

**- Tic62 -
eine neue Untereinheit des
Proteinimportapparates der
Chloroplasten**



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von

Michael Küchler

Kiel
2001

Referent:

Korreferent:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt:

Der Dekan

Summary

The main target of this thesis was the isolation of a core complex of the translocon at the inner chloroplast membrane (Tic-complex) of *Pisum sativum*. This core Tic-complex consists of Tic110, Tic55 and an additional protein with an apparent molecular weight of about 64 kDa. Together with Tic110 and Tic55 this 64 kDa-protein is isolated in distinct fractions by Blue-Native PAGE as well as in density gradient centrifugation. The direct interaction of all three components is also shown by co-immunoprecipitation.

A partial cDNA clone corresponding to the 64 kDa-protein from pea has been isolated. Database searches returned a homologue in *Arabidopsis thaliana* (Accession No. AAC26697). The calculated molecular weight of this *Arabidopsis* protein is 62 kDa, this new Tic component is so-called Tic62. The N-terminus of Tic62 shows high similarity to dehydrogenases. For atTic62 this homology includes a putative NAD⁺/NAD(P)⁺-binding site at the extreme N-terminus.

psTic62 is an integral membrane protein of the inner envelope membrane. The binding of NAD⁺/NAD(P)⁺ of psTic62 is verified by crosslinking experiments. Proteolytic treatment of inner envelope vesicles and immunogold labelling of ultra thin sections of inner envelope vesicles and total pea leaves with antiserum against Tic62 reveal that Tic62 expose a soluble, C-terminal domain into the stroma.

The C-terminal portion of Tic62 contains a plant-specific, repetitive motif of about 20 hydrophobic amino acids. Using the TwoHybrid-System ferredoxin-NAD(P)⁺ oxidoreductase (FNR) was identified as an interacting partner of psTic62. Moreover, biochemical binding assays confirm the specificity of this interaction between psTic62 and FNR. Tic62 is a novel component of the Tic-complex. Binding of NAD⁺/NAD(P)⁺ and the interaction with FNR supports the notion that Tic62 might function in an electron transfer or redox system, which together with the iron-sulfur protein Tic55 might be involved in a redox-controlled regulation of chloroplast protein import.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Botanischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jürgen Soll. Bei Ihm möchte ich mich sowohl für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit in seinem Labor anfertigen zu können, als auch für sein ständiges Interesse am Verlauf der Arbeit.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe sei gedankt für die hilfreichen Gespräche und reichhaltigen Tips, viele amüsante Unterhaltungen jenseits der Arbeit und nicht zuletzt die mannigfachen Einblicke in die menschliche Natur.

Frau Christel Glockmann danke ich für die Durchführung der Immunogoldmarkierungen, der Arbeitsgruppe Klösgen für die Bereitstellung des Antiserums gerichtet gegen die Ferredoxin-NADP+ Oxidoreduktase.

Insbesondere danke ich Lisa für die Betreuung der Laborarbeit, die aufschlußreichen Antworten auf eine Flut von Fragen aus Theorie und Praxis und das insgesamt entspannte Arbeitsklima. Auch Enrico hat durch seine zahlreichen Anregungen und die anhaltende Diskussionsbereitschaft in manch später Stunde im Institut und außerhalb den Enthusiasmus, die Herausforderung und den Spaß an der Forschung in mir wachgehalten.

Und diejenigen, die mein Gefühl bestimmen, bleiben unerwähnt.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL	6
2.1	Enzyme und `Kits`	6
2.2	Chemikalien	6
2.3	Saatgut	6
2.4	Hefestämme	6
2.5	Bakterienstämme	7
2.6	Vektoren	7
2.7	cDNA-Banken	7
2.8	Oligonukleotide	7
2.9	Ausgangsklone	9
2.10	Antiseren	9
2.11	Membranen	9
2.12	Molekulargewichtsstandards und Größenmarker	10
2.13	Säulenmaterialien	10
3	METHODEN	11
3.1	Allgemeine molekular- und mikrobiologische Methoden	11
3.1.1	Anzucht und Transformation von Bakterien	
3.1.2	Allgemeine Klonierungstechniken	
3.1.3	Isolierung von Plasmid-DNA	
3.1.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	
3.1.5	Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA	
3.1.6	Überexpression rekombinanter Proteine	
3.1.7	Aufreinigung rekombinant überexprimierter Proteine	
3.1.8	Sequenzierung von Proteinen und Peptiden	
3.2	Sichtung von cDNA-Banken	13
3.2.1	Sichtung der Uni-ZAP™ cDNA Bank	
3.2.2	Sichtung der HybriZAP™ cDNA Bank	
3.3	Isolierung und Subfraktionierung von Chloroplasten aus Erbse	16

3.4	Allgemeine proteinbiochemische Methoden	16
3.4.1	Bestimmung der Chlorophyllkonzentration	
3.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	
3.4.3	TCA-Präzipitation von Proteinen	
3.5	Verfahren zur Trennung und zum Nachweis von Proteinen und Proteinkomplexen	16
3.5.1	Dichtegradientenzentrifugation	
3.5.2	Blau-Native-Polyacrylamidgelelektrophorese	
3.5.3	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese	
3.5.4	Elektroelution von Proteinen und Proteinkomplexen	
3.5.5	Membrantransfer von Proteinen	
3.5.6	Coomassie Blau-Färbung von Proteinen	
3.5.7	Silberfärbung von Proteinen	
3.5.8	Immundekoration von auf Membranen immobilisierten Proteinen	
3.5.9	Fluorographie von Polyacrylamidgelen	
3.6	Chromatographische Trennverfahren	21
3.6.1	Ni ²⁺ -Affinitätschromatographie	
3.6.2	Abreinigung eines Antiserums	
3.6.3	Molekulargewichtschromatographie / Gelfiltration	
3.7	Herstellung polyklonaler Antiseren	22
3.8	Ausgewählte proteinbiochemische Methoden	22
3.8.1	Immunpräzipitation von Proteinen und Proteinkomplexen	
3.8.2	Durchführung von Quervernetzungsexperimenten	
3.8.3	Anbindung von NAD / NADP an Proteine der Chloroplastenhüllmembranen	
3.8.4	Proteasebehandlung von isolierten inneren Chloroplastenhüllmembranen	
3.8.5	Karbonat- und Harnstoffextraktion von Chloroplastenhüllmembranen	
3.8.6	Extraktion von Thylakoiden	
3.8.7	Bindunsexperimente von psTic62	
3.9	Zellbiologische Methoden der Elektronenmikroskopie	25
3.9.1	Fixierung und Einbettung ausgewählter Präparate	
3.9.2	Ultradünnschichtmikrotomie	
3.9.3	Immundekoration von Ultradünnschnitten	
3.9.4	Durchführung der Elektronenmikroskopie	
3.10	Computergestützte Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen	26

4	ERGEBNISSE	28
4.1	Aufreinigung des Tic-Komplexes der inneren Chloroplastenhüllmembran	28
4.2	Identifizierung und Charakterisierung von Tic62	36
4.2.1	Identifizierung und Primärstrukturanalyse von psTic62	
4.2.2	Sequenzvergleiche von psTic62	
4.2.3	psTic62 ist ein integrales Protein der inneren Chloroplastenhüllmembran	
4.2.4	psTic62 exponiert eine C-terminale Domäne in das Stroma	
4.3	Komplexzugehörigkeit von psTic62	47
4.4	Funktionelle Charakterisierung von psTic62	50
4.4.1	psTic62 bindet NAD / NADP	
4.4.2	psTic62 rekrutiert die Ferredoxin-NADP+ Oxidoreduktase an der inneren Chloroplastenhüllmembran	
5	DISKUSSION	59
5.1	Aufreinigung eines zentralen Tic-Komplexes	59
5.2	Tic62 ist eine neue Komponente des Tic-Komplexes	63
5.3	psTic62 rekrutiert die Ferredoxin-NADP+ Oxidoreduktase an der inneren Chloroplastenhüllmembran	66
6	ZUSAMMENFASSUNG	72
7	LITERATUR	73
8	ANHANG	83
8.1	Abkürzungen	83
8.2	Aminosäuren	85
8.3	Nukleoside und Nukleotide	85
8.4	Einheiten	85
8.5	Größenordnungen	85

