]^n / ([\text{TatA}]^n + K_m)$), die entsprechenden Parameter K_m (in μM), y_{max} (in %) und n sowie der Quotient für die katalytische Aktivität y_{max}/K_m sind jeweils angegeben.

Beim Vergleich der beiden Kurvenverläufe in Abb. 32 fallen erneut gravierende Unterschiede in der Rekonstitution des Transports durch die TatA-Proteine auf. Spinat-TatA kann ein weiteres Mal in geringen Konzentrationen kleinere Transportraten hervorrufen als vergleichbare Mengen des Arabidopsis-TatA-Proteins. Die ebenfalls starke Abweichung der K_m -Werte (0,04 μM für Arabidopsis-TatA vs. 0,51 μM für Spinat-TatA) und der katalytischen

Aktivitäten bestärkt noch einmal die schon beobachtete Diskrepanz. Die jeweiligen Kurvenverläufe und ermittelten Werte ähneln wiederum für jedes TatA den erhaltenen Daten aus Abb. 31, was stark darauf hinweist, dass die Wahl des zu transportierenden Substratproteins unerheblich für die Aktivitätsunterschiede zwischen den beiden TatA-Proteinen ist.

2.2.3 Untersuchung der Aktivität von TatA aus Erbse

Das in Hauer *et al.* (2013) eingesetzte TatA stammte aus *Arabidopsis*. Das Homolog aus Erbse war zum Zeitpunkt der dort gezeigten Untersuchungen nicht stabil genug, um es in ausreichender Konzentration für die Rekonstitutionsexperimente einzusetzen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher für dieses Protein (unter anderem) veränderte Bedingungen während der Dialyse getestet (Daten nicht gezeigt). Ein durch einen schmalen Dialyseschlauch verändertes Oberfläche-Volumen-Verhältnis bewirkte eine zureichend hohe Konzentration und Stabilität des TatA-Proteins. Nun konnte auch mit TatA aus Erbse eine Aktivitätsanalyse durchgeführt werden. Dies sollte Informationen darüber liefern, ob etwa jedes einzelne TatA-Protein eine unterschiedliche Aktivität im Rekonstitutionsansatz besitzt oder ob ein TatA-Homolog eventuell ein Ausnahmeverhalten zeigt. Für den folgenden Versuch wurde also Erbsen-TatA für die Rekonstitution des Transports des 16/16-Proteins in Erbsenthylakoide verwendet. Die erhaltenen Daten wurden ebenfalls über nichtlineare Regression ausgewertet. In Abb. 33 sind die Werte für Erbsen-TatA graphisch dargestellt und mit den Kurven für *Arabidopsis*-/ Spinat-TatA aus Abb. 31 verglichen.

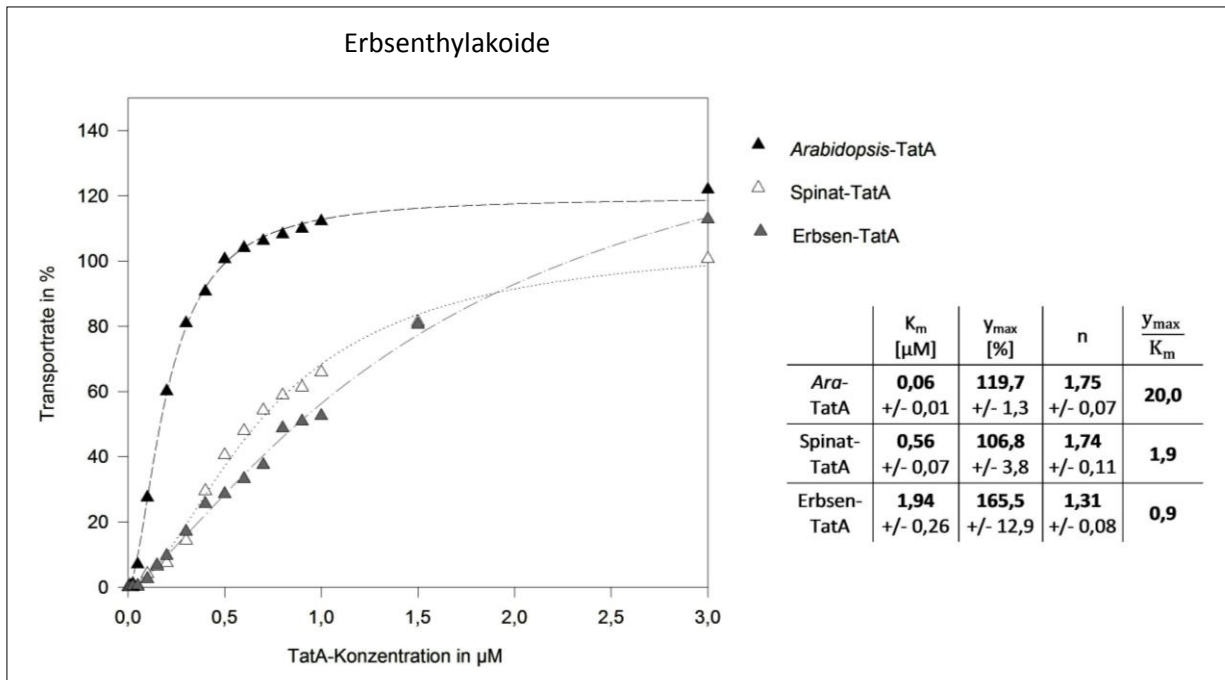


Abbildung 33: Vergleich der Transportrekonstitution und der ermittelten Aktivitäten für Spinat-/Arabidopsis-/Erbsen-TatA unter Verwendung von Erbsenthylakoiden. Mit anti-TatA-Antikörpern (α TatA, im Verhältnis 1:4 eingesetzt) behandelte Thylakoidfraktionen wurden mit gereinigtem Erbsen-TatA in verschiedenen Konzentrationsstufen versetzt und daraufhin die Transportreaktion durch Zugabe des 16/16 Proteins gestartet. Die Kontrolle stellt zweifach gewaschene Thylakoide dar. Für die Transportbedingungen, siehe Abb 28. Die Quantifizierungswerte für transportiertes Protein sind in Abhängigkeit von der TatA-Konzentration graphisch dargestellt. Zum Vergleich sind ebenfalls die Daten aus Abb. 31 gezeigt. Die als gepunktete bzw. gestrichelte Graphen dargestellten nichtlinearen Regressionen basieren auf der Hill-Gleichung ($y = y_{\text{max}} \times [\text{TatA}]^n / ([\text{TatA}]^n + K_m)$), die entsprechenden Parameter K_m (in μM), y_{max} (in %) und n sowie der Quotient für die katalytische Aktivität y_{max}/K_m sind jeweils angegeben.

Für den Graph von Erbsen-TatA fallen Ähnlichkeiten zur Kurve für Spinat-TatA auf. Ein sigmoidaler Verlauf ist hier allerdings nicht zu erkennen. Vermutlich sind auch aus diesem Grund der aus der Regression ermittelte K_m -Wert mit 1,94 sowie y_{max} mit 165,6% fehlerbehaftet. Allgemein lässt sich aber sagen, dass die Kurve sich durch einen deutlich flacheren Anstieg zum Graphen für *Arabidopsis*-TatA abgrenzt. Die katalytische Aktivität ähnelt mit 0,9 dem erhaltenen Wert für Spinat-TatA.

Daraus kann geschlossen werden, dass unter den verwendeten TatA-Homologen anscheinend, die Aktivität betreffend, zwei verschiedene Populationen existieren und es sich bei dem TatA-Protein aus *Arabidopsis* um das aktivere Homolog handelt. Allerdings muss das Ergebnis für Erbsen-TatA zukünftig durch Wiederholung verifiziert werden.

2.3 Mögliche Gründe für die unterschiedlichen katalytischen Aktivitäten der TatA-Proteine

Mithilfe der vorigen Versuche konnte gezeigt werden, dass zwischen den TatA-Proteinen aus unterschiedlichen Spezies durchaus Unterschiede in der katalytischen Aktivität im Rekonstitutionsansatz bestehen. Dies kann verschiedene Gründe haben, die im Folgenden näher untersucht werden sollen.

2.3.1 Der Effekt der Löslichkeit auf die katalytische Aktivität von TatA

Eine mögliche Erklärung für die voneinander abweichenden Aktivitäten könnte eine unterschiedliche Löslichkeit der TatA-Proteine im wässrigen Milieu sein. Vor dem eigentlichen Transportversuch wurde eine Dialyse der aus der HPLC-Reinigung erhaltenen Fraktionen durchgeführt, um das Acetonitril-Wasser-Gemisch gegen einen für das folgende Experiment geeigneten Puffer auszutauschen. Durch eine unterschiedliche Aminosäure-Zusammensetzung kann die Löslichkeit der TatA-Proteine in diesem Puffer variieren. So kann es passieren, dass in unterschiedlichem Maße Aggregate entstehen und daher die Menge an löslichem und damit aktivem TatA variiert, was zwangsläufig einen Unterschied in der katalytischen Aktivität der TatA-Proben bedeuten würde.

Mit dem *RTS*-System ist dagegen eine Translationsmaschinerie verfügbar, die die Zielproteine mit hoher Löslichkeit synthetisiert, denn der Reaktionsansatz enthält außer der Komponenten für die Proteinsynthese verschiedenste weitere Zusätze, unter anderem auch Chaperone. So ist bei konstanten Translationsbedingungen eine gleichbleibende Löslichkeit der Zielproteine zu erwarten. Im nächsten Experiment wurde daher der in Abb. 33 beschriebene Versuch wiederholt, aber mit über *RTS* translatierten TatA-Proteinen durchgeführt. Eine besondere Herausforderung stellte jedoch in diesem Fall die Quantifizierung der Proteine dar. Aufgrund der zahlreichen Komponenten im Translationsansatz ist die Methode der Proteinbestimmung nach Bradford (1976) nicht anwendbar. Als Alternative wurde daher die Quantifizierung über SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Colloidal-Färbung oder Western Blot durchgeführt. Diese Methode erwies sich jedoch als fehlerbehaftet, da die TatA-Signale vermutlich aufgrund sehr hoher Menge an Gesamtprotein auffällig diffus erscheinen und damit eine Quantifizierung sehr erschweren. So sind die Ergebnisse in Abb. 34 nur bedingt aussagekräftig.

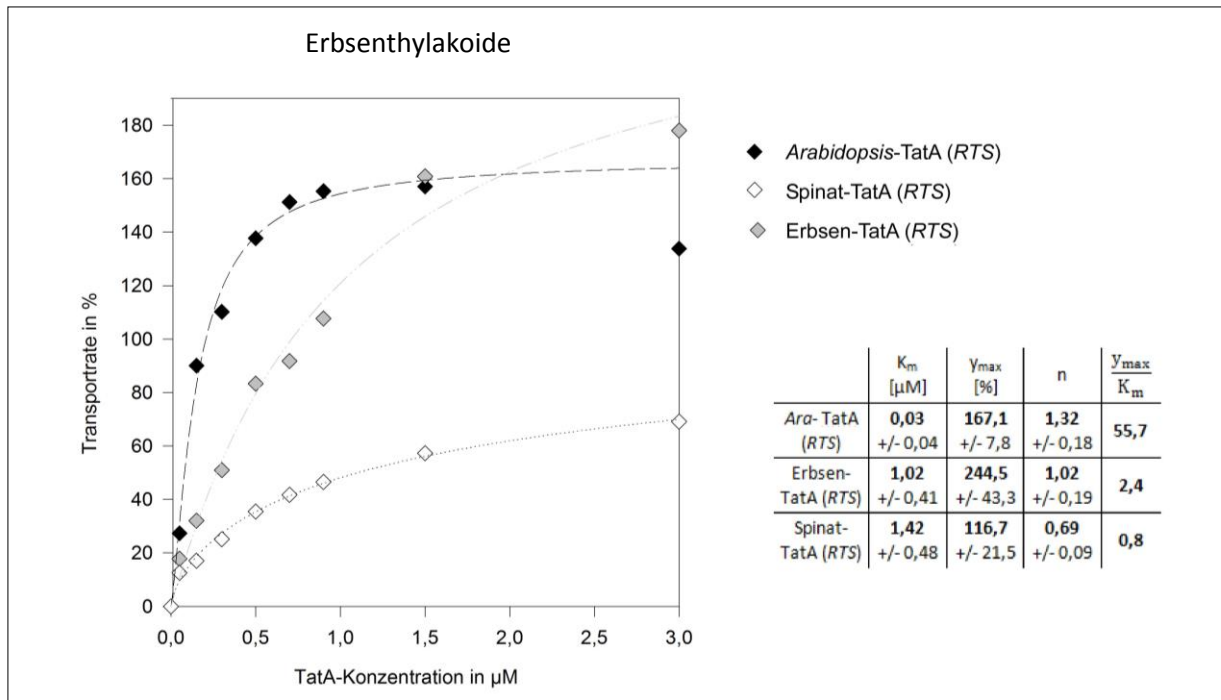


Abbildung 34: Vergleich der Transportrekonstitution und der ermittelten Aktivitäten für RTS-Spinat-/Arabidopsis-/Erbsen-TatA unter Verwendung von Erbsenthylakoiden. Mit anti-TatA-Antikörpern (α TatA, im Verhältnis 1:4 eingesetzt) behandelte Thylakoidfraktionen wurden mit über RTS translatiertem Spinat- / Arabidopsis- / Erbsen-TatA in verschiedenen Konzentrationsstufen versetzt und daraufhin die Transportreaktion durch Zugabe des 16/16 Proteins gestartet. Die Kontrolle stellt zweifach gewaschene Thylakoide dar. Für die Transportbedingungen, siehe Abb. 28. Die Quantifizierungswerte für transportiertes Protein sind in Abhängigkeit von der TatA-Konzentration graphisch dargestellt. Die als gepunktete bzw. gestrichelte Kurven dargestellten nichtlinearen Regressionen basieren auf der Hill-Gleichung ($y=y_{\text{max}} \times [\text{TatA}]^n / ([\text{TatA}]^n + K_m)$), die entsprechenden Parameter K_m (in μM), y_{max} (in %) und n sowie der Quotient für die katalytische Aktivität y_{max}/K_m sind jeweils angegeben.

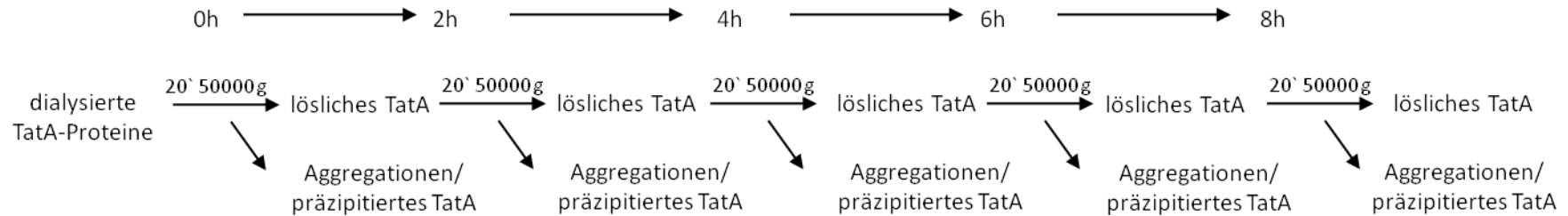
Dennoch kann man für die verschiedenen TatA-Proteine deutliche Unterschiede im Kurvenverlauf und ebenfalls für die Parameter K_m , y_{max} und die katalytische Aktivität erkennen. Wiederum erscheint *Arabidopsis*-TatA deutlich aktiver als die TatA-Proteine aus Erbsen und Spinat. Letzteres kann den Transport des 16/16 Proteins in RTS-Form nur maximal bis 60 % rekonstituieren (siehe Abb. 34). Aufgrund dieser schwachen Rekonstitution müssen die Daten für TatA aus Spinat unter Vorbehalt betrachtet werden. Erbsen-TatA zeigt dagegen eine erfolgreiche Rekonstitution des Transports, dennoch ist der Unterschied im Kurvenverlauf zu *Arabidopsis*-TatA deutlich zu erkennen. Die Quotienten für die katalytische Aktivität unterscheiden sich mit 2,4 zu 55,7 in diesem Experiment am deutlichsten. Im Vergleich mit den Ergebnissen aus den vorangegangenen Experimenten liefert dieses Ergebnis einen ersten Hinweis darauf, dass die Unterschiede in den Aktivitäten der TatA-Proteine aus unterschiedlichen Spezies im Allgemeinen nicht von abweichenden Löslichkeiten im jeweiligen Puffer bedingt werden.