1 Einleitung

Chloroplasten sind wie Mitochondrien aus ehemals freilebenden Prokaryoten hervorgegangen (Schwartz and Dayhoff, 1978). Die endosymbiotische Aufnahme eines cyanobakteriellen Vorfahren wird als Ausgangspunkt der evolutiven Entwicklung des Endosymbionten zum Plastiden verstanden. Mehr als 3000 Gene des cyanobakteriellen Vorfahren sind in das Kerngenom transferiert worden oder verlorengegangen (Martin and Herrmann, 1998), denn das Plastidengenom (Plastom) kodiert nur noch für zehn bis 200 Proteine (Sugiura, 1989). Mehr als 2000 der in Plastiden aktiven Proteine sind kernkodiert ('The Arabidopsis Genome Initiative', 2000), werden als Vorstufenproteine an cytosolischen Ribosomen synthetisiert und müssen posttranslational importiert werden (Chua and Schmidt, 1979; Grossmann et al., 1980). Wie Proteine, die in das Endoplasmatische Retikulum (Blobel and Dobberstein, 1975) oder in Mitochondrien (Douglas et al., 1986; Hartl et al., 1989) importiert werden, trägt der überwiegende Teil plastidärer Vorstufenproteine eine N-terminale, abspaltbare Extension (Transitpeptid) als „organellspezifische Zielsteuerung“ (Blobel et al., 1979). Dieses Transitpeptid ist sowohl notwendig als auch ausreichend für den Transport der Proteine zum Plastiden und den Import in das Organell (Keegstra et al., 1989). Dagegen besitzen Proteine der äußeren Chloroplastenhüllmembran (OEP) kein abspaltbares Transitpeptid und werden aufgrund interner Zielsteuerungsinformationen in die Plastiden importiert (Übersichtsartikel: Tien and Soll, 1998) (Abb. 1). Eine Besonderheit plastidärer Vorstufenproteine ist die Phosphorylierung von Serin- oder Threoninresten innerhalb des Transitpeptids (Waegemann and Soll, 1996). Der Import plastidärer Vorstufenproteine wird durch die Bindung an einen „Guidance Komplex“ aus 14-3-3 Proteinen und Hitzeschock-

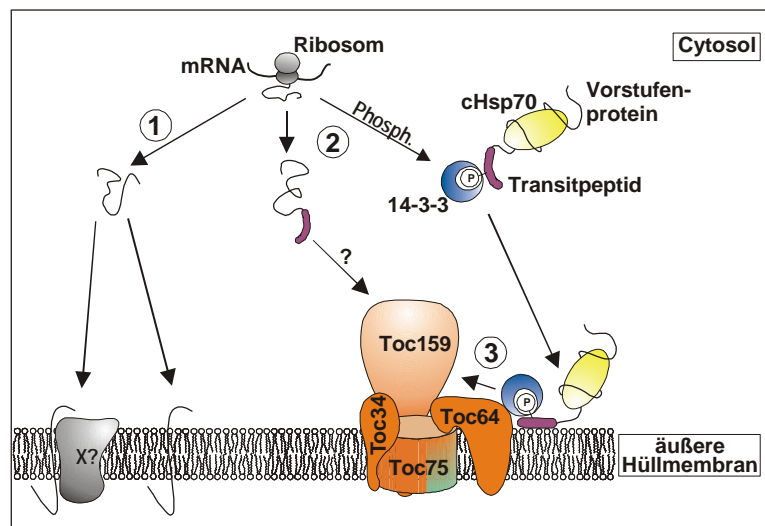


Abb. 1 Modell zu einleitenden Schritten des Proteinimports in Chloroplasten

Proteine der äußeren Hüllmembran inserieren direkt oder unter Assistenz in ihre Zielmembran (①). Der Großteil plastidärer Proteine wird an cytosolischen Ribosomen als Vorstufenprotein synthetisiert (②). Das Vorstufenprotein kann phosphoryliert werden (Phosph.), mit dem Guidance Komplex (14-3-3 Proteine und Hsp70-Isoformen) interagieren und zur Chloroplastenoberfläche geleitet werden. Mit der Übergabe an den Toc-Komplex wird die Translokation des Vorstufenproteins eingeleitet (③).

proteinen der 70 kDa-Klasse (Hsp70) stimuliert (May and Soll, 2000) (Abb. 1). Plastidäre Vorstufenproteine, die ein absplaltbares N-terminales Transitpeptid aufweisen, werden über einen „generellen Importweg“ in den Chloroplasten transportiert (Übersichtsartikel: Schleiff and Soll, 2000). Dabei sind plastidenspezifische Lipide an der Bindung des Vorstufenproteins an die Chloroplastenoberfläche beteiligt (Übersichtsartikel: Bruce, 1998) (Abb. 1). Die erste Interaktion zwischen Vorstufenprotein und Rezeptorkomponenten des Toc-Komplexes (Toc = **T**ranslocon at the **o**uter envelope membrane of **c**hloroplasts) ist zunächst reversibel (Perry and Keegstra, 1994) (Abb. 1). Die meist folgende irreversible Bindung des Vorstufenproteins ist nukleotidabhängig (Ma et al., 1996; Olsen and Keegstra, 1992; Schnell and Blobel, 1993) und erst bei ATP-Konzentrationen von weniger als 5 μ M möglich (Perry and Keegstra, 1994). ATP-Konzentrationen über 100 μ M sind für eine vollständige Translokation des Vorstufenproteins in das Stroma ausreichend (Schindler et al., 1987; Theg et al., 1989).

Für den Translokationsapparat der äußeren Chloroplastenhüllmembran aus Toc86, Toc34 und Toc75 (Abb. 2) ist die Interaktion mit Vorstufenproteinen nach Quervernetzung mehrfach gezeigt (Seedorf et al., 1995; Perry and Keegstra, 1994, Ma et al., 1996; Kouranov and Schnell, 1997; Hinnah et al., 1997). Toc86 ist kürzlich als Degradationsprodukt eines 159kDa-Proteins (Toc159) charakterisiert worden (Bölter et al., 1998; Chen et al., 2000). Die Funktion von Toc86 als Rezeptor ist mit der Hemmung der Anbindung von Vorstufenprotein durch Antikörper gegen Toc86 belegt (Hirsch et al., 1994). In *Arabidopsis thaliana* sind mit atToc132 und atToc120 weitere putative Rezeptorkomponenten identifiziert (Bauer et al., 2000). Als weitere Rezeptorkomponente ist Toc34 charakterisiert (Seedorf et al., 1995; Hirsch et al., 1994; Kessler et al., 1994), dessen Bindung von Vorstufenprotein über einen GTP-GDP-Zyklus reguliert wird (Sveshnikova et al., 2000). Toc75 ist *in vitro* als spannungsabhängiger Translokationskanal des Toc-Komplexes charakterisiert, der eine spezifische Bindungsstelle für Vorstufenproteine trägt (Hinnah et al., 1997). Vor kurzem ist Toc64 als neue Komponente des Toc-Komplexes eingeführt worden. Toc64 enthält drei TPR-Motive (Sohrt and Soll, 2000), die Protein-Protein-Wechselwirkungen vermitteln (Lamb et al., 1995). Toc64 wird als Andockstelle für den „Guidance Komplex“ diskutiert (Sohrt and Soll, 2000) (Abb. 1). Im Verlauf der Translokation durchspannt das Vorstufenprotein beide Hüllmembranen (Schnell and Blobel, 1993; Alefsen et al., 1994). Die Frage, ob ein kontinuierlicher Importapparat über beide Membranen hinweg erst mit der Bindung eines Vorstufenproteins initiiert wird oder permanent besteht, ist offen. Schließlich unterstützen verschiedene Chaperone im Cytosol, Intermembranraum und Stroma den Translokationsprozeß (Übersichtsartikel: Schleiff and Soll, 2000). Hsp100 wird eine mögliche Rolle als

ATP-getriebener Importmotor im Stroma zugedacht (Keegstra and Cline, 1999), während die Funktionen von Hsp70 und Hsp60 noch ungeklärt sind (Nielsen et al. 1997; Kessler and Blobel, 1996). Nach Abschluß der Translokation über die Hüllmembranen erfolgt die Abspaltung des Transitpeptids durch die stromale Prozessierungsprotease (SPP) (Chua and Schmidt, 1978; Richter and Lamppa, 1999) (Abb. 2).