Aufgrund der Schwierigkeiten, die sich im Zuge der Quantifizierung der *RTS-TatA*-Proteine ergaben und der Tatsache, dass die Daten für *RTS-Spinat-TatA* keine klare Aussage zur Aktivität erlaubten, wurde zur Frage nach dem Einfluss der Löslichkeit auf die Aktivität noch ein weiteres Experiment durchgeführt. Dieses sollte auf das Aggregationsverhalten der *TatA*-Proteine in Lösung abzielen, denn solch ein Verhalten könnte durchaus während der drei- bis vierstündigen Lagerung auf Eis auftreten, bedingt durch die zeitintensive Versuchsvorbereitung. Dadurch könnten die ermittelten katalytischen Aktivitäten der *TatA*-Proteine verfälscht werden.

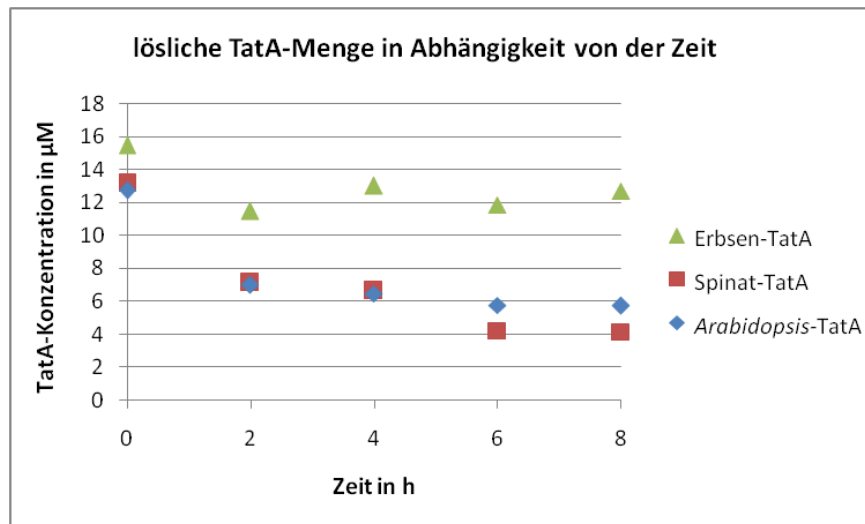
Unterschiede in der Löslichkeit können mit einem Versuchsansatz überprüft werden, der auf der Trennung aggregierter Proteinanteile von der löslichen Fraktion basiert. Dazu wurden von der jeweiligen *TatA*-Lösung gleiche Volumina für eine Dialyse gegen HM-Puffer eingesetzt. Die während dieser Prozedur entstandenen Aggregate/Präzipitate wurden durch Zentrifugation abgetrennt. Die Proteine wurden auf Eis gelagert, die Fraktionierung wurde in zweistündigen Abständen wiederholt, um eventuell eine zeitabhängige Präzipitation beobachten zu können (zum Versuchsablauf siehe Abb. 35 (a)). Die löslichen Fraktionen wurden jeweils einer Proteinbestimmung unterzogen, um direkt die *TatA*-Konzentration zu ermitteln. Die Präzipitate wurden in Probenpuffer gelöst und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das erhaltene SDS-Gel wurde Coomassie-Colloidal gefärbt, wodurch die *TatA*-Signale sichtbar werden. Diese Banden wurden schließlich quantifiziert. In Abb. 35 (b) sind die Ergebnisse für die Konzentrationsbestimmung der löslichen Proteinanteile zu sehen. Bereits nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden auf Eis scheint ein erheblicher Teil der *TatA*-Proteine in der Lösung zu aggregieren oder einer Präzipitation zu unterliegen. Eine weitere Lagerung bewirkte nur noch eine geringe Abnahme der Menge an löslichem Protein.

Bei genauerer Betrachtung der Messreihen in Abb. 35 (b) fällt auf, dass im Falle von Erbsen-*TatA* vergleichsweise etwas mehr Protein in löslicher Form verbleibt. Entsprechend ist auch die Menge an präzipitiertem Proteinanteil (Abb. 35 (c)) geringer als für die anderen beiden *TatA*-Proteine. Dies weist auf eine generell höhere Löslichkeit von Erbsen-*TatA* hin. Hier ist allerdings wichtig zu erwähnen, dass das gezeigte Experiment nur einen Beispierversuch darstellt. In einer Wiederholung des Experimentes unter identischen Bedingungen mit frisch dialysierten *TatA*-Proben zeigte jedoch wiederum *Spinat-TatA* die größte Stabilität (Daten nicht gezeigt).

(a)



(b)



(c)

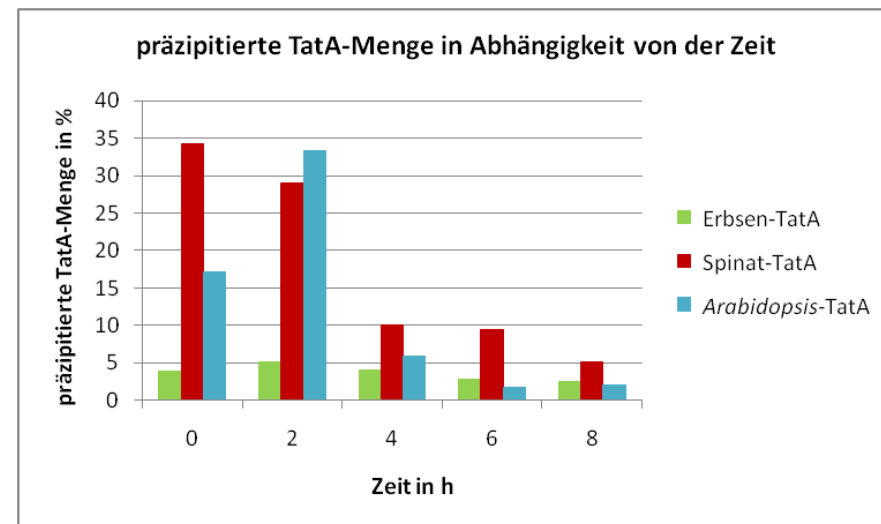


Abbildung 35: Versuchsansatz zur Überprüfung der Löslichkeit der unterschiedlichen TatA-Proteine. (a) Schematische Darstellung der einzelnen Schritte. Die Dialyse der TatA-Lösungen erfolgte über Nacht gegen HM-Puffer. Direkt danach schloss sich die Abtrennung der Aggregate durch Zentrifugation an, die jeweils nach 2 Stunden Inkubation auf Eis wiederholt wurde. (b) Die erhaltenen löslichen Fraktionen wurden jeweils einer Proteinbestimmung unterzogen. (c) Zusätzlich wurde jede Fraktion der Aggregate für die Elektrophorese über ein 10-17,5 % iges SDS-Gradientengel eingesetzt. Die Visualisierung der Signale erfolgte über Coomassie-Colloidal-Färbung und anschließende Quantifizierung der Banden.

Wenn eine unterschiedliche Löslichkeit der TatA-Homologen der alleinige Grund für die Aktivitätsunterschiede wäre, müsste basierend auf den in Abb. 33 erhaltenen Aktivitätswerten die Löslichkeit für *Arabidopsis*-TatA am höchsten sein. Da dies aber in den beiden Versuchsdurchläufen nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, kann dieser Zusammenhang ausgeschlossen werden.

Bei der Bewertung der Ergebnisse in Abb. 35 muss beachtet werden, dass aktuellere Untersuchungen der Löslichkeit von *Arabidopsis*-TatA innerhalb der Arbeitsgruppe abweichende Ergebnisse hervorbrachten (persönliche Mitteilung: Julia Dittmar). So waren für eine TatA-Lösung, die nach der Expression und Aufreinigung sofort zur Dialyse verwendet wurde, keine wesentlichen Verluste durch Präzipitation zu beobachten. So könnten Unterschiede in der Löslichkeit der TatA-Proteine eventuell auch von der Lagerungszeit der TatA-Präparationen im Acetonitril-Wasser-Gemisch beeinflusst werden. Diese Möglichkeit wird im Abschnitt Diskussion, Kapitel 5.1 erörtert.

2.3.2 Chimäre TatA-Konstrukte als Mittel zur Identifizierung wichtiger funktioneller Bereiche im TatA-Protein

Da die Löslichkeit nach den vorliegenden Ergebnissen nicht den kritischen Faktor für die Aktivität der TatA-Homologe darstellt, liegt nahe, dass das unterschiedliche Verhalten der einzelnen Versionen im Protein selbst begründet ist. Daher erscheint es sinnvoll, die Sequenzen der TatA-Proteine noch einmal genauer miteinander zu vergleichen (siehe Abb. 36). Dabei sind die Sequenzunterschiede wichtig, die *Arabidopsis*-TatA von den anderen beiden TatA-Proteinen abgrenzen.

	Transmembranhelix	Hinge-Bereich	amphipathische Helix	unstrukturierter C-Terminus				
Spinat-TatA	MSLFGLGVP	ELAVIAGVAALVFGPKQL	PEIGRNF	GKTIKSFQQA	AKFEFEQELTKPE	SESSDKVIEAKSASESSE	EKENVASSSK	ESS 88
Erbsen-TatA	MAFFGLGVP	ELVVIAGVAALVFGPKKL	PEVGRSIGQTVKSFQQA	AKFEFETEL	-KKEPNPT-----	EEISVASEQE	KQEI	KVSSTKDNV 82
<i>Arabidopsis</i> -TatA	MALFGLGVP	ELAVIAGVAALVFGPKKL	PEIGK	SIGKTVKSFQQA	AKFESEL-KTE	PEESVAESSQVATSNKEE	EKKTEVSS	SSKENV 87
	*:*****	:*****:	***:***:	*:***:	*:*****	** * *	: : : . . . * : :	** : * :

Abbildung 36: Aminosäuresequenzvergleich für die TatA-Proteine aus Spinat, Erbse und *Arabidopsis*. Das Alignment wurde mithilfe des *multiple sequence alignment*-Tools *Clustal Omega* erstellt. Die Einteilung der Proteinsequenz in einzelne strukturelle Einheiten des TatA-Proteins erfolgte durch gestrichelte Linien und orientiert sich an der für *E. coli* TatA vorhandenen NMR-Struktur (Rodriguez *et al.*, 2013). Die Bereiche in der Sequenz, die *Arabidopsis*-TatA durch Sequenzunterschiede von den anderen beiden TatA-Homologen unterscheiden, sind rot markiert.

Ein Blick auf die Aminosäuresequenzen zeigt, dass die für die TatA-Funktion essentiellen Bereiche, also der Transmembranbereich (Lee *et al.*, 2002) und auch die Hinge-Region (Hicks *et al.*, 2003) in hohem Maße konserviert vorliegen. Hier weist die Sequenz von *Arabidopsis*-TatA lediglich in einer Position (L21, rot markiert) einen Unterschied zu Spinat- und Erbsen-TatA auf (V21). Da es sich jedoch bei Valin und Leucin um Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften handelt, ist es unwahrscheinlich, dass dieser Unterschied die Aktivität des Proteins verändert. Einige weitere Unterschiede finden sich im Bereich der amphipatischen Helix, z. B. an den Positionen K32, S50 und T54. Allerdings stehen auch hier wiederum Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften an einer Position oder unterscheiden sich in allen drei Proteinen. Die größten Sequenzunterschiede finden sich im C-terminalen Bereich. Diese Region wurde von Lee *et al.* (2002) in *E. coli* durch Versuche mithilfe von Verkürzungsmutanten als nicht essentiell für die Funktion der Tat-Translokase ermittelt. Auch innerhalb der Arbeitsgruppe zeigen Versuche mit C-terminal verkürzten TatA-Varianten aus Erbse bis zu einem gewissen Verkürzungsgrad keinen negativen Effekt auf die allgemeine TatA-Funktion. Dennoch lassen die bisher gezeigten Ergebnisse die Frage zu, ob im pflanzlichen System Sequenzunterschiede in diesem Bereich einen Effekt auf die katalytische Aktivität der TatA-Proteine bewirken können.

Für die Untersuchung dieser Effekte eignen sich chimäre TatA-Konstrukte, die sich jeweils aus einem Anteil von Spinat-TatA und *Arabidopsis*-TatA zusammensetzen. Durch unterschiedlich aufgebaute Chimären könnte dann ermittelt werden, ob tatsächlich und alleine der C-Terminus für die unterschiedlichen Aktivitäten der TatA-Homologe verantwortlich ist. Bei den ersten beiden chimären Konstrukten (siehe Abb. 37) stammt entweder nur ein Teil des unstrukturierten C-Terminus (*Ara S74 Sp TatA*) oder der gesamte C-terminale Bereich inklusive der amphipatischen Helix (*Ara L27 Sp TatA*) der Aminosäure-Sequenz von Spinat-TatA. Wenn die Aktivitätsunterschiede der TatA-Proteine in besonderen Motiven innerhalb der C-

terminalen Region begründet sind, wäre bei zumindest einer dieser Chimären eine Aktivität ähnlich zum Spinat-TatA zu erwarten. Ein zusätzliches Konstrukt (*Sp* P57 *Ara* TatA) setzt sich dagegen aus den N-terminalen Bereichen von Spinat-TatA und dem C-Terminus von *Arabidopsis*-TatA zusammen. Nach der oben genannten Vermutung sollte sich diese Chimäre im Rekonstitutionsansatz wie *Arabidopsis*-TatA verhalten. Dies würde den Beweis liefern, dass der C-Terminus eine wichtige funktionale Rolle spielt.

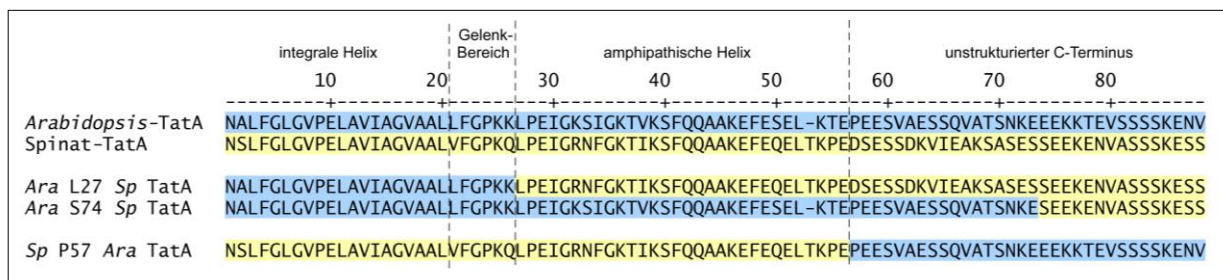


Abbildung 37: Schematische Darstellung der erstellten chimären TatA-Konstrukte. Die Aminosäuresequenzen von *Arabidopsis*-TatA (in blau dargestellt) und Spinat-TatA (in gelb dargestellt) sind im oberen Teil der Abbildung gezeigt. Die chimären Konstrukte enthalten unterschiedliche Anteile dieser beiden Proteine, die jeweiligen Bereiche sind entsprechend farblich gekennzeichnet. Die Chimären sind jeweils so benannt, dass der zuerst stehende Namensteil die Herkunft des N-terminalen Bereiches bezeichnet und der zweite den C-terminalen Bereich. In der Mitte des Namens ist die Aminosäure genannt, die den Übergang zwischen beiden Teilen bildet.

Die Chimären wurden wiederum über heterologe Überexpression gewonnen und (wie im Abschnitt Material und Methoden, Kapitel 2.4 beschrieben) einer Aufreinigung in mehreren Schritten unterzogen, bevor sie für Aktivitätsuntersuchungen eingesetzt wurden. In Abb. 38 (a), (b) und (c) sind für jedes einzelne Konstrukt die Messwerte mit den zugehörigen nichtlinearen Regressionen der Daten und zum Vergleich die Graphen für *Arabidopsis*- und Spinat-TatA aus Abb. 31 gezeigt. Dies diente als interne Kontrolle für die beiden authentischen TatA-Proteine und sollte verdeutlichen, ob sich für die untersuchte Chimäre ein ähnlicher Kurvenverlauf wie für *Arabidopsis*- oder Spinat-TatA zeigt.

Anhand Abb. 38 ist zunächst deutlich zu erkennen, dass die chimären TatA-Varianten in der Lage waren, den Transport des 16/16 Proteins zu rekonstituieren. Auffällig ist hierbei, dass für alle drei Diagramme der erhaltene Graph sehr der Kurve für Spinat-TatA ähnelt. Dies zeigt sich besonders bei der Betrachtung von sehr geringen TatA-Konzentrationen (0-1 μ M). Die aus der Regression erhaltenen Werte für K_m liegen für alle drei Chimären über 0,2 μ M und somit deutlich über dem Wert für *Arabidopsis*-TatA, was wiederum für eine ähnliche Affinität der TatA-Chimären zum TatBC-Rezeptorkomplex wie für das TatA-Protein aus Spinat spricht.

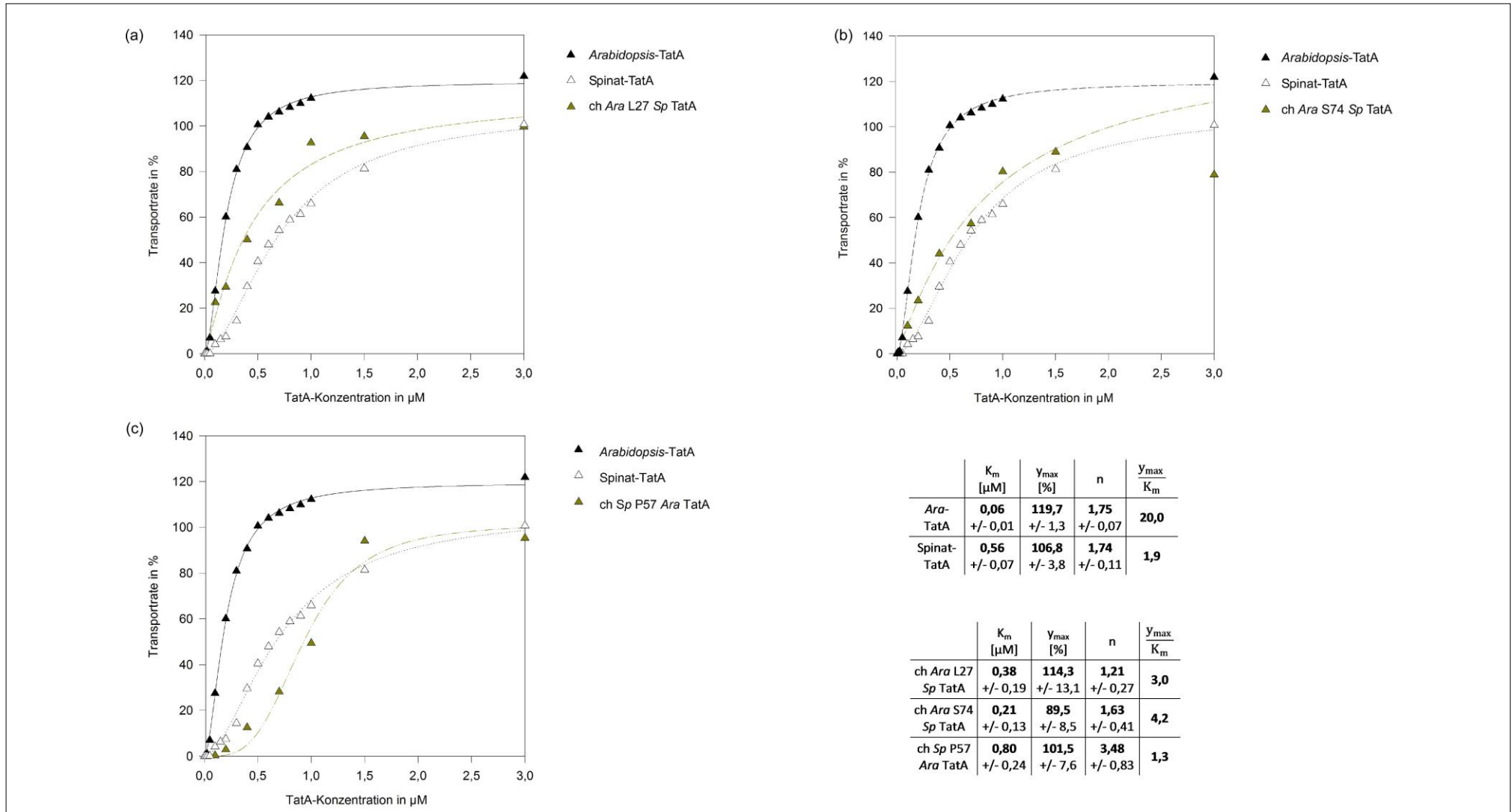


Abbildung 38: Transport-Rekonstitutionsversuche und Ermittlung der Aktivität chimärer TatA-Konstrukte. Für die Rekonstitution des Transports wurden folgende chimäre TatA-Proteine eingesetzt: a) ch Ara L27 Sp TatA, b) ch Ara S74 Sp TatA und c) ch Sp P57 Ara TatA. Für die Transportbedingungen, siehe Abb. 28. Die Quantifizierungswerte für transportiertes Protein sind in Abhängigkeit von der Konzentration des jeweils eingesetzten TatA-Proteins graphisch dargestellt. Dabei sind für *Arabidopsis*- und Spinat-TatA zum Vergleich die Daten und die nichtlinearen Regressionen aus Abb.31 dargestellt. Diese und auch jene für die Messwerte des chimären TatA-Konstruktes (in grün dargestellt) basieren auf der Hill-Gleichung ($y = y_{\text{max}} \times [\text{TatA}]^n / ([\text{TatA}]^n + K_m)$), die entsprechenden Parameter K_m (in μM), y_{max} (in %) und n sowie der Quotient für die katalytische Aktivität y_{max} / K_m sind jeweils angegeben.

Unter der Annahme, dass die Aminosäurezusammensetzung im C-Terminus den Unterschied in der Aktivität zwischen *Arabidopsis*-TatA und Spinat-TatA bedingt, war für die Chimären *Ara* S74 *Sp* TatA und *Ara* L27 *Sp* TatA dieses Ergebnis zu erwarten. Da der N-terminale Bereich weitgehend konserviert ist und auch innerhalb der amphipathischen Helix nur wenige Sequenzunterschiede vorliegen, stellen diese Varianten zu großen Teilen Spinat-TatA dar. Für die dritte Chimäre (siehe Abb. 38 (c)) ist der Kurvenverlauf allerdings nicht erwartungsgemäß, denn diese trägt den C-Terminus von *Arabidopsis*-TatA. Sollte dieser ein bestimmtes Motiv enthalten, das für die erhöhte Aktivität gegenüber dem Pendant aus Spinat verantwortlich ist, so würde für dieses Konstrukt ein Verhalten ähnlich *Arabidopsis*-TatA erwartet werden. Der Kurvenverlauf bestätigt diese Annahme allerdings nicht. Aufgrund der Ergebnisse kann geschlussfolgert werden, dass der C-terminale Bereich nicht alleine den Unterschied in der Aktivität der unterschiedlichen TatA-Homologe bewirken kann.

2.4 Zusammenfassung der TatA-Aktivitäten und Bewertung der berechneten Parameter

Die aus den Rekonstitutionsversuchen erhaltenen Kurven zeigen für jedes TatA-Protein einen charakteristischen Verlauf, was bereits auf unterschiedliche Aktivitäten hinweist. Die nichtlinearen Regressionen der Daten liefern mit den Parametern K_m , y_{max} und n sowie dem Quotienten $\frac{y_{max}}{K_m}$ wichtige Größen zur Beschreibung der TatA-Aktivität. Zur besseren Übersicht sind die ermittelten Parameter für jeden Versuch in Tab.1 zusammengefasst.

Beachtet man zunächst erst einmal nur die Versuche in Abb. 28-33, so fällt auf, dass unabhängig vom verwendeten TatA der Wert für y_{max} als maximale rekonstituierte Transportrate stets in einem Bereich von 100-150 % liegt. Die allgemeine Funktionalität der TatA-Proteine ist also als sehr ähnlich einzuschätzen. Dagegen fallen starke Unterschiede in der Affinität der TatA-Proteine zum TatBC-Rezeptorkomplex auf. Für die Versuche mit Spinat-TatA (gelb unterlegt) wurden durchgängig Werte für K_m zwischen 0,5 μ M und 0,6 μ M ermittelt. Im Gegensatz dazu bewegt sich K_m für *Arabidopsis*-TatA (blau unterlegt) im Bereich von 0,04 μ M bis 0,14 μ M. Dieser Unterschied passt sehr gut zu den ermittelten Kurvenverläufen und sagt aus, dass die Affinität von *Arabidopsis*-TatA zum TatBC-Rezeptorkomplex etwa fünfmal so hoch ist wie für Spinat-TatA. Auch der Quotient $\frac{y_{max}}{K_m}$

als Maß für die katalytische Aktivität zeigt starke Unterschiede im Vergleich zwischen *Arabidopsis*-TatA (≥ 9) und Spinat-TatA (≤ 2).

Experiment	K_m [μM]	y_{max} [%]	n	$\frac{y_{\text{max}}}{K_m}$	
Abb. 28 Spinat-TatA in Spinat	0,55 +/- 0,15	110,9 +/- 8,7	2,10 +/- 0,33	2,0	
Abb. 30 <i>Arabidopsis</i> -TatA in Spinat	0,14 +/- 0,04	125,0 +/- 5,3	0,84 +/- 0,09	8,9	
Abb. 31	Spinat-TatA in Erbse	0,56 +/- 0,07	106,8 +/- 3,8	1,74 +/- 0,11	1,9
	<i>Arabidopsis</i> -TatA in Erbse	0,06 +/- 0,01	119,7 +/- 1,3	1,75 +/- 0,07	20,0
Abb. 32	Spinat-TatA in Erbse (23/23)	0,51 +/- 0,22	100,1 +/- 11,9	1,41 +/- 0,30	2,0
	<i>Arabidopsis</i> -TatA in Erbse (23/23)	0,04 +/- 0,01	144,4 +/- 2,9	1,88 +/- 0,14	36,1
Abb. 33 Erbsen-TatA in Erbse	1,94 +/- 0,26	165,5 +/- 12,9	1,31 +/- 0,08	0,9	
Abb. 34	Spinat-TatA (RTS)	1,42 +/- 0,48	116,7 +/- 21,5	0,69 +/- 0,09	0,8
	<i>Arabidopsis</i> -TatA (RTS)	0,03 +/- 0,04	167,1 +/- 7,8	1,32 +/- 0,18	55,7
	Erbsen-TatA (RTS)	1,02 +/- 0,41	244,5 +/- 43,3	1,02 +/- 0,19	2,4
Abb. 38	ch <i>Ara</i> L27 <i>Sp</i> TatA	0,38 +/- 0,19	114,3 +/- 13,1	1,21 +/- 0,27	3,0
	ch <i>Ara</i> S74 <i>Sp</i> TatA	0,21 +/- 0,13	89,50 +/- 8,5	1,63 +/- 0,41	4,2
	ch <i>Sp</i> P57 <i>Ara</i> TatA	0,80 +/- 0,24	101,5 +/- 7,6	3,48 +/- 0,83	1,3

Tabelle 1: Übersicht der durch nichtlineare Regression ermittelten Aktivitätsparameter für die einzelnen TatA-abhängigen Transportexperimente. K_m wird als Michaelis-Konstante bezeichnet und steht in diesem Fall für die Affinität von TatA zum TatBC-Rezeptorkomplex. y_{max} bezeichnet die maximale mittels TatA erreichbare Transportrate. Der Hill-Koeffizient n gibt Informationen über die Kooperativität des Coenzym. Der Quotient $\frac{y_{\text{max}}}{K_m}$ steht für die katalytische Aktivität der TatA-Proteine und dient als Vergleichswert. Die in grau unterlegten Daten weisen hohe Fehler auf und sind aufgrund der geringen Anzahl an Messpunkten nur unter Vorbehalt auszuwerten.

Die dazugehörigen Fehlerwerte bewegen sich in einem tolerierbaren Bereich. Einzig für das in Abb. 32 gezeigte Experiment sind sie auffällig hoch, da die Anzahl der Messwerte pro Kurve

hier im Vergleich zu den anderen Experimenten relativ gering war. Daher sollten die hierfür ermittelten Parameter vorsichtig bewertet werden.

Einen Sonderfall stellen die aufgenommene Kurve und die dafür ermittelten Daten für Erbsen-TatA dar. K_m wurde hier mit 1,94 bestimmt, was durch den Kurvenverlauf begründet ist. Da für dieses TatA-Protein die Messpunkte nicht einem sigmoidalen Kurvenverlauf entsprechen, ist die Berechnung der Parameter für die Hill-Gleichung fehlerbehaftet. Hier wäre eine Wiederholung des Experimentes für einen verlässlichen K_m -Wert unabdingbar. Auch y_{max} (165,5%) kann bedingt durch den Kurvenverlauf fehlerbehaftet sein. Dennoch weist der Quotient für die katalytische Aktivität mit 0,9 auf ein ähnliches Verhalten wie für Spinat-TatA hin. Um dieses Ergebnis zu verifizieren, sind mehrere Wiederholungen des Experimentes für Erbsen-TatA notwendig.

Für die rot markierten ermittelten Werte aus den Abb. 34 und 38 ist wichtig zu erwähnen, dass diese aufgrund der geringen Anzahl an Messwerten für eine Kurve stark fehlerbehaftet sein können. Dies ist bereits deutlich anhand der Höhe der Fehlerwerte zu erkennen und erschwert daher eine Auswertung dieser Daten. Besonders stark ist dies anhand der stark schwankenden K_m -Werte zu erkennen. Jedoch kann durch den Quotienten für die katalytische Aktivität wiederum der Unterschied von Spinat- und Erbsen-TatA zu *Arabidopsis*-TatA bestätigt werden. Für die chimären TatA-Proteine bewegt sich dieser Quotient im Bereich für Spinat- und Erbsen-TatA.

Der Hill-Koeffizient enthält weniger Informationen über die Aktivität als über die Kooperativität der TatA-Proteine. Durch Hauer *et al.* (2013) wurde bereits für *Arabidopsis*-TatA die positive Kooperativität bewiesen. Eine Bestätigung des beschriebenen Hill-Koeffizienten von 3,1 war in den entsprechenden Versuchen nicht möglich. Hier könnte die Wahl der Messpunkte von großer Bedeutung für die ermittelten n-Werte sein, da in Hauer *et al.* (2013) mit sehr geringen TatA-Konzentrationen gearbeitet wurde und somit eine genaue Bestimmung des Hill-Koeffizienten als Maß für die Kooperativität möglich war. Da dies in der vorliegenden Arbeit nicht das primäre Ziel war, wurde auf diese genaue Analyse des unteren TatA-Konzentrationsbereiches verzichtet, um den kompletten Kurvenverlauf bis zu einer Konzentration von 3 μ M verlässlich abzubilden. Dennoch liegen die ermittelten Hill-Koeffizienten im Allgemeinen über einem Wert von 1, was die Aussage über die positive Kooperativität der TatA-Proteine stützt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mithilfe der Aktivitätsanalysen für die TatA-Proteine deutliche Unterschiede zwischen den drei verwendeten Homologen ermittelt wurden. Dabei zeigen Spinat-TatA und Erbsen-TatA ähnliche Aktivitätswerte, *Arabidopsis*-TatA hebt sich von diesen beiden Homologen mit einer wesentlich höheren Aktivität ab. Im Zuge dieser Arbeit wurde versucht, den Grund dieses Aktivitätsunterschiedes zu ermitteln. Die hier gezeigten Ergebnisse liefern Hinweise darauf, dass kein Einfluss der Löslichkeit der TatA-Proteine auf deren Aktivität als Coenzym besteht. Ebenso konnte durch die Verwendung der chimären TatA-Konstrukte gezeigt werden, dass die im Vergleich höhere Aktivität des *Arabidopsis*-TatA-Proteins nicht ausschließlich durch den C-terminalen Bereich bedingt wird. Welche weiteren Faktoren eine Rolle spielen könnten und was der Begriff Aktivität für die TatA-Proteine im Detail bedeutet, wird im Abschnitt Diskussion, Kapitel 5 näher erörtert.