Tic110 ist das erste Protein der inneren Chloroplastenhüllmembran, dessen Beteiligung am Translokationsprozeß durch Co-Immunpräzipitation mit Vorstufenprotein gezeigt werden konnte und welches als allgemein anerkannte Komponente des Tic-Komplexes (Tic =

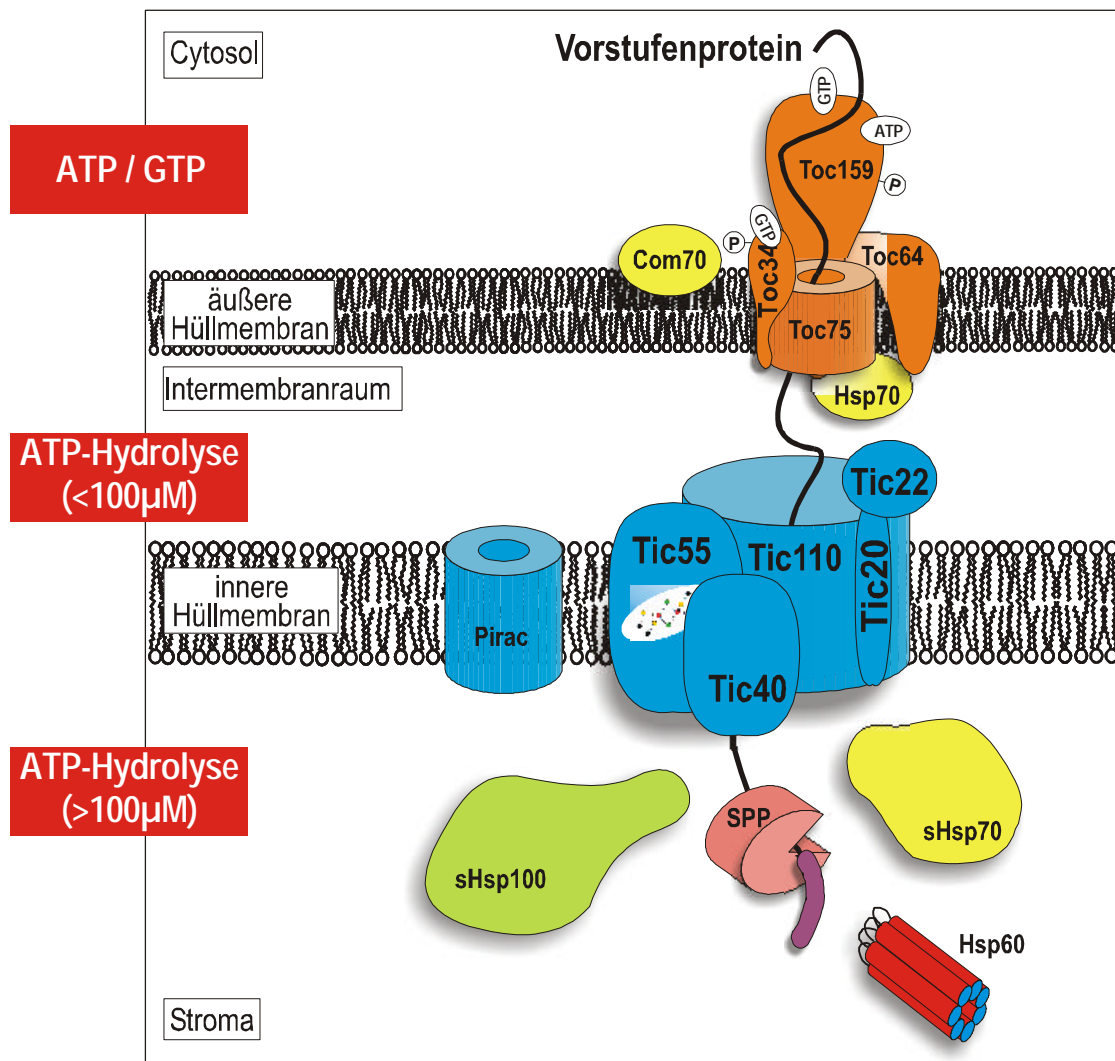


Abb. 2 Schematische Darstellung der plastidären Translokationsmaschinerie

Als Komponenten des Toc-Komplexes werden zur Zeit Toc159, Toc34, Toc75 und Toc64 aufgezählt. Die Bindung von Vorstufenproteinen an Rezeptorkomponenten des Toc-Komplexes ist nukleotidabhängig. Zu den Komponenten des Tic-Komplexes werden Tic110, Tic55, Tic40, Tic22 und Tic20 gerechnet. Mit Com70 (Kourtz and Ko, 1997), mehreren Hsp70-Isoformen, Hsp100 und Hsp60 sind eine Reihe von Chaperonen mit dem plastidären Translokationsapparat assoziiert. Bei ATP-Konzentrationen unter $100\mu\text{M}$ kommt es zur irreversiblen Bindung an den Toc-Komplex, aber erst Konzentrationen über $100\mu\text{M}$ ATP erlauben eine vollständige Translokation des Vorstufenproteins über beide plastidäre Hüllmembranen hinweg. Die stromale Prozessierungsprotease (SPP) entfernt mit dem Eintritt des Proteins in das Stroma das Transitpeptid vom Vorstufenprotein.

Translocon at the **i**nner envelope membrane of **c**hloroplasts) gilt (Lübeck et al., 1996; Akita et al., 1997). Zwei unterschiedliche Topologiemodelle für Tic110 sind entworfen worden. Einerseits kann Tic110 als Kontaktstelle zwischen Tic- und Toc-Komplex fungieren (Kessler and Blobel, 1996; Lübeck et al., 1996; Nielsen et al., 1997), andererseits als Andockstelle für stromale Chaperone (Kouranov and Schnell, 1997; Akita et al., 1997; Jackson et al., 1998). Vier weitere Tic-Komponenten – Tic55, Tic40, Tic22 und Tic20 - sind beschrieben, aber eine einheitliche Vorstellung über ihre Funktion und Zugehörigkeit zum Tic-Komplex ist nicht etabliert, sondern in den meisten Fällen anhand von Primärstrukturanalysen hergeleitet.

Gemeinsam mit Tic110 und Vorstufenprotein wird Tic55 als eine zweite Komponente des Tic-Komplexes aufgereinigt, deren Einbindung in einen Proteinkomplex mit Tic110 auch über Blau-Native-Polyacrylamidgelelektrophorese gezeigt ist (Caliebe et al., 1997). Tic55 trägt ein Rieske-Eisen-Schwefel-Zentrum und eine mononukleäre Eisenbindungsstelle (Caliebe et al., 1997). Diese Domänen sind für die α -Untereinheit bakterieller Oxygenasen charakteristisch, in welchen sie die Hydroxylierung aromatischer Ringe katalysieren (Mason and Cammack, 1992). Auf die physiologische Relevanz von Tic55 für die Translokation von Vorstufenproteinen über die innere Hüllmembran deutet der importhemmende Effekt von Diethylpyrocarbonat (DEPC) hin (Caliebe et al., 1997). Ohnishi und Mitarbeiter (1994) haben die Hemmung des Elektronentransports an Komplex III der mitochondrialen Atmungskette durch DEPC verdeutlicht, welches das Rieske-Eisen-Schwefel-Zentrum in Proteinen modifiziert. Tic40 ist hingegen über seine Interaktion mit Vorstufenprotein in Quervernetzungsversuchen identifiziert worden (Ko et al., 1995); Antikörper gegen Tic40 fällen darüberhinaus Tic110 (Stahl et al., 1999). Eine Mutation im Gen des Chaperons SecA temperatursensitiver Bakterien kann durch die Expression von Tic40 komplementiert werden (Pang et al., 1997). Außerdem zeigt Tic40 Homologien zu sog. Hip-Proteinen (Hip = **H**eat-shock **i**nduced **p**roteins), die für Tic40 auf eine Funktion als Chaperon schließen lassen (Stahl et al., 1999).

Auch Tic22 und Tic20 wurden als Proteine der inneren Hüllmembran identifiziert, die mit dem Vorstufenprotein während der Translokation interagieren (Kouranov and Schnell, 1997). Tic22 ist im Intermembranraum an die innere Hüllmembran assoziiert, während Tic20 als integrales Protein durch Extraktion nicht aus der inneren Hüllmembran herauszulösen ist (Kouranov et al., 1998; Kouranov et al., 1999). Die Aminosäuresequenz von Tic22 zeigt keine Ähnlichkeit mit funktionell charakterisierten Proteinen, aber aufgrund seiner Lokalisierung wird angenommen, daß Tic22 bei der Übergabe des Vorstufenproteins vom Toc- zum Tic-Komplex eine wesentliche Rolle als Chaperon spielen könnte (Kouranov et al.,

1998). Die Membranständigkeit von Tic20 gilt als stärkstes Indiz dafür, daß das Protein als porenbildende Komponente eingeführt werden kann. Sowohl die für Tic22 als auch für Tic20 postulierten Funktionen sind experimentell nicht belegt. Kürzlich ist ein anionen-selektiver Kanal (Pirac) als die bisher fehlende Porenkomponente der inneren Hüllmembran vorgestellt worden(, der auf den maturen Teil von Vorstufenproteinen mit der Änderung seiner Leitfähigkeit reagiert (Dabney-Smith et al., 1999; van den Wijngaard et al., 2000). Es bleibt jedoch unklar, ob und wie ein anionen-selektiver Kanal mit einem Porendurchmesser von nur 6,5Å (van den Wijngaard and Vredenberg, 1999) positiv geladene Vorstufenproteine transloziert.

Verschiedene Arbeitsgruppen präsentierten abweichende Daten zur Zusammensetzung des Tic-Komplexes. Kouranov und Mitarbeiter (1998) haben einen Toc-Tic-Superkomplex aufgereinigt, der auch Tic110, Tic22 und Tic20 enthielt, nicht aber Tic55. Im Gegensatz dazu lassen sich, wie erwähnt, über BN-PAGE zwar Tic110 und Tic55 in einem Komplex isolieren, Tic22 und Tic20 werden jedoch nicht als Komponenten dieses Komplexes gezeigt. Die Aufreinigung von Tic-Komplexen mit unterschiedlicher Zusammensetzung (Kouranov et al., 1998; Caliebe et al., 1997) kann auch als Hinweis auf die Beteiligung mehrerer Tic-Subkomplexe an der Translokation von Vorstufenproteinen über die innere Hüllmembran verstanden werden. In Mitochondrien sind zwei Tim-Subkomplexe etabliert, die jeweils für die Translokation von Matrixproteinen und Proteinen der inneren Membran zuständig sind (Koehler, 2000). Auch beim Proteintransport über das Endoplasmatische Retikulum hinweg sind abhängig von co- oder posttranslationalen Translokationsmechanismen verschiedene Partner mit der porenbildenden Zentraleinheit assembliert (Matlack et al., 1998).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, mit Hilfe biochemischer Methoden die Aufreinigung eines stabilen Tic-Komplexes zu erreichen und möglichst weitere Komponenten zu beschreiben.

2 Material

2.1 Enzyme und `Kits`

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen, Taq-DNA- und RNA-Polymerasen, die T₄-DNA-Ligase als auch die alkalische Phosphatase werden von den Firmen Roche (Mannheim), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Pharmacia (Freiburg) und Quiagen (Hilden) geliefert. PCR-Produkte werden gegebenenfalls aus Agarosegelen mit dem `QUIAquick PCR Purification Kit` der Firma Quiagen (Hilden) oder über `GenElute Agarose Spin Columns` der Firma Sigma (München) aufgereinigt. Plasmid-DNA zur Sequenzierung wird mit Hilfe des `Silica Spin Kit` der Firma Biometra (Göttingen) aufgereinigt und die DNA-Sequenzierung mit dem `Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit` der Firma Perkin Elmer-Applied Biosystems (Foster City, Kanada) durchgeführt.

Thermolysin, Trypsin, DNaseI werden von Roche (Mannheim), RNase von Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden) und USB (Cleveland, USA), Proteinase K von Merck (Darmstadt) und Lysozym von Serva (Heidelberg) bezogen. Zur Immundekoration wird in einzelnen Ansätzen das `Vectastain ABC Kit Alkaline Phosphatase` der Firma Camon (Wiesbaden) eingesetzt.

2.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien werden sämtlichst in höchster Qualität von namhaften Herstellern und die eingesetzten Radiochemikalien (³²P-markiertes NAD⁺) von der Firma NEN Life Science Products (Boston, USA) bezogen.

2.3 Saatgut

Erbsen (*Pisum sativum* L.) der Sorte „Golf“ werden von der Raiffeisen Nord AG (Kiel) bezogen.

2.4 Hefestämme

YRG-2

Stratgene (La Jolla, USA)

(unveröffentlicht)

2.5 Bakterienstämme

BL21(DE3)	Novagen (Madison, USA)	(Studier and Moffat, 1986)
DH5?	GibcoBRL (Eggenstein)	(Woodcock et al., 1989)
SOLR	Stratagene (La Jolla, USA)	(unveröffentlicht)
XL1-blue MRF'	Stratagene (La Jolla, USA)	(Bullock et al., 1977)

2.6 Vektoren

pBlueskript [®] II SK ⁺	Stratagene (La Jolla, USA)	(Short et al., 1988)
pET21d	Stratagene (La Jolla, USA)	(Studier and Moffat, 1986)
pBD	Stratagene (La Jolla, USA)	(unveröffentlicht)

2.7 cDNA-Banken

Sowohl die 'Uni-ZapTMXR custom cDNA Bank' als auch die verwendete 'HybriZAPTM Two-Hybrid cDNA Bank' wurden von der Firma Stratagene (La Jolla, USA) geliefert. Die für die Anfertigung der cDNA-Banken benötigte poly(A)⁺-RNA wurde von Herrn Dr. Norbert Wedel aus den Blättern 8 Tage alter unter Licht/Dunkel-Rhythmus (14/10h) angezogener Erbsen (*Pisum sativum* L.) der Sorte „Golf“ isoliert.

2.8 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide werden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) bezogen:

5'-Digoxigenin-markiertes Oligonukleotid zur Sichtung einer cDNA-Bank:

```
Scr64      5'-AA(AG)GC(AGCT)GA(AG)GA(AG)CA(AG)CA(CT)(CT)T
                                         (AGCT)CA(CT)GA-3'
```

Oligonukleotide, die zur Sequenzierung des cDNA-Klons 3935 verwendet werden:

```
3935seq1    5'-TGGAGAAGGCAGATCAAATTGG-3'
3935seq2    5'-CCTCCTGCATCACCATCACCTTC-3'
3935seq3    5'-GGCATGGAGAGGCCGACTGACG-3'
```

3935seq1rev 5'-CACTATTGTATATGGAATTCCAC-3'
 3935seq2rev 5'-CGGAGATGGTGAAGTAGGAGGC-3'
 3935seq3rev 5'-GAAGGTGATGGTGTATGCAGGAGG-3'

Oligonukleotide, die zur Subklonierung von psTic62 in pBD-Vektor verwendet werden:

TH1-EcoRI 5'-TTCCTTGAATTCGCATTGCTAGCAAGTGGCATTTC-3'
 TH1-SalI 5'-CATAAGCGGTATAGTCGACAAGTGGCTG-3'
 TH2-EcoRI 5'-GTGAGACCTGAATTCATGGAGAGG-3'
 TH2-SalI 5'-CTCCTTCCCGTCGACGGAAGATGTTG-3'
 TH3-EcoRI 5'-CCTTCGCCAGAATTCGTACAGAAAGC-3'
 TH3-SalI 5'-CCATAGGCTGGAGGGTCGACCTAGG-3'

Oligonukleotide, die zur Subklonierung von psTic62 in pET 21d-Vektor verwendet werden:

AK60-NcoI 5'-TGGCGACCATGGAACAGCCACTTTCTCC-3'
 AK60-XhoI 5'-TGGCCTCTCGAGTGGTTCATGAAGGTGC-3'
 IA1-NcoI 5'-TTCCTTCCATTGGCATTGCTAGCAAGTGGCATTTC-3'
 IA1-XhoI 5'-CATAAGCGGTATACTCGAGAAGTGGCTG-3'
 IA2-NcoI 5'-CTGGTGCCATGGAGAGGCCG-3'
 IA2-XhoI 5'-CTCCTTCCCCTCGAGGGAAGATGTTG-3'
 IA3-NcoI 5'-CCTTCGCCACCATGGTACAGAAAGC-3'
 IA3-XhoI 5'-GCTGGAGGCAGCTCGAGGGATTTTCTG-3'

Oligonukleotide, die zur Sequenzierung des cDNA-Klons der Ferredoxin-NADP⁺ Oxidoreduktase verwendet werden:

FNRseq1 5'-ATGGCTGCTGCAGTAACAGCC-3'
 FNRseq1rev 5'-TCAGTAAACTTCAACATGCCATTG-3'

Entsprechende Standard-Oligonukleotide zu den Vektoren pBlueskript[®] II SK⁺, pET21d, pBD und pAD sind nicht explizit aufgeführt.

2.9 Ausgangsklone

pBD-Tic110 [1]	partieller Sequenzabschnitt (AS38-AS996) von Tic110 in pBD-Vektor
pBD-Tic110 [2]	partieller Sequenzabschnitt (AS38-AS270) von Tic110 in pBD-Vektor
pBD-Tic110 [3]	partieller Sequenzabschnitt (AS38-AS559) von Tic110 in pBD-Vektor
pBD-Tic110 [4]	partieller Sequenzabschnitt (AS270-AS559) von Tic110 in pBD-Vektor
pBD-Tic110 [5]	partieller Sequenzabschnitt (AS270-AS996) von Tic110 in pBD-Vektor
pBD-Toc12	Vollängensequenz von Toc12 (AS1 – AS103) in pBD-Vektor

2.10 Antiseren

α Tic110	(AG Soll)	α Tic55	(AG Soll)
α Tic40	(AG Soll)	α atTic22	(AG Soll)
α Tic62	(AG Soll)	α Toc34	(AG Soll)
α SSU	(AG Soll)	α LHCP	(AG Soll)
α LSU	(AG Soll)	α FNR	(AG Klösgen)

Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-AP-Konjugat	Sigma (Deisenhofen)
Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-Biotin-Konjugat	Sigma (Deisenhofen)
Schaf-Anti-DIG-Fab-AP-Konjugat	Roche (Mannheim)
Protein A G10 Auroprobe EM10 nm Gold	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)

2.11 Membranen

Nitrozellulose-Membranen (Protran BA-S83, 0,2 μ m) werden von der Firma Schleicher & Schüll (Dassel), PVDF-Membranen (HybondTM-PVDF) von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) geliefert. Die zum Transfer von für die Mikrosequenzierung vorgesehenen Proteinen verwendeten PVDF-Membranen (Immobilon-P) werden von der Firma Millipore (Eschborn) bezogen.