DISKUSSION

1 Eigenschaften des Tat-abhängigen Transports in Spinatthylakoiden

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu Beginn, den Tat-abhängigen Proteintransport in Spinat zu etablieren und damit für den Transportprozess allgemeingültige Aussagen zu bestätigen oder auch Organismus-spezifische Eigenschaften aufzudecken. Ganz allgemein gesehen zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Tat-abhängige Transportexperimente mit Spinatthylakoiden prinzipiell funktionieren (vgl. Abb. 10). Bei genauerer Betrachtung der Transporteigenschaften zeigten sich jedoch einige Unterschiede zu den Versuchen mit Erbsenthylakoiden. Zunächst konnten mithilfe des 16/23-Proteins Unterschiede in der Geschwindigkeit des Transports ermittelt werden (siehe Abb. 12). Das zeitabhängige Verhalten des Translokationsintermediates Ti-1 weist in Spinat auf eine geringere Transportgeschwindigkeit im Vergleich zum Erbsensystem hin. Auch die Beobachtung, dass die Signalintensität der in Abb. 13 beschriebenen putativen substratgebundenen TatBC-Rezeptorkomplexe in Spinat im zeitlichen Verlauf stabil bleibt (und nicht, wie für Erbsenthylakoide beobachtet, abnimmt), lässt darauf schließen, dass die Translokation und damit auch die anschließende Dissoziation des Vorläuferproteins von den TatBC-Komplexen nach erfolgtem Transport mehr Zeit in Anspruch nimmt als für Erbsenthylakoide. Im Zuge der detaillierten Untersuchungen von TatA aus Spinat wurde festgestellt, dass dieses Protein im Rekonstitutionsversuch im Vergleich zu *Arabidopsis*-TatA mit ähnlicher Geschwindigkeit arbeitet (Daten nicht gezeigt). So könnten eventuelle Geschwindigkeitsunterschiede mit der Funktion des TatBC-Rezeptorkomplexes in Verbindung gebracht werden. Zum Beispiel könnte eine unterschiedlich hohe Affinität des Substrates zu den TatBC-Rezeptorkomplexen aus Spinat und Erbse die Transportgeschwindigkeit beeinflussen.

Im Zuge der Nativ-Analysen von Thylakoidmembranen aus Spinat wurden vier substratmarkierte Komplexe identifiziert, die folglich mit der Translokation in Verbindung stehen mussten (siehe Abb. 13 und 14). Für diese Komplexe wurde mithilfe von 2D-Analysen eindeutig das Vorhandensein von TatB, TatC und Vorläuferprotein nachgewiesen (siehe Abb. 20). Dies spricht für substratgebundene TatBC-Rezeptorkomplexe. Wie auch für Erbsenthylakoide beschrieben (Cline und Mori 2001; Jakob *et al.*, 2009), konnte TatA in diesen Komplexen nicht nachgewiesen werden. Allerdings ist der Transport des Substrates und auch

die Dissoziation vom TatBC-Rezeptorkomplex strikt abhängig vom Vorhandensein von TatA (Cline und Mori, 2001). Dies gilt unabhängig vom Faltungszustand des reifen Teils und ist sogar unter Verwendung des Transitpeptides in Abwesenheit eines Passagiers zu beobachten (Schlesier, 2015). TatA muss also in irgendeiner Art und Weise mit dem TatBC-Substrat-Komplex interagieren, um den Transport zu vermitteln. Im bakteriellen System gibt es durchaus Hinweise auf TatA enthaltende Translokase-Komplexe (Bolhuis *et al.*, 2001; Oates *et al.*, 2005). Der erfolglose Nachweis von TatA in den Tat-Translokase-Komplexen könnte dadurch bedingt werden, dass die Interaktion des chloroplastidären TatA-Proteins mit dem Rezeptorkomplex mit hoher Geschwindigkeit abläuft und mit den bisher verwendeten nativen Methoden nicht beobachtet werden kann. Andererseits ist es aber auch vorstellbar, dass TatA eine relativ schwache Bindung zum Komplex aufweist und durch die Solubilisierung mittels Digitonin bereits vom Komplex abgelöst wird. Native Analysen substratgebundener Komplexe mit unterschiedlichen Konzentrationen an Digitonin lieferten darauf allerdings keinen Hinweis (Daten nicht gezeigt).

Im Vergleich zwischen den beiden Systemen fallen Unterschiede in der Größe der TatBC-Rezeptorkomplexe auf (siehe Abb. 13). Dies ist vermutlich mit leicht voneinander abweichenden Molekulargewichten der einzelnen Tat-Komponenten zwischen Erbse und Spinat zu erklären. Eine unterschiedliche Anzahl von TatB- oder TatC-Molekülen im Komplex in Erbsen- und Spinatthylakoiden wäre außerdem möglich, erscheint aber unwahrscheinlich, da für das pflanzliche Tat-System im Allgemeinen von einer äquimolaren Stöchiometrie von TatB zu TatC ausgegangen wird (Cline und Mori, 2001; Jakob *et al.*, 2009). Außerdem könnten sich Tat-Translokasekomplexe aus Erbse und Spinat während der Solubilisierung unterschiedlich stabil verhalten, wodurch eventuell Komplexbruchstücke verschiedener Größe entstehen könnten.

Weiterhin ist zu erkennen, dass die beiden unteren Komplexe zwischen 440 kDa und 250 kDa im Vergleich zum Erbsensystem deutlicher in Erscheinung treten. Dort ist vor allem der unterste Komplex äußerst schwach zu erkennen. Jakob *et al.* (2009) beschrieben diese beiden Komplexe als vermutlich nicht substratbindend, da die Signale nach Zugabe von Vorläuferprotein zum Ansatz keinen Größenshift zeigten. In Verbindung mit der geringeren Transportgeschwindigkeit im Spinatsystem ist es allerdings auch vorstellbar, dass es sich bei den beiden unteren Signalen um temporär substratbindende Komplexe handeln könnte.

Warum für beide Systeme allerdings vier Komplexe in der Nativ-Analyse auftreten, wogegen in Cline und Mori (2001) lediglich ein Komplex bei ca. 700 kDa beschrieben wurde, ist noch nicht abschließend geklärt. In der genannten Publikation sind nach Detektion von TatB jedoch unter bestimmten Voraussetzungen ebenfalls vier Komplexe zu sehen. Es wird vermutet, dass es sich dabei um Bruchstücke des Gesamtkomplexes handelt, die im Zuge der Solubilisierung mittels Digitonin entstehen. Weiterhin gibt es Hinweise auf einen Teilverlust von TatB während der Solubilisierung der Thylakoide, wobei die resultierenden Komplexe in der BN-PAGE ein verändertes Laufverhalten zeigen könnten (persönliche Mitteilung: Matthias Reimers).

2 Eigenschaften von Spinat-TatA als kritischer Faktor im Thylakoidtransport

Im Zuge der Charakterisierung des Tat-abhängigen Transports in Spinat zeigte sich die Variabilität der Transportraten an unterschiedlichen Versuchstagen unter identischen Transportbedingungen als Besonderheit (siehe Abb. 10). Dieses Phänomen wird durch eine leichtere Extraktion von Spinat-TatA (im Vergleich zu Erbsen-TatA) aus der Thylakoidmembran durch Waschschrte während der Thylakoidpräparation verursacht. Das Herauslösen von TatA und damit die geringere Menge innerhalb der Thylakoidmembran haben immense Auswirkungen auf die Transportfähigkeit der Spinatthylakoide (siehe Abb. 22(b)). Für Erbsenthylakoide dagegen ist die Abnahme der Transportfähigkeit nach vier Waschschrten nicht so stark ausgeprägt (Abb. 22(a)). Die Verminderung der Transportrate um ca. 30 % ist mit dem Verlust an Thylakoidmaterial während der Waschschrte zu korrelieren. Dies lässt vermuten, dass TatA aus Erbsenthylakoiden durch Waschen nicht so leicht aus der Membran herausgelöst werden kann wie Spinat-TatA. Ob dies nun in den Eigenschaften des TatA-Proteins selbst begründet ist oder ein Organismus-spezifisches Problem darstellt, sollte der darauffolgende Versuch (siehe Abb. 23) klären. Durch den wechselseitigen Einsatz von Spinat- und Erbsen-TatA in Thylakoide aus Spinat- und Erbsenblattmaterial zeigte sich, dass beide TatA-Proteine durch die Waschvorgänge einem Extraktionseffekt unterliegen. Unabhängig von der Herkunft der verwendeten Thylakoide tritt dieser Effekt allerdings für Spinat-TatA bedeutend stärker in Erscheinung. Die Bindung der TatA-Proteine an die Thylakoidmembran scheint also unterschiedlich stark zu sein. Dies könnte eventuell durch kleine Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung verursacht werden. Insbesondere die Hydrophobizität der

Reste innerhalb der Transmembranhelix spielt dabei eine wichtige Rolle. In Abb. 39 ist ein Hydropathie-Plot für die beiden TatA-Proteine aus Erbse und Spinat im Vergleich dargestellt.

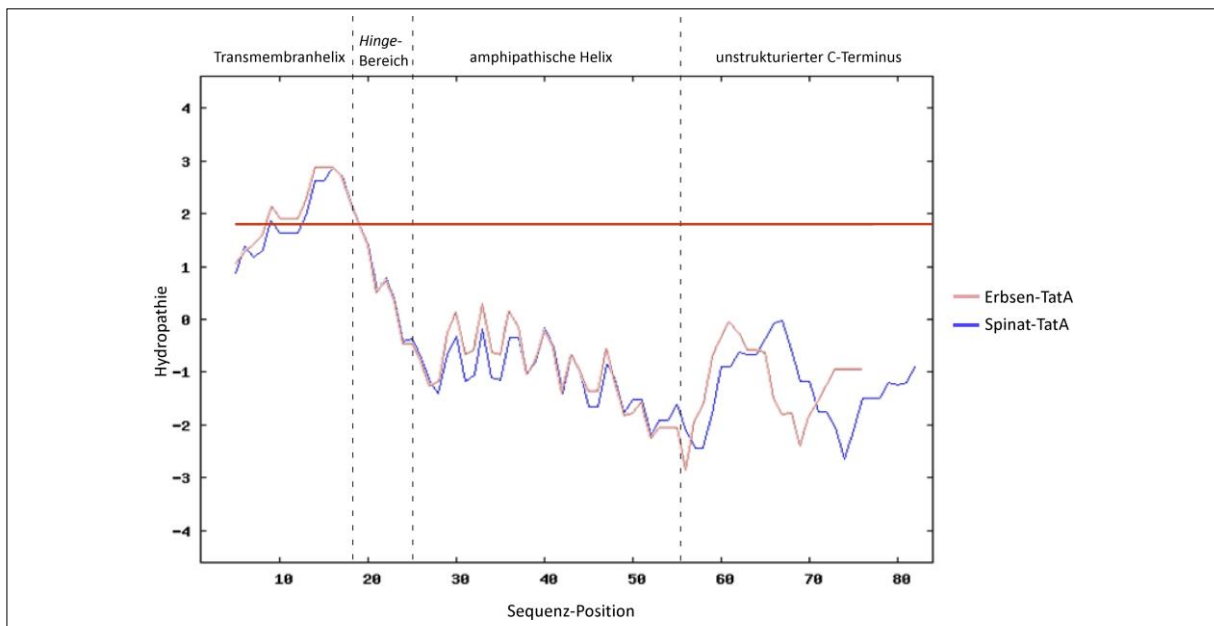


Abbildung 39: Hydropathie-Plot für die TatA-Proteine aus Spinat und Erbse. Nach der Methode von Kyte und Doolittle (1982) wird mittels der Aminosäuresequenz die durchschnittliche Hydrophilie (negative Werte) bzw. Hydrophobie (positive Werte) im entsprechenden Bereich des Proteins bewertet und dargestellt (Fensterbreite: 9).

Vergleicht man die Hydrophobizität der beiden TatA-Proteine im Bereich der Transmembranhelix, so ist hier kein größerer Unterschied zu erkennen. Auch die Länge der beiden Helices ist identisch. Einzig im Bereich der anschließenden amphipathischen Helix ist für Erbsen-TatA eine etwas stärkere Hydrophobizität im Vergleich zu Spinat-TatA zu erkennen. Dies allein würde aber keine stärkere Bindung von Erbsen-TatA innerhalb der Membran bewirken, da die amphipathische Helix sich nur peripher an die Membran anlagert und damit nicht im eigentlichen Sinne an der Insertion des Proteins in die Membran beteiligt ist. So ist auf den ersten Blick nicht zu erkennen, warum die Stabilität der Bindung innerhalb der Membran zwischen beiden Proteinen unterschiedlich hoch ist.

Die beobachtete stärkere Extraktion von Spinat-TatA aus der Thylakoidmembran hat direkte Auswirkungen auf die Transportfähigkeit der Thylakoide (siehe Abb. 24 (d)). So sind die Transportraten, die durch den in der Membran verbliebenen Anteil an TatA rekonstituiert werden können, für Spinat-TatA stets etwas geringer als für Erbsen-TatA. Die Thylakoide besitzen aber im Allgemeinen jeweils noch 40-50 % ihrer ursprünglichen Transportaktivität (vgl. nicht gewaschene Thylakoide). Der Abfall der Transportfähigkeit von Spinatthylakoiden

durch mehrere Waschschr tte zeigt sich damit nicht so drastisch wie im vorhergehenden Versuch ohne Transportrekonstitution (Abb. 22). So kann für das letztgenannte Experiment die drastische Verminderung der Transportfähigkeit (von bis zu 90 %) durch die Waschschr tte nicht nur alleine durch eine schwächere Membranbindung des TatA-Proteins begründet werden. Der entscheidende Unterschied zwischen beiden Versuchen liegt in der zur Verfügung stehenden Menge an TatA in den Thylakoiden. So wird im in Abb. 24 gezeigten Experiment *in vitro*-translatiertes TatA-Protein zugegeben. Auch wenn die Konzentration des synthetisierten TatA-Proteins im *RTS*-Translationsansatz nicht exakt bestimmt werden kann, so ist davon auszugehen, dass die zugegebene Menge einen TatA- berschuss für den Transport darstellt. Dagegen wird im Experiment ohne vorherige Modifikation (siehe Abb. 22) die Transportaktivität nur durch intrinsisches, in der Membran vorliegendes TatA bedingt. Die absoluten Mengen an TatA in Spinat- und Erbsenchloroplasten (und damit auch in Thylakoiden) scheinen sich jedoch stark zu unterscheiden. So konnte mittels Immunoblot- und 2D-Analysen ermittelt werden, dass Erbsen-TatA im Vergleich zu Spinat-TatA in mindestens fünffacher Menge in den Chloroplasten verfügbar ist (persönliche Mitteilung: Mario Jakob). Ein ähnlicher Unterschied konnte auch für die thylakoidgebundene TatA-Menge beobachtet werden. Wenn man nun für das Experiment in Abb. 22 beachtet, dass die Ausgangsmengen an TatA in den Thylakoiden zwischen beiden Modellen unterschiedlich hoch sind, kann die Wirkung der Waschschr tte auf die Transportfähigkeit verschieden stark ausfallen. Für das Erbsensystem kann kein bedeutsamer Effekt des Herauslösens von TatA auf die Transportrate für das 16/16 Protein beobachtet werden. Dies kann bedeuten, dass in Erbsenthylakoiden auch nach vier Waschvorgängen noch eine ausreichende Menge an TatA für einen erfolgreichen Transport zur Verfügung steht. In Spinatthylakoiden dagegen ist die Ausgangsmenge an TatA deutlich geringer, hier führt der Verlust an TatA aus der Thylakoidmembran durch die Waschschr tte zu einer drastischen Abnahme der Transportfähigkeit, das heißt der Transport ist durch die verbliebene Menge an TatA in den Thylakoiden limitiert. Warum diese Mengenunterschiede zwischen den einzelnen Modellorganismen auftreten, ist bisher noch nicht abschließend geklärt. Allerdings zeigen analoge Untersuchungen des *in thylakoido*-Transports in Tabak einen ähnlichen Effekt mehrerer Waschschr tte auf die Transportraten, welcher vermutlich ebenfalls durch eine nahezu vollständige Extraktion von TatA aus den Thylakoiden verursacht wird (Bachelorarbeit Nele Stroscher, 2014). Entsprechende Untersuchungen zur absoluten TatA-

Menge in Tabakthylakoiden stehen noch aus, könnten aber Aufschluss geben, ob die erhöhte Menge an TatA in Erbsenthylakoiden einen Ausnahmefall darstellt.