2.12 Molekulargewichtsstandards und Größenmarker

Für die denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese werden der 'MW-SDS-700L Kit' der Firma Sigma (München) als Molekulargewichtsstandard eingesetzt. Als Eichprotein zur Größenbestimmung innerhalb der Blau-Nativen-Polyacrylamidgelelektrophorese findet Katalase (Roche, Mannheim) Verwendung. Als Größenmarker bei der Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren dient EcoRI/HindIII restringierte DNA des Phagen λ (MBI Fermentas, St. Leon-Rot). Zur Kalibrierung der für die Gelfiltration (3.6.3) verwendeten Chromatographiesäulen (Sephacryl S-400 HR) werden Chymotrypsin (M = 25 kDa), Aldolase (M = 158 kDa) und Thyroglobulin (M = 669 kDa) eingesetzt. Die Kalibrierungsproteine werden von der Firma Roche (Mannheim) bezogen.

2.13 Säulenmaterialien

Die Aufreinigung rekombinanter Proteine mit einem Histidin₆-Rest erfolgt über Affinitätschromatographie mit 'Ni-NTA-Agarose' von Quiagen (Hilden) oder alternativ mit 'Talon Metal Affinity Resin' von Clontech (Paolo Alto, USA). Für Immunpräzipitationsexperimente wird die 'Protein-A-Sepharose-CL-4B' von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) eingesetzt. Das für die molekulargewichtschromatographischen Untersuchungen genutzte Säulenmaterial Sephacryl S-400 HR als auch die Matrix aus CNBr-Sepharose-4B zur Abreinigung von Antiserum gegen psTic62 gegen Thylakoidproteine werden ebenfalls von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen.

3 Methoden

3.1 Allgemeine molekular- und mikrobiologische Methoden

3.1.1 Anzucht und Transformation von Bakterien

Die Anzucht, die Transformation von Bakterien und das Anlegen von Stammkulturen wird nach Sambrook und Mitarbeitern (1989) durchgeführt. Die Herstellung transformationskompetenter Zellen von *Escherichia coli* DH5 α und BL21(DE3) erfolgt nach Hanahan (1985).

3.1.2 Allgemeine Klonierungstechniken

Allgemeine molekularbiologische Methoden wie die Phenol-Chloroform-Extraktion, die Präzipitation mit Ethanol oder Isopropanol, die Restriktion von Plasmid-DNA und PCR-Produkten und die Dephosphorylierung linearisierter DNA, die Ligation und die Agarosegelelektrophorese von DNA, die Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen sowie die Isolierung von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgen nach Sambrook und Mitarbeitern (1989).

Die Authentizität der Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion (3.1.4) wird nach erfolgter Subklonierung durch DNA-Sequenzierung (3.1.5) überprüft.

3.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA zur Restriktionsanalyse oder weiteren Subklonierung wird entweder nach der 'rapid boiling'-Methode von Holmes und Quigley (1981) oder nach Birnboim und Doly (1979) durchgeführt. Die zur Sequenzierung eingesetzte Plasmid-DNA wird durch Phenol-Chloroform-Extraktion und zusätzlich über einen CsCl₂-Gradienten gereinigt (Sambrook et al., 1989) oder direkt mit Hilfe des 'Silica-Spin-Kit' von Biometra (Göttingen) isoliert.

3.1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Einführung geeigneter Schnittstellen in die für die Subklonierung ausgewählten DNA-Fragmente wird die Polymerasekettenreaktion unter Verwendung der in 2.8 aufgeführten Oligonukleotide eingesetzt (Saiki et al., 1988; Higushi, 1990). Die standardisierte PCR erfolgt in einem 100µl-Reaktionsansatz unter folgenden Bedingungen: 1-2 U thermostabile DNA-Taq-Polymerase, je 50-125µM dNTPs, 100pmol der entsprechenden Oligonukleotide, 10-100ng der zu amplifizierenden Plasmid-DNA als Matrize. Die Pufferbedingungen werden nach Angaben des Herstellers der DNA-Taq-Polymerase eingestellt. Die Amplifikation erfolgt in 30-40 Zyklen für je 60sec bei 94°C zur Denaturierung der Plasmid-DNA, 30sec bei 42-58°C zur Hybridisierung der Oligonukleotide mit der Matrize und je nach Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments 60-180sec bei 68-72°C zur Synthese der DNA. Die Amplifikation wird mit 10% des PCR-Ansatzes mittels Agarosegelelektrophorese (3.1.2) analysiert.

3.1.5 Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA

Zur Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA nach der Cycle-Sequencing-Methode wird der 'BigDye Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit' der Firma Perkin Elmer-Applied Biosystems (Foster City, Kanada) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die Auftrennung mittels Kapillarelektrophorese und Analyse der Reaktionsansätze erfolgt im 'ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser' von Perkin Elmer (Weiterstadt).

3.1.6 Überexpression rekombinanter Proteine

Die Überexpression aller verwendeten rekombinanten Proteine erfolgt im pET-System und wird nach Herstellerangaben (Stratagene, La Jolla, USA) in dem *Escherichia coli*-Expressionsstamm BL21(DE3) (Novagen, Madison/USA) durchgeführt. Als Medium wird M9ZB (Sambrook et al., 1989) und als Selektionsantibiotikum Ampicillin (c = 40µg/ml) eingesetzt.

3.1.7 Aufreinigung rekombinant überexprimierter Proteine

Nach Anzucht und Überexpression werden die Bakterien durch Zentrifugation (10min / 5000xg) sedimentiert. Das Bakterienpellet wird in Lysispuffer (25mM Tris/HCl, pH 7,5 / 1mM EDTA / 25% [w/v] Saccharose) resuspendiert. Alternativ zum enzymatischen Zellaufschluß mit Lysozym werden die Bakterienzellen in einer `French Press` bei 1200psi aufgeschlossen. Die DNA kann anschließend durch Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier) zerkleinert werden. Für Protein, das als Proteineinschlußkörper (`inclusionbodies`) aufzureinigen ist, wird entsprechend dem Protokoll von Paulsen und Mitarbeitern (1990) weiterverfahren. Löslich exprimiertes Protein kann durch Zentrifugation (30min / 20000xg) von dem unlöslichen Sediment getrennt werden. Alle in dieser Arbeit eingesetzten überexprimierten Proteine enthalten einen C-terminalen Histidin₆-Rest und können somit über Ni²⁺-Affinitätschromatographie (3.6.1) aufgereinigt werden.

3.1.8 Sequenzierung von Proteinen und Peptiden

Die N-terminale Sequenzierung von Proteinen und Peptiden erfolgt durch Mikrosequenzierung nach Edman und Begg (1967). Die Sequenzierungen, der proteolytische Verdau von Proteinen, die Aufreinigung von Peptiden und deren Sequenzierung werden extern (Fa. Toplab, Martinsried) durchgeführt.

3.2 Sichtung von cDNA-Banken

3.2.1 Sichtung der Uni-ZAPTM cDNA Bank

Die Sichtung der Uni-ZAPTM cDNA Bank mit DIG-markierten DNA-Sonden erfolgt nach Benton und Davies (1977). Es wird eine Übernachtskultur des *E. coli*-Stammes XL1-blue MRF' angezogen und 300µl dieser Übernachtskultur werden eingesetzt, um 30ml LBM-Medium (1% [w/v] Caseinhydrolysat / 0,5% [w/v] Hefeextrakt / 1% [w/v] NaCl / 0,4% [w/v] Maltose) zu beimpfen und 5h bei 37°C zu inkubieren. Die Bakterien werden durch Zentrifugation für 5min bei 200xg sedimentiert und in 3ml SM-Medium (50mM Tris/HCl, pH 7,5 / 100mM NaCl / 10mM MgSO₄) resuspendiert. In dem folgenden Transfektionsansatz werden 150µl dieser Suspension mit 1,25x10⁵pfu und 350µl SM-Medium gemischt. Die Adsorption der Phagen erfolgt bei Inkubation für 15min bei 37°C. Anschließend wird der

Ansatz in 30ml vortemperierter (55°C) BBL-Top-Agarose (1% [w/v] Caseinhydrolysat / 50mM NaCl / 10mM MgCl₂ / 0,65% [w/v] Agarose) aufgenommen, auf einer 30x18 cm² BBL-Platte (1% [w/v] Caseinhydrolysat / 50mM NaCl / 1,2% [w/v] Bacto-Agar) ausplattiert und die Platten solange bei 37°C inkubiert, bis die Plaques mit bis zu 2mm Durchmesser deutlich sichtbar werden. Insgesamt werden 5x10⁵ pfu ausplattiert.

Durch Filterabzüge wird die DNA auf Nitrozellulosemembranen transferiert (2 Abzüge pro Platte), die Filter zur Denaturierung der DNA für 2min in 0,2M NaOH / 1,5M NaCl und anschließend zur Neutralisierung mit 0,4M Tris, pH 7,6 / 0,3M NaCl / 0,02M Na₃-Citrat inkubiert. Abschließend werden die Filter in 0,3M NaCl und 0,02M Na₃-Citrat entsalzt und schließlich die DNA durch UV-Vernetzung (UVC 500 UV Crosslinker, Hoefer Pharmacia Biotech, USA) auf der Membran fixiert. Es folgt eine Vorhybridisierung der Membranen durch Inkubation in Hybridisierungslösung (750mM NaCl / 75mM Na₃-Citrat / 0,1% [w/v] Laurylsarcosinat / 2,5% [w/v] Magermilchpulver) im Verhältnis 20ml pro 100cm² Membranfläche für 1-2h bei der auch für die folgende Sondenhybridisierung gewählten Temperatur. Anschließend erfolgt die eigentliche Hybridisierung über Nacht bei 45-65°C unter steter Zirkulation der Inkubationsröhren im Hybridisierungssofen (Mini Hybridisierungssofen, Appligene, USA). In diesem Schritt werden 2,5ml Hybridisierungslösung pro 100cm² Membranfläche eingesetzt. Die Hybridisierungslösung enthält 0,25 pmol/cm² einer DIG-markierten DNA-Sonde (degeneriertes Oligo, hitzedenaturierte DNA-Sonde). Durch je zweimaliges Waschen für 5min bei Raumtemperatur in Waschlösung I (0,3M NaCl / 0,03M Na₃-Citrat / 0,1% [w/v] SDS) und 15min Inkubation in Waschlösung II (0,03M NaCl / 0,003M Na₃-Citrat / 0,1% [w/v] SDS) bei der zuvor gewählten Hybridisierungstemperatur wird der nicht spezifisch gebundene Sondenanteil entfernt. Die Membran wird nun in Fabpuffer (0,1M Maleinsäure, pH 7,5 / 0,15M NaCl / 0,3% [w/v] Tween20) für 5min äquilibriert, anschließend für 30min in Blockpuffer (0,1M Maleinsäure, pH 7,5 / 0,15M NaCl / 2,5% [w/v] Magermilchpulver) abgesättigt und dann in Blockpuffer mit Schaf-Anti-DIG-Fab-AP-Konjugat nach Herstellerangaben (Roche, Mannheim) für 1h inkubiert. Vor der Detektion wird die Membran nochmals für zweimal 15min in Fabpuffer gespült. Die Detektion der Spots von DIG-markierter DNA-Sonde erfolgt in Färbelösung (100mM Tris/HCl, pH 9,5 / 100mM NaCl / 5mM MgCl₂ / 0,035% [w/v] NBT / 0,0175% [w/v] BCIP). Plaques mit positiven Signalen werden replattiert. Vereinzelte Plaques werden durch Inkubation in 100µl SM-Medium eluiert und zur *In-Vivo*-Exzision eingesetzt. Die *In-Vivo*-Exzision erfolgt nach Angaben des Herstellers unter Einsatz des Helferphagen ExAssist™ (Stratagene, La Jolla, USA). Zur Analyse der positiven Klone werden die Plasmide sequenziert (3.1.5).

3.2.2 Sichtung der HybriZAP™ cDNA Bank

Das „Zwei-Komponenten“-System – für Hefe entwickelt von Fields und Song (1989) – stellt ein genetisches System zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen dar und nutzt die Eigenschaften des Gal4-Proteins aus *Saccharomyces cerevisiae*. Dieser Transkriptionsfaktor besteht aus zwei Domänen. Die N-terminale Domäne ist für die Bindung an spezifische DNA-Sequenzen verantwortlich, während die C-terminale Domäne für Aktivierung der Transkription essentiell ist. In dem „Zwei-Komponenten“-System sind die kodierenden Sequenzen beider Domänen in unterschiedlichen Vektoren lokalisiert. Bei positivem Verlauf des Assays werden die beiden verschiedenen Vektoren in Hefe co-transformiert, die jeweiligen Zielproteine einerseits mit der DNA-bindenden Domäne, andererseits mit der aktivierenden Domäne des Gal4-Proteins exprimiert. Nur wenn die beiden Fusionsproteine miteinander interagieren, kommen auch die beiden Gal4-Domänen in räumliche Nähe zueinander, wodurch die Expression u.a. der β -Galaktosidase eingeleitet werden kann. In einem Filter-Lift-Assay können einzelne Kolonien auf die Expression der β -Galaktosidase hin durch Inkubation mit X-Gal getestet werden. Eine Blaufärbung des Koloniespots ist als Folge der Interaktion zwischen den eingesetzten Zielproteinen zu interpretieren. Die vor der Sichtung nötige Amplifikation des ExAssist™ Helferphagen und die anschließende Bestimmung des Phagentiters wird von Brigitte Paap durchgeführt. Die Massenexzision und Amplifikation der HybriZAP™ Two Hybrid cDNA Bank erfolgt in allen Schritten nach Angaben des Herstellers. Auch die Interaktionssichtung wird in allen Schritten entsprechend den Protokollangaben des Herstellers durchgeführt. Im einzelnen wird zur Interaktionssichtung ein Aliquot hochkompetenter Hefezellen mit der entsprechenden Menge an dem ausgewählten pBD-Konstrukt als Zielprotein und der pAD-Plasmid-cDNA-Bank co-transformiert und auf Minimalmedium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin plattiert. Nach 3-4d Inkubation bei 30°C wird ein Filter-Lift-Assay mit anschließendem Test auf β -Galaktosidaseaktivität durchgeführt. Positive Klone werden replattiert und nach erneutem Filter-Lift-Assay der vereinzelt Klone werden die entsprechenden pAD-Plasmide isoliert. In einer weiteren Verifikationsrunde werden die als positiv identifizierten pAD-Klone mit einer Auswahl von Kontrollplasmiden und den ausgewählten pBD-Konstrukten co-transformiert und auf Protein-Protein-Interaktion hin analysiert. Im Unterschied zu den Angaben im Herstellerprotokoll werden auch die Ansätze der Kontrolltransformationen auf Minimalmedium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin plattiert.

3.3 Isolierung und Subfraktionierung von Chloroplasten aus Erbse

Die Anzucht der Erbsen als Ausgangsmaterial erfolgt in den Monaten Mai bis Oktober im Freiland, von November bis April im Gewächshaus. Die Isolierung äußerer und innerer Hüllmembranen von Chloroplasten aus Erbse wird nach der Methode von Keegstra und Youssif (1986) durchgeführt. Modifikationen dieses ursprünglichen Protokolls sind durch Waegemann und Mitarbeiter (1992) beschrieben.

3.4 Allgemeine proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Bestimmung der Chlorophyllkonzentration

Die Bestimmung des Chlorophyllgehalts von Chloroplasten- oder Thylakoidsuspensionen erfolgt nach Arnon (1949).

3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung des Proteingehalts wird entsprechend der Methode von Lowry (1951) oder mit Hilfe des Bradford-Protein-Assays (Biorad, USA) durchgeführt (Bradford, 1976).

3.4.3 TCA-Präzipitation von Proteinen

Proteine in wässrigen Lösungen werden durch Zugabe von Trichloressigsäure (Endkonzentration 10% [w/v]) und Inkubation für 30min auf Eis präzipitiert und durch anschließende Zentrifugation (30min / 15000xg) sedimentiert. Das resultierende Sediment wird gegebenenfalls mit 0,5M Na₂CO₃ oder 1M Tris-Base neutralisiert.

3.5 Verfahren zur Trennung und zum Nachweis von Proteinen und Proteinkomplexen

3.5.1 Dichtegradientenzentrifugation

Innere Chloroplastenhüllmembranen (~200µg Protein) werden sedimentiert (165000xg / 10min / 4°C), in 100µl Solubilisierungspuffer (25mM Hepes/NaOH, pH 7,6 / 50mM

Aminohexansäure / 1,3-3% n-Decylmaltosid) resuspendiert und auf den Saccharosegradienten aufgetragen. Verwendet wird ein linearer Gradient von 5-20% Saccharose in 25mM HEPES/NaOH, pH7,6 / 0,13-0,3% n-Decylmaltosid. Die Trennung der solubilisierten Proteinkomplexe erfolgt durch Zentrifugation für 4h bei 312000xg und 12°C. Die Fraktionierung des Gradienten erfolgt in 200µl-Aliquots. Eine Analyse der Fraktionierung nach SDS-PAGE (3.5.3) kann mit Hilfe der Silberfärbung (3.5.7) oder des Westerntransfers (3.5.5) und anschließender Immundetektion (3.5.8) durchgeführt werden.