Für den erfolgreichen Transport unter natürlichen Bedingungen (*in vivo*) ist allerdings nicht nur die TatA-Menge innerhalb der Thylakoide ausschlaggebend. Frielingsdorf *et al.* (2008) konnten das Vorhandensein von stromalem TatA nachweisen, welches offensichtlich auch eine funktionelle Rolle im Tat-Transport spielt. Nach einem möglichen Kreislauf von löslichem und membrangebundenem TatA könnte der stromale Anteil als Reserve fungieren und für den Transport von Substraten in die Membran integriert werden. Für den in Abb. 22 beschriebenen Versuch wurde jedoch während der Präparation der stromale Extrakt abgetrennt und somit der lösliche Anteil an TatA nicht berücksichtigt. Die absolute Gesamtmenge an verfügbarem TatA, bestehend aus membrangebundenem und löslichem TatA-Anteil sollte also unter natürlichen Bedingungen stets für einen erfolgreichen Tat-abhängigen Transport genügen.

3 Vorkommen von TatA und TatB im Stroma von Spinatchloroplasten

Ausgehend vom Nachweis von stromalen TatA in Erbsenchloroplasten (Frielingsdorf *et al.*, 2008) sollte die Stromafraktion aus Spinat näher analysiert werden. Die SDS-Analyse konnte das Vorhandensein von löslichem Spinat-TatA zeigen (siehe Abb. 19). Jedoch konnte TatA mittels Nativ-Analyse des stromalen Extraktes aus Spinat und Auftrennung in zweiter Dimension nicht detektiert werden (siehe Abb. 21 (b)), wogegen sich für Erbsenstroma mit der gleichen Untersuchung diskret *spots* für TatA im Bereich von 300-880 kDa zeigten (Dissertation Stefan Frielingsdorf, 2008). Der erfolglose Nachweis dieser Komplexe von Spinat-TatA kann mehrere Gründe haben. Einerseits könnte die Detektionsleistung des Antikörpers nicht optimal gewesen sein. Dieses Problem könnte in einer Wiederholung des Experimentes mit einer höheren Konzentration des Antikörpers behoben werden. Weiterhin ist schon in der denaturierenden Analyse (Abb. 19) zu erkennen, dass das TatA-Signal im Stroma relativ schwach ist. Ausgehend von einem dynamischen Gleichgewicht von löslichem und membrangebundenem TatA ist es vorstellbar, dass die TatA-Menge im Stroma ständigen Schwankungen unterliegt. Im ungünstigsten Fall kann so aufgrund einer relativ geringen Menge an löslichem TatA in der verwendeten Stromafraktion die Detektionsgrenze des Immunoblots unterschritten werden. Um dies auszuschließen, empfiehlt sich eine mehrfache Wiederholung dieses Experimentes mit verschiedenen

Präparationen von stromalem Extrakt. Weiterhin gibt es auch Hinweise auf deutlich geringere TatA-Mengen in Spinatchloroplasten im Vergleich zu Erbsenchloroplasten (persönliche Mitteilung: Mario Jakob), wodurch eventuell eine Detektion von Spinat-TatA im Stroma erschwert werden könnte. Außerdem ist bisher nicht geklärt, ob die Erbsen-TatA repräsentierenden Signale einen funktionellen Hintergrund haben. Sie könnten auch schlicht hochgradige Homooligomere darstellen, welche eventuell für das TatA-Protein aus Spinat aufgrund unterschiedlicher Oligomerisierungseigenschaften nicht so stark ausgeprägt sind. Im bakteriellen System konnte TatA ebenfalls im Cytoplasma nachgewiesen werden (Pop *et al.*, 2003; de Keersmaecker *et al.*, 2005; Berthelmann *et al.*, 2008). Für *Bacillus subtilis* wurden für TatA_d homomultimere Komplexe beschrieben, die sowohl im Cytoplasma als auch membrangebunden vorkommen (Westermann *et al.*, 2006) und für die eine spezifische *carrier*-Funktion für das Vorläuferprotein der Phosphodiesterase PhoD diskutiert wird. Auch TatA aus *Streptomyces lividans* soll Substrate zur Translokase vermitteln können (de Keersmaecker *et al.*, 2005).

Ein unerwartetes Ergebnis ist der erfolgreiche Nachweis von reifem TatB im stromalen Extrakt von Spinat. Sowohl in der denaturierenden 1D-Analyse (Abb. 19) als auch in der zweiten Dimension nach nativer Auftrennung (Abb. 21 (a)) zeigte sich ein deutliches TatB-Signal. Auch wenn im CN-Gel die Größenbestimmung als schwierig gilt, kann aus dem Laufverhalten geschlossen werden, dass TatB in kleineren Komplexen bzw. Oligomeren (ca. 40-70 kDa) vorliegt. Ob diese sich nur aus TatB selbst zusammensetzen oder eventuell noch andere Proteine beteiligt sind, ist noch abschließend zu klären. Wichtig ist zu beachten, dass der Nachweis von TatB unter der Verwendung von Erbsenstroma nicht erfolgreich war (Daten nicht gezeigt). Daher stellt sich die Frage, ob die Detektion von Spinat-TatB im Stroma eventuell mit einer Extraktion des TatB-Proteins während der Thylakoidpräparation (ähnlich wie für TatA beobachtet – siehe Abschnitt Ergebnisse, Kapitel 1.7) zu erklären ist. Beachtet man die Ähnlichkeiten in der Struktur von TatA und TatB, wäre dieses TatA ähnliche Verhalten von TatB durchaus vorstellbar. Dagegen spricht die Tatsache, dass TatB in einem heterooligomeren Komplex zusammen mit TatC vorliegt und ein Herauslösen des Proteins aus diesem funktionellen Gebilde ohne Verlust der Transportfähigkeit der Thylakoide sehr unwahrscheinlich ist. Anhand von nativen Untersuchungen von Thylakoidmembranen innerhalb der Arbeitsgruppe gibt es jedoch den Hinweis, dass ein gewisser Teil der TatB-Menge in den Thylakoiden in monomerer Form oder in kleineren Komplexen vorliegt

(persönliche Mitteilung: Matthias Reimers). Ob diese tatsächlich ebenso wie TatA von einem Extraktionseffekt betroffen sind, würde ein ähnlich wie in Abb. 24 aufgebautes Experiment mit radioaktiv markiertem TatB oder Immunoblot-Detektion gegen das TatB-Protein klären. Wenn auch bisher keine weiteren Hinweise vorliegen, kann ein funktioneller Hintergrund des Auftretens von TatB im Stroma nicht ausgeschlossen werden. De Keersmaecker *et al.* (2005) gelang der Nachweis von TatA und TatB im Cytoplasma von *Streptomyces lividans*. Diese Proteine liegen in Form von Heterooligomeren vor und können unabhängig voneinander Substrat binden und sollen daher für die Übermittlung des Vorläuferproteins an die Membran zuständig sein. Um herauszufinden, ob das Vorkommen von TatB im stromalen Extrakt von Spinat einen funktionellen Hintergrund hat, müssen weitere Analysen durchgeführt werden. Es wäre ein Rekonstitutionsexperiment mithilfe von stromalem Extrakt und vorheriger TatB-Blockierung denkbar. Aufgrund der zahlreichen Kreuzreaktionen des Antikörpers (siehe Abb. 21) wäre auch ein eindeutiger Nachweis des TatB-Proteins im Stroma über Massenspektrometrie ratsam.

4 Spinat – Besonderheiten eines alternatives Modellsystems

Die Etablierung des Tat-abhängigen Proteintransports in Spinatthylakoiden und die ausführliche Charakterisierung von Spinat als Modellsystem offenbarte einige besondere Eigenschaften dieses Organismus, die dazu führen, dass das Spinatsystem für bestimmte Analysen im Themengebiet der Tat-Translokation mehr oder weniger gut geeignet ist. Der ermittelte Extraktionseffekt für TatA durch die Waschschrte der Thylakoidpräparation erschwert *in thylakoido*-Transportexperimente insofern, dass eine Limitierung des Transports durch die noch in der Membran verbliebene Menge an TatA besteht. Dies führt zu verminderten Transportraten im Vergleich zu Experimenten mit Erbsenthylakoiden, welche von Versuchstag zu Versuchstag variieren können. Zukünftige *in thylakoido*-Transportexperimente in Spinat sollten deshalb immer unter Zugabe von *in vitro*-translatiertem TatA durchgeführt werden, um stabile Transportraten zu gewährleisten.

Für *in thylakoido*-Versuche hingegen, die eine Eliminierung von intrinsischem TatA voraussetzen, wäre das Spinatsystem durch den Extraktionseffekt für TatA eine gute Alternative. So könnten statt der anti-TatA-Behandlung der Thylakoide mehrere Waschschrte durchgeführt werden, um das intrinsische TatA aus der Thylakoidmembran

herauszulösen. Diese Methode ist für Experimente interessant, bei denen eine Beeinträchtigung des Versuches durch die an TatA gebundenen Antikörpermoleküle befürchtet wird. Allerdings muss durch mehrere, aufeinanderfolgende Waschschriffe auch ein Verlust an Thylakoidmaterial in Kauf genommen werden (vgl. Abschnitt Ergebnisse, Kapitel 1.7), der wiederum Einfluss auf die Transportraten haben könnte.

Der Nachweis von löslichem TatB im stromalen Extrakt von Spinat stellt eine neue Beobachtung dar und eröffnet daher weitere Untersuchungsmöglichkeiten des TatB-Proteins. Interessant ist dabei die Frage, ob der im Stroma vorliegende TatB-Anteil eine funktionelle Relevanz für den Tat-abhängigen Proteintransport besitzt.

Des Weiteren ist die beobachtete Diskrepanz der TatA-Menge in Spinat- und Erbsenchloroplasten ein interessanter Punkt, der einer weiteren Untersuchung bedarf. Jakob *et al.* (2009) ermittelten bereits einen Unterschied in der TatA-Menge zwischen *Arabidopsis*- und Erbsenthylakoiden. Für weitere Untersuchungen zur Gesamtmenge von TatA in den Chloroplasten eignet sich jedoch *Arabidopsis* als Organismus nicht, da die Präparation intakter Chloroplasten aus *Arabidopsis*-Pflanzen innerhalb der Arbeitsgruppe bisher stets mit einem Verlust an stromalem Extrakt einherging (persönliche Mitteilung: Sarah Zinecker). So wäre das Spinatsystem für weitere Untersuchungen zur Gesamtmenge der Tat-Proteine in den Chloroplasten eine geeignete Alternative.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Spinat unter bestimmten Voraussetzungen (unter TatA-Zugabe, wie bereits beschrieben) für zahlreiche Untersuchungen zum Tat-abhängigen Proteintransport ein geeigneter zusätzlicher Modellorganismus zum Erbsensystem ist und zudem z. B. mit dem Nachweis von stromalem TatB Besonderheiten aufweist, die eventuell zum besseren Verständnis der Tat-abhängigen Translokation beitragen können.

5 Vergleich der Aktivitäten von TatA-Proteinen unterschiedlicher Herkunft

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung unterschiedlicher TatA-Proteine in Bezug auf ihre Fähigkeit, den Tat-abhängigen Transport zu rekonstituieren. Alle drei TatA-Homologe (aus Erbse, Spinat und *Arabidopsis*) konnten in vergleichbarem Maße den Tat-abhängigen Transport wiederherstellen (siehe Abb. 25). Die erreichten Transportraten überstiegen sogar deutlich das Ergebnis der Positivkontrolle. So kann geschlussfolgert werden, dass für den Tat-abhängigen Transport in Erbsenthylakoide die

Herkunft des TatA-Proteins keine Rolle spielt. Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit der drei Homologe, insbesondere im für die TatA-Funktion als essentiell geltenden Transmembranbereich und der amphipathischen Helix, war dies bereits zu erwarten. Allerdings wurden die TatA-Proteine für diesen Versuch in *in vitro*-translatierter Form (über das *RTS*-System) verwendet. Für eine allgemeine Aussage über die Funktionalität der TatA-Homologe wurden diese in ausreichender Menge für den Tat-Transport zugegeben. Um auch Informationen über eventuelle Aktivitätsunterschiede der TatA-Proteine zu erhalten, ist es notwendig, definierte TatA-Mengen zum Transportansatz zuzugeben. Daher war für detailliertere Untersuchungen eine heterologe Überexpression und anschließende Aufreinigung für die TatA-Proteine analog zu Hauer *et al.* (2013) notwendig. Danach standen die TatA-Homologe in hinreichend sauberer und quantifizierbarer Form zur Verfügung.

5.1 Unterschiede in den katalytischen Aktivitäten der TatA-Homologe

Durch die Untersuchung der Transportraten in Abhängigkeit von der TatA-Konzentration können Aussagen über die TatA-Aktivität getroffen werden. Dabei gilt der für jedes TatA-Protein ermittelte Quotient der katalytischen Aktivität als am besten geeignetes Vergleichsmittel. Aus dem Rekonstitutionsexperiment in Abb. 28 ergab sich ein Quotient für Spinat-TatA von $\frac{y_{\max}}{K_m} = 2$ und damit ein deutlicher Unterschied zu *Arabidopsis*-TatA, welches bereits durch Hauer *et al.* (2013) auf seine Aktivität hin untersucht wurde (Abb. 29; $\frac{y_{\max}}{K_m} = 7$). Dieser Unterschied in der katalytischen Aktivität ist unabhängig von der Herkunft der verwendeten Thylakoide, da beispielsweise Spinat-TatA eine ähnliche katalytische Aktivität im Experiment mit Erbsen- und Spinatthylakoiden zeigte (siehe Tab. 1). Weiterhin liefern die hier gezeigten Ergebnisse Hinweise darauf, dass das zu transportierende Vorläuferprotein keinen Einfluss auf den Aktivitätsunterschied zwischen den TatA-Homologen aus Spinat und *Arabidopsis* hat, denn sowohl unter Verwendung des 16/16 Proteins als auch für das 23/23 Protein zeigte sich ein deutlicher Aktivitätsunterschied (siehe Tab. 1). Für das Spinat-TatA-Protein wurden sogar unter Verwendung der beiden Substrate ähnliche Quotienten für die katalytische Aktivität ermittelt. Um tatsächlich einen eventuellen Einfluss des Vorläuferproteins auf die TatA-Aktivität auszuschließen, sind weitere analoge Rekonstitutionsexperimente mit verschiedenen Substraten notwendig. Ebenso ist noch nicht abschließend geklärt, ob TatA im Zuge der Translokation eine Interaktion mit dem

Vorläuferprotein eingehen muss. Im bakteriellen System gibt es Untersuchungen, die solch eine TatA-Substrat-Interaktion bekräftigen (de Keersmaeker *et al.*, 2005; Fröbel *et al.*, 2011; Taubert *et al.*, 2015). Auch für das chloroplastidäre TatA gibt es Hinweise auf eine Interaktion mit dem reifen Teil des Vorläuferproteins (Pal *et al.*, 2013). Unklar ist bisher noch, welchen funktionellen Hintergrund diese Interaktion hat, also ob TatA z. B., wie für *Streptomyces lividans* postuliert, eine *carrier*-Funktion für das Substrat ausübt oder der Kontakt zwischen Substrat und TatA mit dem eigentlichen Transportvorgang einhergeht.

Zur besseren Bewertung der Unterschiede in der TatA-Aktivität zwischen Spinat-TatA und *Arabidopsis*-TatA wurde zusätzlich ein Rekonstitutionsexperiment mit überexprimiertem und gereinigtem TatA aus Erbse durchgeführt (siehe Abb. 33). Dessen ermittelte katalytische Aktivität zeigt mit einem Wert von 0,9 große Ähnlichkeiten zu dem Quotienten für Spinat-TatA im analogen Versuch ($\frac{y_{\max}}{K_m} = 1,9$). Der aus dieser Arbeit hervorgehende Wert für *Arabidopsis*-TatA liegt dagegen mit 20,0 deutlich höher. Dies lässt vermuten, dass die beiden TatA-Homologe aus Erbse und Spinat ähnlich aktiv sind und *Arabidopsis*-TatA einen deutlich aktiveren Vertreter dieses Proteins darstellt. Ein Faktor, der den Aktivitätsunterschied beschreibt, kann aufgrund der teilweise nur einmalig durchgeführten Untersuchungen nicht bestimmt werden. Allerdings zeigt sich *Arabidopsis*-TatA in allen Experimenten mindestens dreimal so aktiv wie die beiden Homologe aus Erbse und Spinat.

Im Zuge dieser Arbeit sollte der Grund für diese Ungleichheit in der Aktivität der verschiedenen TatA-Proteine ermittelt werden. Dazu wurde untersucht, ob eventuelle Unterschiede in der Löslichkeit der dialysierten TatA-Proteine in wässriger Lösung für die ermittelten Aktivitätsunterschiede verantwortlich sein können. Ein analog durchgeführtes Experiment zur Bestimmung der Aktivitätsparameter wurde mit über das *RTS*-System *in vitro*-synthetisierten TatA-Proteinen aus Spinat, Erbse und *Arabidopsis* durchgeführt. Die Translation über das *RTS*-System versichert durch die Präsenz von Chaperonen und anderen Komponenten eine gleichbleibende Löslichkeit der Zielproteine. Sollten die ermittelten Unterschiede in den einzelnen TatA-Aktivitäten auch in *RTS*-Form auftreten, so sind diese nicht löslichkeitsbedingt. Die ermittelten Werte für die katalytische Aktivität der *RTS*-Proteine (siehe Abb. 34) zeigten eine ähnliche Tendenz wie für die aufgereinigten Proteine (für *Arabidopsis*-TatA: 55,7; für Erbsen-TatA: 2,4 und für Spinat-TatA: 0,8). *Arabidopsis*-TatA erscheint erneut deutlich aktiver als die anderen beiden TatA-Homologe. Der Unterschied in den Quotienten zeigt sich hier zwar noch um einiges deutlicher als in den vorigen Versuchen

(siehe Tab. 1), allerdings sind die Werte dieses Versuchs aufgrund der erheblichen Schwierigkeiten während der Quantifizierung nur unter Vorbehalt zu betrachten. Außerdem ist zu beachten, dass für Spinat-TatA auch mit der höchsten eingesetzten Konzentration lediglich eine Rekonstitution des Transports von ca. 60 % im Vergleich zur Kontrolle erreicht werden konnte. Jedoch zeigte *Arabidopsis*-TatA auch in *RTS*-Form eine deutlich höhere Aktivität als Spinat- und Erbsen-TatA. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Aktivitätsunterschiede, die für die aufgereinigten TatA-Proteine ermittelt wurden, nicht maßgeblich von abweichenden Löslichkeiten im wässrigen Milieu verursacht werden.

Die Ergebnisse eines weiteren Experimentes zur Untersuchung der Löslichkeit zeigten keine prinzipiell bessere Löslichkeit und auch keine höhere zeitliche Stabilität für *Arabidopsis*-TatA im Vergleich zu den beiden anderen Proteinen (Abb. 35). Es konnte also keine direkte Verbindung zwischen der Stabilität des gelösten TatA und der ermittelten Aktivitätswerte für die Proteine nachgewiesen werden. Allerdings ist zu beachten, dass die verwendeten gereinigten TatA-Proteine bereits eine gewisse Zeit bei 4 °C in einem Acetonitril-Wasser-Gemisch lagerten. Zudem zeigten aktuellere Untersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe mit einer frisch präparierten *Arabidopsis*-TatA-Lösung eine höhere Stabilität des Proteins über die Zeit, als in Abb. 35 ermittelt wurde (d. h. es gab keine Verluste an löslichem TatA-Protein durch Präzipitation). So kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Lagerungszeit der TatA-Proteine im Acetonitril-Wasser-Gemisch eventuell Auswirkungen auf die Löslichkeit des Proteins haben könnte. Es gibt bereits Hinweise, dass Acetonitril die Faltung einiger Proteine beeinflussen kann. Für Immunglobulin G wurde nach Zugabe von Acetonitril zur Lösung die Bildung eines sogenannten *molten globule*-Zustandes beschrieben, eine Art Zwischenstufe, in der zwar bereits Sekundärstrukturen ausgebildet sind, aber das Protein noch nicht in seiner korrekten Faltung vorliegt (Amani und Naeem, 2011). In diesem Zustand kann es durch die Exposition bestimmter Aminosäurereste an die Oberfläche auch zu kleineren Aggregaten kommen. Im Falle von TatA könnten diese kleineren Aggregate dazu führen, dass das Protein in seiner Funktion als Coenzym nicht mehr aktiv arbeiten kann, die Aggregate aber in löslicher Form in der Probe präsent sind. Ebenfalls ist es vorstellbar, dass sich diese Aggregate mit steigender Lagerungsdauer verstärkt bilden. Wenn diese durch Zentrifugation nicht von der löslichen Phase abzutrennen wären, würden sie die Quantifizierung des aktiven TatA-Anteils verfälschen. Ohnehin ist die Frage, ob alle synthetisierten TatA-Moleküle tatsächlich auch katalytisch aktiv sind, nicht eindeutig zu beantworten. Die Bewertung der

TatA-Aktivitäten basiert auf der Annahme, dass nach Überexpression, Reinigung der TatA-Homologe und anschließender Dialyse jeweils ein ähnlich hoher Anteil der synthetisierten Proteine in aktiver Form vorliegt. Eine Methode, dies zu überprüfen, ist die Durchführung einer Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) für die verwendeten TatA-Homologe. So könnte die Ausbildung von Sekundärstrukturen (wie etwa α -Helices) untersucht und zwischen den TatA-Proteinen verglichen werden. Eine Schwierigkeit für diese Methode ist, dass der für die Rekonstitutionsexperimente eingesetzte HM-Puffer aufgrund seiner Absorptionseigenschaften nicht optimal für die CD-Spektroskopie geeignet ist (Kelly *et al.*, 2005). Eventuell lohnt sich die Suche nach einer mit CD-Spektren besser kompatiblen Pufferkomponente. Selbstverständlich müssten die Transport-Rekonstitutionsexperimente in diesem Puffer wiederholt werden, um einen eventuellen Einfluss auf den Transport auszuschließen.

5.2 Die Rolle des C-Terminus für die katalytische Aktivität des TatA-Proteins und für die Tat-abhängige Translokation

Über den C-Terminus des TatA-Proteins und seine genaue Rolle im Prozess der Translokation des Substrates gibt es bisher nur wenig detaillierte Informationen. Auch wenn dessen Sequenz allgemein als weniger konserviert gilt und somit Sekundärstrukturen schwer vorhersagbar sind, gibt es Hinweise auf zusätzliche helikale Strukturen (Porcelli *et al.*, 2002). Einige Untersuchungen mit verkürzten bakteriellen TatA-Proteinen zeigen, dass der C-Terminus sowohl die Stabilität des Proteins im Cytosol positiv beeinflusst (Lange *et al.*, 2007), als auch negativ regulierend auf die Oligomerisierung wirken kann (Zhang *et al.*, 2014). Auch für TatA-Proteine pflanzlicher Herkunft wird eine wichtige Rolle des C-Terminus für die Oligomerisierung von TatA unter Transportbedingungen postuliert (Dabney-Smith und Cline, 2009).

Der in dieser Arbeit ermittelte Unterschied in der katalytischen Aktivität von Spinat- und Erbsen-TatA sowie *Arabidopsis*-TatA muss nach den hier gewonnenen Ergebnissen in den Eigenschaften der TatA-Homologe selbst begründet sein. Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit der N-terminalen TatA-Strukturbereiche ist es wahrscheinlich, dass Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung des C-Terminus für Abweichungen in der Aktivität des Proteins verantwortlich sind. Um dies zu überprüfen, wurden im Laufe dieser Arbeit chimäre TatA-Proteine generiert, die sich jeweils aus einem Anteil von Spinat-TatA und

einem Anteil von *Arabidopsis*-TatA zusammensetzen. Hierbei wurde beispielsweise der C-Terminus von *Arabidopsis*- und Spinat-TatA untereinander ausgetauscht (siehe Abb. 37). Die für diese chimären TatA-Proteine ermittelten Daten und die berechneten aktivitätsbeschreibenden Parameter (Abb. 38) zeigen deutlich, dass die katalytischen Aktivitäten der chimären TatA-Proteine den erhaltenen Werten für Spinat-TatA sehr ähneln. Sollte die Aminosäurezusammensetzung der C-terminalen Bereiche der TatA-Proteine allein für die unterschiedlichen Aktivitätswerte verantwortlich sein, wäre für die Chimäre, dessen C-Terminus aus *Arabidopsis* stammt, eine ähnliche katalytische Aktivität wie für *Arabidopsis*-TatA zu erwarten. Dass aber auch dieses chimäre TatA-Protein eine geringere Aktivität im Vergleich zum authentischen *Arabidopsis*-TatA aufweist, legt nahe, dass auch andere Bereiche des Proteins eine Rolle spielen müssen.

Für die Untersuchungen der chimären Konstrukte muss allerdings kritisch bewertet werden, dass die verwendeten Proteine nicht immer eine erfolgreiche Rekonstitution des Transports bewerkstelligen konnten. Die in Abb. 38 gezeigten Diagramme repräsentieren jeweils Versuchsdurchläufe, in denen der Transport erfolgreich rekonstituiert wurde. In einigen, analog durchgeführten Experimenten lagen die erreichten Transportraten dagegen lediglich im Bereich von 20-50 % (Daten nicht gezeigt). Diese Unregelmäßigkeit in den Rekonstitutionsraten könnte ein Faltungsproblem repräsentieren. Je nach Zusammensetzung der chimären Proteine können sich unterschiedliche Faltungsstrukturen ausbilden, die die Löslichkeit der Proteine beeinflussen können. Für jeden Versuchstag wurden Aliquots der TatA-Proteinlösungen frisch dialysiert. Abhängig vom Erfolg der Dialyse könnten so unterschiedlich aktive TatA-Fractionen entstehen. Für eindeutigere Aussagen über die Aktivitäten der chimären Konstrukte sollte die Dialyse der Proteine in Gegenwart von Harnstoff wiederholt werden, um die korrekte Faltung der Proteine sicherzustellen.

Dennoch liefern die Ergebnisse der chimären TatA-Proteine einen ersten Hinweis darauf, dass die Aktivitätsunterschiede der TatA-Homologe nicht allein in der Zusammensetzung des C-Terminus begründet sind. So ist ein Zusammenspiel verschiedener TatA-Domänen, wie z.B. der amphipathischen Helix und des C-Terminus vorstellbar, das im Falle von *Arabidopsis*-TatA zu einer höheren Aktivität im Vergleich zu den beiden anderen TatA-Proteinen führen kann. Walther *et al.* (2013) beschreiben ein Modell für die Topologie von TatA, nach dem amphipathische Helix und C-Terminus sich innerhalb der Membran entsprechend einem sogenannten *Charge zipper*-Mechanismus parallel zusammenlagern. Wenn nun, im Fall der

beschriebenen Chimären, kleinste Abweichungen in der Aminosäureabfolge in der amphipathischen Helix und dem C-terminalen Bereich zu veränderten Ladungsverhältnissen führen, könnte das chimäre TatA-Protein die postulierte Topologie nur noch eingeschränkt einnehmen und so in seiner Funktion beeinträchtigt sein. Der postulierte *Charge zipper*-Mechanismus wird allerdings im Zusammenhang mit dem Modell der TatA-Pore diskutiert und wird durch einige Publikationen stark in Frage gestellt (Cline, 2015; Zhang *et al.*, 2014).

Zusammenfassend ist also noch nicht abschließend geklärt, welche genaue Rolle der C-Terminus für die TatA-Funktion spielt. Allerdings liefern die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse den Hinweis, dass dieser Bereich, wenn auch nicht essentiell für die eigentliche TatA-Funktion, einen wichtigen Beitrag zur Aktivität des Proteins leistet und deshalb für Struktur- und Funktionsanalysen nicht außer Acht gelassen werden sollte.

5.3 Zusammenfassung: Begriff der Aktivität für das TatA-Protein

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente basieren auf dem in der Arbeitsgruppe favorisierten Modell der Coenzym-vermittelten Translokation. So kann TatA entsprechend einer „Schalter“-Funktion im substratgebundenen TatBC-Rezeptorkomplex eine Konformationsänderung auslösen, die dann zum Transport des Substrates über die Membran führt. Für die Aktivität des TatA-Proteins scheinen die verwendeten Thylakoide (Erbsen- oder Spinatthylakoide) keine Rolle zu spielen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die im TatBC-Komplex wichtigen Bereiche für die Interaktion mit TatA in Erbse und Spinat recht ähnlich sind.

Jetzt stellt sich allerdings die Frage, was der Begriff „Aktivität“ für das TatA-Protein in der Rolle eines Coenzym eigentlich bedeutet. Die Definition der katalytischen Aktivität durch den Quotienten $\frac{y_{\max}}{K_m}$ (gemäß Abschnitt Ergebnisse, Kapitel 2.2.1) zeigt, dass für die Aktivität zwei Faktoren eine Rolle spielen. y_{\max} als Alternativwert zu k_{cat} , der Wechselzahl, beschreibt bereits einen Wert für die Effizienz des Enzyms an sich. Beispielsweise drückt k_{cat} den Substratumsatz pro Sekunde aus. Damit ist auch y_{\max} ein direkter Richtwert dafür, wie effizient das jeweilige Protein seine Funktion ausübt. Betrachtet man in Tab. 1 die Werte für y_{\max} der verschiedenen (aufgereinigten) TatA-Proteine, liegen diese stets über 100 %. Das heißt, dass alle drei untersuchten TatA-Proteine ab einer bestimmten Konzentration genauso effizient arbeiten,

wie die intrinsischen TatA-Proteine in der Positivkontrolle. Zusätzlich zu diesem Wert beeinflusst ebenfalls der Affinitätsparameter K_m die katalytische Aktivität, denn vor der Funktion als Schalter ist die Interaktion des TatA-Proteins mit dem Rezeptorkomplex notwendig. In diesem Schritt können Unterschiede in der Affinität der einzelnen TatA-Proteine zum substratgebundenen TatBC-Rezeptorkomplex auftreten. In Tab.1 sind diese Abweichungen im Wert für K_m zwischen den verschiedenen TatA-Homologen deutlich zu erkennen (z. B. für Spinat-TatA: $K_m > 0,55$; für *Arabidopsis*-TatA: $K_m < 0,15$). Dies lässt darauf schließen, dass die ermittelten Unterschiede in der katalytischen Aktivität maßgeblich durch eine unterschiedlich hohe Affinität zum Tat-Translokasekomplex hervorgerufen werden. Warum diese für die verwendeten TatA-Proteine so verschieden ist, bleibt unklar. Ein Hinweis wäre die Identifizierung von Aminosäureresten / Bereichen im TatA-Protein, die für die Interaktion mit TatB / TatC oder dem Substrat wichtig sein könnten. Blümmel *et al.* (2015) wiesen über *Cross-linking* eine Interaktion des N-Terminus von TatA sowohl mit TatB als auch mit dem Vorläuferprotein nach. Für alle drei verwendeten TatA-Proteine sind allerdings die Aminosäuresequenzen des kompletten Transmembranbereiches nahezu identisch (siehe Abb. 36). So würden sich die Affinitätsunterschiede der TatA-Proteine nur erklären lassen, wenn noch weitere Bereiche von TatA an der Interaktion mit dem TatBC-Komplex und / oder dem Vorläuferprotein beteiligt sind. Die Funktionsweise von TatA bleibt also ein spannendes Thema und wird sicher noch Gegenstand vieler zukünftiger Untersuchungen im Gebiet des Tat-abhängigen Proteintransports sein.