3.5.2 Blau-Native-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinkomplexen der inneren Chloroplastenhüllmembran wird die Blau-Native-Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE) in modifizierter Form nach der Methode von Schagger und Jagow (1991) und Schagger und Mitarbeitern (1994) eingesetzt. Es werden diskontinuierliche Polyacrylamidgele mit einem Gradienten von 6,5-12% Acrylamid in Geldimensionen von 14x12x1,5cm³ eingesetzt. Die Probenvorbereitung startet mit der Zentrifugation (165000xg / 10min / 4°C) von aufgereinigten Vesikeln der inneren Chloroplastenhüllmembran (~200µg Protein). Im nächsten Arbeitsschritt wird das Membranpellet in 100µl BN-Solubilisierungspuffer (200mM Aminohexansäure / 40mM Bis-Tris, pH 7,0 / 1,3-3% n-Decylmaltosid) resuspendiert und solubilisiert. Der folgende Zentrifugationsschritt (100000xg / 10min / 4°C) trennt nicht-solubilisiertes Material und Proteinaggregate ab. Der Überstand (100µl) wird mit 10µl BN-Probenpuffer (5% [w/v] Coomassie Brilliant Blau G250) versetzt. Die Elektrophorese (Kathodenpuffer: 50mM Tricin / 15mM Bis-Tris, pH 7,0 / 0,2% [w/v] Coomassie Brilliant Blau G250 ; Anodenpuffer: 50mM Bis-Tris, pH7,0) findet bei 4°C statt.

Der Probeneinlauf wird bei 100V durchgeführt, nach 60-90min wird der Gellauf mit 15mA fortgesetzt und bei Erreichen einer Feldspannung von 500V beendet. Zum Nachweis oder der Identifikation von Proteinen und Proteinkomplexen können sich die Coomassie Blau-Färbung (3.5.6) oder der Membrantransfer (3.5.5) und die Immundetektion (3.5.8) anschließen. Einzelne Proteinkomplexe können mittels der Elektroelution (3.5.4) in weitere Untersuchungen eingehen oder in Form von ausgeschnittenen Gelbändern oder vollständigen BN-Spuren in einer anschließenden denaturierenden Geldimension analysiert werden (3.5.3).

3.5.3 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgt im denaturierenden Gelsystem der Glycin-SDS-PAGE nach Laemmli (1970) oder über Tricin-SDS-PAGE nach Schägger und Jagow (1987). Im ersten Fall liegt im Sammelgel stets eine Acrylamidkonzentration von 5% vor, in den Trenngelen variiert die Acrylamidkonzentration je nach Anwendung zwischen 7,5% und 15%. Die eingesetzten Acrylamidkonzentrationen in Sammel- und Trenngelen bei der Tricin-SDS-PAGE entsprechen den Konditionen der Glycin-SDS-PAGE. Zu Lasten des Trenngels kann ein 10%iges Zwischengel integriert werden.

3.5.4 Elektroelution von Proteinen und Proteinkomplexen

Zur Anreicherung von Proteinen und Proteinkomplexen, die zuvor in einem gelelektrophoretischen System getrennt worden sind, wird die Elektroelution in einem Elektro-Eluter/Concentrator der Fa. CBS Scientific Co. (Del Mar, USA) genutzt. Außerdem können Proteine und Proteinkomplexe mittels der Elektroelution von der Gelmatrix getrennt werden und somit in weitere Untersuchungen eingehen. Ausgewählte Proteinbanden werden aus präparativen Gelen ausgeschnitten. Sollen Proteine oder Proteinkomplexe unter nativen Bedingungen elektroeluiert werden, wird ein SDS-freier Elutionspuffer I (25mM Tricin / 7,5mM Bis-Tris, pH7,0 / 0,1mM PMSF) verwendet. Alle verwendeten Materialteile, die in direkten Kontakt mit der Proteinlösung kommen, werden in Absättigungspuffer (Elutionspuffer I / 1% Ethanolamin) gespült. Erfolgt eine Elution aus SDS-Gelstücken, wird entweder Elutionspuffer I zusätzlich mit 0,05% SDS versetzt oder Elutionspuffer II (96mM Glycin / 12,5mM Tris / 0,5% [w/v] SDS) eingesetzt. Die Elektroelution erfolgt entweder bei 150V für 16h bei 4°C, wenn unter nativen Bedingungen eluiert werden soll, ansonsten fakultativ bei 20-30mA für 6-8h bzw. bei 10mA und 4°C über Nacht.

3.5.5 Membrantransfer von Proteinen

Elektrophoretisch in Polyacrylamidgelen aufgetrennte Proteine werden nach Towbin und Mitarbeitern (1979) auf Nitrozellulosefilter oder PVDF-Membranen transferiert (Westerntransfer). Mit der „semi-dry-electroblotting“-Apparatur nach Kyhse-Anderson (1984) und dem Naßblot werden zwei unterschiedliche Verfahren verwendet. Der Naßblot erfolgt für SDS-Polyacrylamidgele in Transferpuffer (20mM Tris / 150mM Glycin / 20%

Methanol) in einem Puffertank (Trans Blot Cell, 18 x 24 x 9,5 cm³, Elektrodenabstand 8cm, Biorad, USA). Der Transfer wird bei 300-400mA für 2-4h durchgeführt. Sollen im Naßblotverfahren Proteine für eine anschließende Mikrosequenzierung auf PVDF-Membran transferiert werden, wird ein modifizierter Transferpuffer (20mM Tris/HCl, pH 8,0 / 20% Methanol) verwendet.

Der Transfer von Proteinen und Proteinkomplexen aus Blau Nativen-Polyacrylamidgelen auf PVDF-Membran wird mit der „semi-dry-electroblotting“-Apparatur (Kyhse-Anderson, 1984) nach Dekker und Mitarbeitern (1996) (Puffersystem: 20mM Tris, pH 8,5 / 150mM Glycin / 0,08% [w/v] SDS) für 1h oder im Naßblotverfahren (Transferpuffer: 20mM Tris / 150mM Glycin / 20% Methanol / 0,05% [w/v] SDS) durchgeführt. In beiden Fällen erfolgt zuvor ein Vorblot auf Nitrozellulosefilter für 20min, um überschüssiges Coomassie Blau zu entfernen. Der Transfer im Naßblotverfahren erfolgt für 6h bei 200mA oder bei 120mA über Nacht bei 4°C.

3.5.6 Coomassie Blau-Färbung von Proteinen

Die Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen durch Coomassie Blau R250 erfolgt mit der Inkubation des Geles für 20min in der Färbelösung (50% [v/v] Methanol / 7% [v/v] Essigsäure / 0,18% [w/v] Coomassie Brillant Blau R250). Zur Entfärbung des Gelhintergrundes werden die Gele in Entfärbelösung (40% [v/v] Methanol / 7% [v/v] Essigsäure / 3% [v/v] Glycerin) gewaschen.

Die zur Sequenzierung bestimmten Proteine, die gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf PVDF-Membran transferiert worden sind, werden anschließend durch Inkubation der Membran in 50% [v/v] Methanol / 7% [v/v] Essigsäure / 0,18% [w/v] Coomassie Brillant Blau G250 angefärbt, der Blot anschließend in Entfärbelösung (s.o.) gewaschen.

3.5.7 Silberfärbung von Proteinen

Der Silberfärbung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen geht zur Fixierung der Proteine eine Inkubation des Geles in 40% [v/v] Methanol / 7% [v/v] Essigsäure / 3% [v/v] Glycerin für mindestens eine Stunde voraus. Die weiteren Färbeverfahren sind alternativ durch Blum und Mitarbeiter (1987) und Ansorge und Mitarbeiter (1985) beschrieben.

3.5.8 Immundekoration von auf Membranen immobilisierten Proteinen

Gelelektrophoretisch aufgetrennte und auf Membran transferierte Proteine können durch Immundekoration mit spezifischen Antisera und anschließender Farbreaktion nachgewiesen werden. Als Größenstandard verwendete Markerproteine können direkt nach dem Membrantransfer mit Ponceau S gefärbt werden, indem die Membran für 3min in 0,3% [w/v] Ponceau S / 1% Essigsäure geschwächt wird. Vor der Inkubation der Membran mit dem gewählten Antiserum werden die freien Bindungsstellen durch dreimaliges Waschen der Membran für je 10min in TTBS (100mM Tris, pH 7,4 / 150mM NaCl / 0,01% [w/v] Tween 20) oder MAMIPU (100mM Tris, pH 7,4 / 150mM NaCl / 0,03-0,1% [w/v] BSA / 0,3-3% [w/v] Magermilchpulver) abgesättigt. Die Inkubation mit dem Antiserum erfolgt anschließend bei geeigneter Verdünnung in dem entsprechenden Puffer für mindestens 90min oder bei 4°C über Nacht. Nach weiterem Waschen der Membran mit dem zuvor verwendeten Puffer für dreimalig 10min erfolgt die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-AP-Konjugat der Fa. Sigma, Deisenhofen) für mindestens 60min. Anschließend wird die Membran wiederum dreimal für 10min in den genannten Puffern gewaschen, schließlich in Färbepuffer (100mM Tris, pH 9,5 / 100mM NaCl / 5mM MgCl₂) kurz äquilibriert und die Färbung mit 0,035% [w/v] NBT und 0,017% [w/v] BCIP in Färbepuffer durchgeführt, bis die gewünschte Farbtintensität erreicht ist. Durch Waschen der Membran in Wasser wird die Farbreaktion abgestoppt. Bei Verwendung des 'Vectastain Kit' zur Immundekoration erfolgen alle Inkubationsschritte in TTBS, als sekundärer Antikörper wird Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-Biotin-Konjugat verwendet.