Literaturverzeichnis

- Alami, M., Lüke, I., Deitermann, S., Eisner, G., Koch, H. G., Brunner, J., & Müller, M. (2003)** Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in *Escherichia coli*. *Molecular Cell*, *12*(4), 937–946.
- Albiniak, A. M., Baglieri, J., & Robinson, C. (2012)** Targeting of luminal proteins across the thylakoid membrane. *Journal of Experimental Botany*, *63*(4), 1689–98.
- Aldridge, C., Storm, A., Cline, K., & Dabney-Smith, C. (2012)** The chloroplast twin arginine transport (Tat) component, Tha4, undergoes conformational changes leading to Tat protein transport. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(41), 34752–63.
- Amani, S., & Naeem, A. (2011)** Acetonitrile can promote formation of different structural intermediate states on aggregation pathway of immunoglobulin G from human and bovine. *International Journal of Biological Macromolecules*, *49*(1), 71–8.
- Bechtluft, P., van Leeuwen, R. G. H., Tyreman, M., Tomkiewicz, D., Nouwen, N., Tepper, H. L., Driessen, A. J. M., Tans, S. J. (2007)** Direct observation of chaperone-induced changes in a protein folding pathway. *Science (New York, N.Y.)*, *318*(5855), 1458–61.
- Berghöfer, J., & Klösigen, R. B. (1999)** Two distinct translocation intermediates can be distinguished during protein transport by the TAT (Deltaph) pathway across the thylakoid membrane. *FEBS Letters*, *460*(2), 328–32.
- Berthelmann, F., Mehner, D., Richter, S., Lindenstrauss, U., Lünsdorf, H., Hause, G., & Brüser, T. (2008)** Recombinant expression of tatABC and tatAC results in the formation of interacting cytoplasmic TatA tubes in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(37), 25281–25289.
- Blümmel, A.-S., Haag, L. A., Eimer, E., Müller, M., & Fröbel, J. (2015)** Initial assembly steps of a translocase for folded proteins. *Nature Communications*, *6*, 7234.
- Bogsch, E., Brink, S., & Robinson, C. (1997)** Pathway specificity for a delta pH-dependent precursor thylakoid lumen protein is governed by a “Sec-avoidance” motif in the transfer peptide and a “Sec-incompatible” mature protein. *The EMBO Journal*, *16*(13), 3851–3859.
- Bolhuis, A., Mathers, J. E., Thomas, J. D., Barrett, C. M., & Robinson, C. (2001)** TatB and TatC form a functional and structural unit of the twin-arginine translocase from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(23), 20213–9.
- Bradford, M. M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248–54.
- Braun, N. A., Davis, A. W., & Theg, S. M. (2007)** The Chloroplast Tat Pathway Utilizes the Transmembrane Electric Potential as an Energy Source. *Biophysical Journal*, *93*(6), 1993–1998.
- Bruce, B. D. (2000)** Chloroplast transit peptides : structure , function and evolution, *Trends Cell Biol* *10*,, 440-447.
- Brüser, T., & Sanders, C. (2003)** An alternative model of the twin arginine translocation system. *Microbiological Research*, *158*(1), 7–17.

- Celedon, J. M., & Cline, K. (2012)** Stoichiometry for binding and transport by the twin arginine translocation system. *The Journal of Cell Biology*, 197(4), 523–34.
- Chaddock, A. M., Mant, A., Karnauchov, I., Brink, S., Herrmann, R. G., Klosgen, R. B., & Robinson, C. (1995)** A new type of signal peptide : central role of a twin-arginine motif in transfer signals for the ApH-dependent thylakoidal protein translocase, *Embo J* 14,, 2715–2722.
- Chan, C. S., Zlomislic, M. R., Tieleman, D. P., & Turner, R. J. (2007)** The TatA subunit of Escherichia coli twin-arginine translocase has an N-in topology. *Biochemistry*, 46(25), 7396–404.
- Clausmeyer, S., Klösigen, R. B., & Herrmann, R. G. (1993)** Protein import into chloroplasts. The hydrophilic luminal proteins exhibit unexpected import and sorting specificities in spite of structurally conserved transit peptides. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(19), 13869–76.
- Cléon, F., Habersetzer, J., Alcock, F., Kneuper, H., Stansfeld, P. J., Basit, H., ... Palmer, T. (2015)** The TatC component of the twin-arginine protein translocase functions as an obligate oligomer. *Molecular Microbiology*, 98(1), 111–129.
- Cline, K. (2015)** Mechanistic Aspects of Folded Protein Transport by the Twin Arginine Translocase (Tat). *The Journal of Biological Chemistry*, 290(27), 16530–16538.
- Cline, K., & Mori, H. (2001)** Thylakoid Δ pH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport. *Journal of Cell Biology*, 154(4), 719–729.
- Cristóbal, S., De Gier, J. W., Nielsen, H., & Von Heijne, G. (1999)** Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in Escherichia coli. *EMBO Journal*, 18(11), 2982–2990.
- Dabney-Smith, C., & Cline, K. (2009)** Clustering of C-terminal stromal domains of Tha4 homo-oligomers during translocation by the Tat protein transport system. *Molecular Biology of the Cell*, 20(7), 2060–2069.
- Dabney-Smith, C., Mori, H., & Cline, K. (2003)** Requirement of a Tha4-conserved Transmembrane Glutamate in Thylakoid Tat Translocase Assembly Revealed by Biochemical Complementation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(44), 43027–43033.
- Dabney-Smith, C., Mori, H., & Cline, K. (2006)** Oligomers of Tha4 organize at the thylakoid Tat translocase during protein transport. *Journal of Biological Chemistry*.
- De Keersmaeker, S. De, Mellaert, L. Van, Schaerlaekens, K., Dessel, W. Van, Vrancken, K., Lammertyn, E. Anné J., Geukens, N. (2005).** Structural organization of the twin-arginine translocation system in Streptomyces lividans. *FEBS Letters*, 579(3), 797–802.
- DeLisa, M. P., Tullman, D., & Georgiou, G. (2003)** Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin-arginine translocation pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(10), 6115–6120.
- Dittmar, J., Schlesier, R., & Klösigen, R. B. (2014)** Tat transport of a Sec passenger leads to both completely translocated as well as membrane-arrested passenger proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1843(2), 446–453.
- Eichacker, L. a., & Henry, R. (2001)** Function of a chloroplast SRP in thylakoid protein export. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1541(1-2), 120–134.

- Eimer, E., Fröbel, J., Blümmel, A.-S., & Müller, M. (2015)** TatE as a Regular Constituent of Bacterial Twin-arginine Protein Translocases. *Journal of Biological Chemistry*, jbc.M115.696005.
- Ferreras, M., Gavilanes, J. G., & Garciassegura, J. M. (1993)** A Permanent Zn²⁺ Reverse Staining Method for the Detection and Quantification of Proteins in Polyacrylamide Gels. *Analytical Biochemistry*, 213(2), 206–212.
- Fincher, V., Dabney-Smith, C., & Cline, K. (2003)** Functional assembly of thylakoid Δ pH-dependent/Tat protein transport pathway components in vitro. *European Journal of Biochemistry*, 270(24), 4930–4941.
- Frielingsdorf, S. (2003)** Charakterisierung der frühen Schritte des Δ pH/TAT- abhängigen Proteintransports am Beispiel des chimären 16/23-Proteins. *Diplomarbeit* (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg).
- Frielingsdorf, S. (2008)** Funktionelle Charakterisierung von Teilschritten des Tat-abhängigen Proteintransports an der Thylakoidmembran. *Dissertation* (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg).
- Frielingsdorf, S., Jakob, M., & Klösigen, R. B. (2008)** A stromal pool of TatA promotes Tat-dependent protein transport across the thylakoid membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(49), 33838–33845.
- Frielingsdorf, S., & Klösigen, R. B. (2007)** Prerequisites for terminal processing of thylakoidal Tat substrates. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(33), 24455–62.
- Fröbel, J., Rose, P., & Müller, M. (2011)** Early contacts between substrate proteins and TatA translocase component in twin-arginine translocation. *Journal of Biological Chemistry*, 286(51), 43679–43689.
- Gohlke, U., Pullan, L., McDevitt, C. A., Porcelli, I., de Leeuw, E., Palmer, T., Saibil H. R. & Berks, B. C. (2005)** The TatA component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(30), 10482–10486.
- Goosens, V. J., Monteferrante, C. G., & van Dijk, J. M. (2014)** The Tat system of Gram-positive bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1843(8), 1698–706.
- Gouffi, K., Gérard, F., Santini, C. L., & Wu, L. F. (2004)** Dual Topology of the Escherichia coli TatA Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 279(12), 11608–11615.
- Gray, M. W., & Doolittle, W. F. (1982)** Has the endosymbiont hypothesis been proven? *Microbiological Reviews*, 46(1), 1–42.
- Gutensohn, M., Fan, E., Frielingsdorf, S., Hanner, P., Hou, B., Hust, B., & Klösigen, R. B. (2006)** Toc, Tic, Tat et al.: structure and function of protein transport machineries in chloroplasts. *Journal of Plant ...*, 163(3), 333–347.
- Hanahan, D. (1983)** Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557–80.

- Hauer, R. S., Schlesier, R., Heilmann, K., Dittmar, J., Jakob, M., & Klösgen, R. B. (2013) Enough is enough : TatA demand during Tat-dependent protein transport. *BBA - Molecular Cell Research*, 1833(5), 957–965.
- Henry, R., Kapazoglou, A., McCaffery, M., & Cline, K. (1994) Differences between lumen targeting domains of chloroplast transit peptides determine pathway specificity for thylakoid transport. *Journal of Biological Chemistry*, 269(14), 10189–10192.
- Hicks, M. G., de Leeuw, E., Porcelli, I., Buchanan, G., Berks, B. C., & Palmer, T. (2003) The Escherichia coli twin-arginine translocase: conserved residues of TatA and TatB family components involved in protein transport. *FEBS Letters*, 539(1-3), 61–67.
- Holzappel, E., Eisner, G., Alami, M., Barrett, C. M. L., Buchanan, G., Lüke, I., Betton, J., Robinson, C., Palmer, T., Moser, M. & Müller, M. (2007) The entire N-terminal half of TatC is involved in twin-arginine precursor binding. *Biochemistry*, 46(10), 2892–2898.
- Hou, B., Frielingsdorf, S., & Klösgen, R. B. (2006) Unassisted membrane insertion as the initial step in DeltapH/Tat-dependent protein transport. *Journal of Molecular Biology*, 355(5), 957–67.
- Hu, Y., Zhao, E., Li, H., Xia, B., & Jin, C. (2010) Solution NMR structure of the TatA component of the twin-arginine protein transport system from gram-positive bacterium Bacillus subtilis. *Journal of the American Chemical Society*, 132(45), 15942–4.
- Hynds, P. J., Robinson, D., & Robinson, C. (1998) The Sec-independent twin-arginine translocation system can transport both tightly folded and malfolded proteins across the thylakoid membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 273(52), 34868–34874.
- Jakob, M., Kaiser, S., Gutensohn, M., Hanner, P., & Klösgen, R. B. (2009) Tat subunit stoichiometry in Arabidopsis thaliana challenges the proposed function of TatA as the translocation pore. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793(2), 388–394.
- Jarvis, P., & Robinson, C. (2004) Mechanisms of Protein Import and Routing in Chloroplasts, *Current Biology*, 14, 1064–1077.
- Kelly, S. M., Jess, T. J., & Price, N. C. (2005) How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta* 1751 (2005) 119 – 139
- Kim, S. J., Jansson, S., Hoffman, N. E., Robinson, C., & Mant, A. (1999) Distinct “assisted” and “spontaneous” mechanisms for the insertion of polytopic chlorophyll-binding proteins into the thylakoid membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(8), 4715–4721.
- Klösgen, R. B., Brock, I. W., Herrmann, R. G., & Robinson, C. (1992) Proton gradient-driven import of the 16 kDa oxygen-evolving complex protein as the full precursor protein by isolated thylakoids. *Plant Molecular Biology*, 18(5), 1031–1034.
- Knott, T. G., & Robinson, C. (1994) The SecA inhibitor, azide, reversibly blocks the translocation of a subset of proteins across the chloroplast thylakoid membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 269(11), 7843–7846.
- Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1), 105–132.

- Laemmli, U. (1970).** Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 272, 680-685.
- Lange, C., Müller, S. D., Walther, T. H., Bürck, J., & Ulrich, A. S. (2007)** Structure analysis of the protein translocating channel TatA in membranes using a multi-construct approach. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768(10), 2627–34.
- Lee, P. A., Buchanan, G., Stanley, N. R., Berks, B. C., & Palmer, T. (2002)** Truncation analysis of TatA and TatB defines the minimal functional units required for protein translocation. *Journal of Bacteriology*, 184(21), 5871–5879.
- Li, X., Henry, R., Yuan, J., Cline, K., & Hoffman, N. E. (1995)** A chloroplast homologue of the signal recognition particle subunit SRP54 is involved in the posttranslational integration of a protein into thylakoid membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(9), 3789–3793.
- Lorković, Z. J., Schröder, W. P., Pakrasi, H. B., Irrgang, K. D., Herrmann, R. G., & Oelmüller, R. (1995)** Molecular characterization of PsbW, a nuclear-encoded component of the photosystem II reaction center complex in spinach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(19), 8930–8934.
- Madueño, F., Bradshaw, S. a., & Gray, J. C. (1994)** The thylakoid-targeting domain of the chloroplast Rieske iron-sulfur protein is located in the N-terminal hydrophobic region of the mature protein. *Journal of Biological Chemistry*, 269(26), 17458–17463.
- Mangels, D., Mathers, J., Bolhuis, A., & Robinson, C. (2005)** The Core TatABC Complex of the Twin-arginine Translocase in *Escherichia coli*: TatC Drives Assembly Whereas TatA is Essential for Stability. *Journal of Molecular Biology*, 345(2), 415–423.
- Mant, A., Schmidt, I., Herrmann, R. G., & Robinson, C. (1995)** Sec-dependent Thylakoid Protein Translocation, *The Journal of biological chemistry*, 270, 23275-23281.
- Margulis, L. (1970)** Origin of eukaryotic cells: evidence and research implications for a theory of the origin and evolution of microbial, plant, and animal cells on the.
- Marques, J. P., Schattet, M. H., Hause, G., Dudeck, I., & Klösgen, R. B. (2004)** In vivo transport of folded EGFP by the Δ pH/TAT-dependent pathway in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 55(403), 1697–1706.
- Martin, W., & Herrmann, R. G. (1998)** Gene Transfer from Organelles to the Nucleus: How Much, What Happens, and Why? *PLANT PHYSIOLOGY*, 118(1), 9–17.
- Mehner, D., Osadnik, H., Lünsdorf, H., & Brüser, T. (2012)** The Tat System for Membrane Translocation of Folded Proteins Recruits the Membrane-stabilizing Psp Machinery in *Escherichia coli* *Journal of Biological Chemistry*, 287(33), 27834–27842.
- Mereschkowsky, C. (1905)** Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biologisches Centralblatt* 25/18: 38–604, ed. *J. Rosenthal*. Retrieved from
- Michl, D., Robinson, C., Shackleton, J. B., Herrmann, R. G., & Klösgen, R. B. (1994)** Targeting of proteins to the thylakoids by bipartite presequences: CFoll is imported by a novel, third pathway. *The EMBO Journal*, 13(6), 1310–1317.

- Molik, S. (2005)** Das plastidäre Rieske Fe/S-Protein: Analyse des Transport- und Assemblierungsprozesses. *Dissertation* (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg).
- Molik, S., Karnauchov, I., Weidlich, C., Herrmann, R. G., & Klo, R. B. (2001)** The Rieske Fe / S Protein of the Cytochrome b 6 / f Complex in, 276(46), 42761–42766.
- Mori, H., & Cline, K. (2002)** A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid [Delta]pH/Tat translocase. In *The Journal of cell biology* (Vol. 157, pp. 205–10).
- Mori, H., Summer, E. J., & Cline, K. (2001)** Chloroplast TatC plays a direct role in thylakoid (Delta)pH-dependent protein transport. *FEBS Letters*, 501(1), 65–68.
- Mould, R. M., & Robinson, C. (1991)** A proton gradient is required for the transport of two luminal oxygen-evolving proteins across the thylakoid membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 266(19), 12189–12193.
- Nakai, M., Goto, A., Nohara, T., Sugita, D., & Endo, T. (1994)** Identification of the SecA protein homolog in pea chloroplasts and its possible involvement in thylakoidal protein transport. *Journal of Biological Chemistry*, 269(50), 31338–31341.
- Natale, P., Brüser, T., & Driessen, A. J. M. (2008)** Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane — Distinct translocases and mechanisms, 1778, 1735–1756.
- Neuhoff, V., Stamm, R., & Eibl, H. (1985)** Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis*, 6(9), 427–448.
- Oates, J., Barrett, C. M. L., Barnett, J. P., Byrne, K. G., Bolhuis, A., & Robinson, C. (2005)** The Escherichia coli twin-arginine translocation apparatus incorporates a distinct form of TatABC complex, spectrum of modular TatA complexes and minor TatAB complex. *Journal of Molecular Biology*, 346(1), 295–305.
- Pal, D., Fite, K., & Dabney-Smith, C. (2013)** Direct interaction between a precursor mature domain and transport component Tha4 during twin arginine transport of chloroplasts. *Plant Physiology*, 161(2), 990–1001.
- Pop, O. I., Westermann, M., Volkmer-Engert, R., Schulz, D., Lemke, C., Schreiber, S., Gerlach R., Wetzker R. & Müller, J. P. (2003)** Sequence-specific binding of prePhoD to soluble TatAd indicates protein-mediated targeting of the Tat export in Bacillus subtilis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(40), 38428–38436.
- Porcelli, I., de Leeuw, E., Wallis, R., van den Brink-van der Laan, E., de Kruijff, B., Wallace, B. A., Palmer, T. & Berks, B. C. (2002)** Characterization and Membrane Assembly of the TatA Component of the Escherichia coli Twin-Arginine Protein Transport System †. *Biochemistry*, 41(46), 13690–13697.
- Protein Blotting Handbook** (2012) (6. Edition), EMD Millipore.
- Ramasamy, S., Abrol, R., Suloway, C. J. M., & Clemons, W. M. (2013)** The glove-like structure of the conserved membrane protein TatC provides insight into signal sequence recognition in twin-arginine translocation. *Structure (London, England : 1993)*, 21(5), 777–88.

- Richter, S., & Lamppa, G. K. (1998)** A chloroplast processing enzyme functions as the general stromal processing peptidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(13), 7463–7468.
- Richter, S., Lindenstrauss, U., Lücke, C., Bayliss, R., & Brüser, T. (2007)** Functional tat transport of unstructured, small, hydrophilic proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 282(46), 33257–33264.
- Robinson, C., Cai, D., Hulford, a, Brock, I. W., Michl, D., Hazell, L., Schmidt, I., Herrmann, R.G. & Klösgen, R. B. (1994)** The presequence of a chimeric construct dictates which of two mechanisms are utilized for translocation across the thylakoid membrane: evidence for the existence of two distinct translocation systems. *The EMBO Journal*, 13(2), 279–285.
- Robinson, C., & Ellis, R. J. (1984)** Transport of proteins into chloroplasts. Partial purification of a chloroplast protease involved in the processing of imported precursor polypeptides. *European Journal of Biochemistry*, 142(2), 337–342.
- Robinson, C., Matos, C. F. R. O., Beck, D., Ren, C., Lawrence, J., Vasisht, N., & Mendel, S. (2011)** Transport and proofreading of proteins by the twin-arginine translocation (Tat) system in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1808(3), 876–84.
- Rodrigue, A., Chanal, A., Beck, K., Müller, M., & Wu, L. F. (1999)** Co-translocation of a periplasmic enzyme complex by a hitchhiker mechanism through the bacterial tat pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 274(19), 13223–13228.
- Rodriguez, F., Rouse, S. L., Tait, C. E., Harmer, J., De Riso, A., Timmel, C. R., ... Schnell, J. R. (2013).** Structural model for the protein-translocating element of the twin-arginine transport system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(12), E1092–101.
- Rollauer, S. E., Tarry, M. J., Graham, J. E., Jääskeläinen, M., Jäger, F., Johnson, S., Krehenbrink, M., Liu, S., Lukey, M.J., Marcoux, J., McDowell, M.A., Rodriguez, F., Roversi, P., Stansfeld, P.j., Robinson, C.V., Sansom, M.S.P., Palmer, T., Högbom, M. & Lea, S. M. (2012)** Structure of the TatC core of the twin-arginine protein transport system. *Nature*, 492(7428), 210–4.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001)** *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press (Vol. 59).
- Schägger, H., Cramer, W. A., & Von Jagow, G. (1994)** Analysis of Molecular Masses and Oligomeric States of Protein Complexes by Blue Native Electrophoresis and Isolation of Membrane Protein Complexes by Two-Dimensional Native Electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 217(2), 220–230.
- Schägger, H., & von Jagow, G. (1991)** Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochemistry*, 199(2), 223–231.
- Schatz, G., & Dobberstein, B. (1996)** Common Principles of Protein Translocation Across Membranes. *Science*, 271(5255), 1519–1526.
- Schimper, A. F. W. (1883)** Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und farbkörner. *Bot Zeit*, 41, 105–114.

- Schlesier, R. (2015)** Zum Tat-abhängigen Proteintransport an der Thylakoidmembran: Membraninteraktion, Rezeptorbindung und Translokation des chimären 16/23 Proteins, *Dissertation* (Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg).
- Schlesier, R., & Bernd Klösigen, R. (2015)** C-terminal truncation of a Tat passenger protein affects its membrane translocation by interfering with receptor binding. *Biological Chemistry*, 396(4), 349–357.
- Schönefeld, K. (2010)** Identifizierung der TatA-Sequenz aus *Spinacia oleracea*. *Bachelor-Arbeit* (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg).
- Schünemann, D. (2007)** Mechanisms of protein import into thylakoids of chloroplasts. *Biological Chemistry*, 388(9), 907–915.
- Schünemann, D., Gupta, S., Persello-Cartieaux, F., Klimyuk, V. I., Jones, J. D., Nussaume, L., & Hoffman, N. E. (1998)** A novel signal recognition particle targets light-harvesting proteins to the thylakoid membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(17), 10312–10316.
- Seigneurin-Berny, D., Salvi, D., Joyard, J., & Rolland, N. (2008)** Purification of intact chloroplasts from *Arabidopsis* and spinach leaves by isopycnic centrifugation. *Current Protocols in Cell Biology / Editorial Board, Juan S. Bonifacino ... [et Al.]*, Chapter 3, Unit 3.30.
- Settles, A. M. (1997)** Sec-Independent Protein Translocation by the Maize Hcf106 Protein. *Science*, 278(5342), 1467–1470.
- Stroscher, N. (2014)** Tat dependent transport in *Nicotiana tabacum*. *Bachelorarbeit* (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg).
- Taubert, J., Hou, B., Risselada, H. J., Mehner, D., Lünsdorf, H., Grubmüller, H. & Brüser, T. (2015)** TatBC-Independent TatA/Tat Substrate Interactions Contribute to Transport Efficiency. *PLOS ONE*, 10(3), e0119761.
- Thompson, S. J., Robinson, C., & Mant, A. (1999)** Dual signal peptides mediate the signal recognition particle/Sec-independent insertion of a thylakoid membrane polyprotein, psbY. *Journal of Biological Chemistry*, 274(7), 4059–4066.
- Van den Ent, F., & Löwe, J. (2006)** RF cloning: a restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 67(1), 67–74.
- Von Heijne, G. (1985)**. Signal sequences, The limits of variation. *Journal of Molecular Biology*, 184(1), 99–105.
- Von Heijne, G., Steppuhn, J., & Herrmann, R. G. (1989)** Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 180(3), 535–45.
- Walker, M. B., Roy, L. M., Coleman, E., Voelker, R., & Barkan, A. (1999)** The Maize *tha4* gene functions in Sec-independent protein transport in chloroplasts and is related to *hcf106*, *tatA*, and *tatB*. *Journal of Cell Biology*, 147(2), 267–275.
- Walther, T. H., Gottselig, C., Grage, S. L., Wolf, M., Vargiu, A. V., Klein, M. J., Vollmer, S., Prock, S., Hartmann, M., Afonin, S., Stockwald, E., Heinzmann, H., Nolandt, O. V., Wenzel,**

- W., Ruggerone, P. & Ulrich, A. S. (2013)** Folding and self-assembly of the TatA translocation pore based on a charge zipper mechanism. *Cell*, 152(1-2), 316–326.
- Westermann M., Pop O. I., Gerlach R., Appel T. R., Schlormann W., Schreiber S. and Müller J. P. (2006)** The TatAd component of the *Bacillus subtilis* twin-arginine protein transport system forms homomultimeric complexes in its cytosolic and membrane embedded localisation. *Biochim Biophys Acta* 1758, 443-451
- Young, M. E., Keegstra, K., & Froehlich, J. E. (1999). GTP promotes the formation of early-import intermediates but is not required during the translocation step of protein import into chloroplasts. *Plant Physiology*, 121(1), 237–44.
- Yuan, J., Henry, R., McCaffery, M., & Cline, K. (1994)** SecA homolog in protein transport within chloroplasts: evidence for endosymbiont-derived sorting. *Science (New York, N.Y.)*, 266(5186), 796–798.
- Zhang, Y., Hu, Y., Li, H., & Jin, C. (2014)** Structural basis for TatA oligomerization: An NMR study of *Escherichia coli* TatA dimeric structure. *PLoS ONE*, 9(8).
- Zhang, Y., Wang, L., Hu, Y., & Jin, C. (2014)** Biochimica et Biophysica Acta Solution structure of the TatB component of the twin-arginine translocation system. *BBA - Biomembranes*, 1838(7), 1881–1888.
- Zoufaly, S., Fröbel, J., Rose, P., Flecken, T., Maurer, C., Moser, M., & Müller, M. (2012)** Mapping precursor-binding site on TatC subunit of twin arginine-specific protein translocase by site-specific photo cross-linking. *Journal of Biological Chemistry*, 287(16), 13430–13441.

Die in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse werden zurzeit in einer Publikation zusammengefasst und sollen unter dem Arbeitstitel: „Spinach as an alternative model to study Tat-dependent thylakoid transport“ veröffentlicht werden.

Danksagung

Zum Abschluss dieser Arbeit möchte ich die Gelegenheit nutzen und einigen Leuten danken, die mich sowohl fachlich als auch moralisch im Rahmen dieser Arbeit unterstützt haben.

Zuallererst danke ich meinem Betreuer Rabe Klösigen für die Überlassung des spannenden Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Ich verdanke ihm darüber hinaus jede erdenkliche, hilfreiche Unterstützung und viele anregende Diskussionen. Besonders angenehm waren für mich die ungemeinen Freiheiten bei der Planung und Durchführung der eigenen Experimente und andererseits die Möglichkeit, zu jeder Zeit zusammen die Ergebnisse auszuwerten und neue Ideen zu diskutieren.

Bei Mario möchte ich mich für die durchgängige fachliche Unterstützung und zahlreiche Gedankenaustausche gerade in der finalen Phase der Promotion bedanken. Außerdem danke ich ihm für die Bereitstellung einiger gereinigter Tat-Proteine, die für die hier gezeigten Ergebnisse essentiell waren.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der AG Klösigen danke ich für die tolle und freundliche Arbeitsatmosphäre. Es verging kein Tag an dem ich nicht gerne ins Labor kam. Wir hatten viele spaßige Momente und auch mal den einen oder anderen Plausch. In jeder Hinsicht war die komplette AG sehr hilfsbereit, bei arbeitstechnischen Fragen zu Geräten etc. hatte immer jemand ein offenes Ohr. Auch einige Grillabende, Teichtage oder Filmvorführungen haben mir meine Zeit in dieser Arbeitsgruppe versüßt. Für den Arbeitsalltag werden mir die stets lieb gemeinten Neckereien unserer beiden Renés fehlen. Es war mir eine Freude und jeden Tag ein von Humor getragenes Erlebnis, mit euch beiden zusammen gearbeitet zu haben.

Mein besonderer Dank gilt Julia und Sarah. Ich wusste nicht, dass aus Kollegen so schnell Freunde und Bezugspersonen werden können. Sowohl in privaten Belangen, oder wenn ich wieder einmal abends gegen 18:30 Uhr über wissenschaftlichen Kram philosophieren wollte, ihr wart immer für mich da und habt mich in allen Dingen unterstützt - Danke!

Natürlich möchte ich mich auch bei meinen Freunden und ganz besonders bei meiner Familie bedanken. Die nervenaufreibende Zeit der letzten Monate habt ihr mit mir durchgestanden und mich immer an den richtigen Stellen wieder motiviert und mir neue Kraft gegeben - und das auch wenn meine Arbeit für euch wahrscheinlich ein Buch mit sieben Siegeln bleiben wird.

Zuletzt möchte ich mich bei Alex bedanken. Ich glaube, man kann es nicht in Worte fassen, wieviel Geduld du für mich aufgebracht hast, damit diese Arbeit zu ihrem erfolgreichen Ende gelangt ist. Ich danke dir für deine Liebe, deine Aufmunterungen, deine Schübe in die richtige Richtung und dass ich mich immer auf dich verlassen kann.

Erklärung

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

Mandy Waclawek

Halle (Saale), 30.06.2016

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname: Waclawek, Mandy
Geburtsdatum/-ort: 12.05.1987 / Wolfen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Anschrift: Gabelsbergerstr. 7 / 06114 Halle (Saale)

Ausbildung

06/2011 bis 12/2015 wissenschaftliche Mitarbeiterin, Promotion in der Arbeitsgruppe Prof. Klösgen am Institut für Biologie – Pflanzenphysiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Thema: Spinat als alternatives Modellsystem zur Analyse des Tat-abhängigen Membrantransports von Proteinen

05/2011 Diplom in Biologie, Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Prof. Sawers am Institut für Biologie – Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Thema: Die Reifung der (NiFe) - Hydrogenasen in *Escherichia coli*

10/2006 – 05/2011 Studium der Biologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

07/2006 Abitur

08/1999 – 07/2006 Gymnasium Wolfen-Stadt

08/1997 – 07/1999 Sekundarschule Raguhn

08/1993 – 07/1997 Grundschule Raguhn

Mandy Waclawek

Halle (Saale), den 30.06.2016