3.5.9 Fluorographie von Polyacrylamidgelen

Für eine autoradiographische Analyse erfolgt die Exposition des getrockneten Gels mit Verstärkerfolie (Agfa MR800) auf Röntgenfilm (Agfa CURIX RP1, Kodak X-OMAT™ LS, Kodak Biomax™ MR) bei -80°C. Zur Verstärkung von ³⁵S-Signalen können Acrylamidgele nach der Methode von Bonner und Laskey (1974) fluorographiert und anschließend zwischen Filterpapier und Haushaltsfolie bei -80°C unter Vakuum getrocknet und anschließend exponiert werden.

3.6 Chromatographische Trennverfahren

3.6.1 Ni²⁺-Affinitätschromatographie

Alle für diese Arbeit rekombinant exprimierten Peptide werden als lösliche Proteine gewonnen und sind mit einem C-terminalen Histidin₆-Rest ausgestattet. Die Aufreinigung der Peptide erfolgt über Ni²⁺-Affinitätschromatographie. Die Anbindung des Proteins in Puffer A (20mM Tris, pH8,0 / 400mM NaCl) an das äquilibrierte Chromatographiematerial erfolgt unter ständigem Durchmischen für 1h. Nach dem Waschen des Säulenmaterials mit dem fünffachen Säulenvolumen von Puffer A wird das gebundene Protein in fünf Elutionsschritten à einem Säulenvolumen mit Puffer E (20mM Tris, pH8,0 / 100mM Imidazol) eluiert. Das Säulematerial wird sofort durch Spülen mit Puffer S (20mM MES, pH5,0) wieder äquilibriert und in 30% Ethanol gelagert.

Die für Interaktionsexperimente eingesetzten Peptide müssen in eine imidazolfreie Lösung umgepuffert werden. Die Umpufferung erfolgt durch Dialyse der Elutionsfraktionen aus der Ni²⁺-Affinitätschromatographie gegen 50mM Tricin, pH7,6 / 100mM NaCl.

3.6.2 Abreinigung eines Antiserums

Die Abreinigung von Antiserum gegen Tic62 erfolgt durch Affinitätschromatographie des Antiserums gegen thylakoidäre Proteine. Dazu wird das Antiserum mit CNBr-Sepharose 4B, an welche zuvor Thylakoidproteine gekoppelt worden sind, für 60-90min inkubiert, das Material anschließend pelletiert und weitere zwei Male mit TBS (100mM Tris, pH 7,4 / 150mM NaCl) gewaschen. Die jeweils gewonnenen Überstände enthalten den abgereinigten Antikörper, werden schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die Vorbehandlung von 1g CNBr-Sepharose 4B startet mit dem Waschen des Materials in 10ml 1mM HCl, gefolgt von intensivem Waschen des Materials mit 200-250ml Boratpuffer (0,1M Na-Borat/NaOH, pH 9,0 / 0,5M NaCl). Jetzt erfolgt die Anbindung von 600µl Thylakoiden (entsprechend ~100µg Chlorophyll), die zuvor pelletiert, in 800µl Boratpuffer resuspendiert und durch Zugabe von 200µl 10% [w/v] SDS solubilisiert worden sind. Die Anbindung erfolgt in einem Gesamtvolumen von 5ml für 4-5h. Anschließend wird das Material mehrfach mit 1M Tris/HCl, pH 8,0 gewaschen und in 10ml dieses Puffers bei 4°C über Nacht inkubiert, um freie Bindungsstellen des Materials abzusättigen. Abschließend wird das Material wiederum

mehrfach alternierend in Boratpuffer und Waschpuffer (0,1M Na-Acetat, pH 4,5 / 0,5M NaCl) gewaschen und steht jetzt für die Abreinigung des Antiserums zur Verfügung.

3.6.3 Molekulargewichtschromatographie / Gelfiltration

Für die molekulargewichtschromatographische Auftrennung von BN-Tic-Eluat wird eine Säulenmatrix aus Sephacryl S-400 HR verwendet. Nach Auftrag der Probe erfolgt die gesamte Elution mit 25mM Hepes/NaOH, pH7,0 / 50mM Aminohexansäure / 0,13% n-Decylmaltosid. Das Elutionsprofil wird mittels SDS-PAGE (3.5.3) aller Fraktionen, Transfer auf Nitrozellulosemembranen (3.5.5) und anschließende Immundetektion (3.5.8) analysiert.

3.7 Herstellung polyklonaler Antiseren

Das rekombinant überexprimierte Protein (3.1.6) wird mittels Affinitätschromatographie (3.6.1) gereinigt, in 1% [w/v] SDS denaturiert und durch Ultraschallbehandlung in einem Volumen „Freund'schem Adjuvants complete“ emulgiert. Diese Emulsion wird Kaninchen der Rasse „Weiße Neuseeländer“ subkutan injiziert. Pro Injektion werden dem Kaninchen 250-500µg Protein verabreicht. Die Immunisierung wird im Abstand von zwei bis vier Wochen mehrfach wiederholt, bei allen anschließenden Immunisierungen erfolgt die Emulgation des Proteins in „Freund'schem Adjuvants incomplete“. Ein bis zwei Wochen nach der jeweiligen Injektion wird dem Kaninchen Blut aus der Ohrvene entnommen. Nachdem das Blut bis zur Koagulation bei Raumtemperatur stengelassen wurde, erfolgt die Aufarbeitung des Antiserums durch eine erste Zentrifugation für 10min bei 2500xg. Der resultierende Blutkuchen wird ein weiteres Mal bei 40000xg für 15min zentrifugiert, anschließend die Überstände aus beiden Zentrifugationen vereint und ein letztes Mal bei 40000xg zentrifugiert. Das Antiserum wird aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.8 Ausgewählte proteinbiochemische Methoden

3.8.1 Immunpräzipitation von Proteinen und Proteinkomplexen

Die Immunpräzipitation von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgt mit Variationen der Pufferzusammensetzung nach Mason und Mitarbeitern (1988). Für diese Experimente werden die inneren Hüllmembranen pelletiert (165000xg / 10min / 4°C), in IP-

Puffer (10mM Hepes/NaOH, pH7,6 / 75mM NaCl) resuspendiert und durch Zugabe von 1% [w/v] SDS solubilisiert. Der Ansatz wird dann auf eine Endkonzentration von 0,1% [w/v] SDS eingestellt und 90-180min (über Nacht bei 4°C) mit 10-20µl des polyklonalen Antiserums inkubiert. Anschließend erfolgt die Inkubation mit einem äquilibrierten Aliquot Protein A-Sepharose für 60-90min. Das Material wird mehrfach gewaschen, die aufgereinigten Proteine durch Inkubation mit SDS (1min/95°C) vom Material gelöst.

Die Fällung von Proteinen und Proteinkomplexen unter nativen Bedingungen wird in Grundzügen entsprechend dem Protokoll von Kiebler und Mitarbeitern (1990) durchgeführt, wobei auch hier Variationen der Pufferbestandteile, Detergentien und Ansatzvolumina vorkommen. Gehen Proteinkomplexe, die zuvor mittels Blau-Nativer-PAGE aufgetrennt und anschließend elektroeluiert worden sind, in die Immunpräzipitation ein, so wird ein Endvolumen von 10:1 des Eluats mit IP-Puffer eingestellt und direkt mit 5-10µl spezifischem Antiserum inkubiert. Die Aufreinigung der gebundenen Proteine erfolgt in diesem Fall wiederum über Protein A-Sepharose nach oben beschriebener Verfahrensweise, allerdings in dem entsprechenden nicht-denaturierenden Puffersystem. Die Analyse der Immunpräzipitationsexperimente erfolgt mittels SDS-PAGE (3.5.3), Silberfärbung (3.5.7) oder Immundetektion nach Westerntransfer der Proteine (3.5.5 / 3.5.8).

3.8.2 Durchführung von Quervernetzungsexperimenten

In dieser Arbeit wurden die homobifunktionalen Quervernetzer BS³ (Bis[sulfosuccinimidyl]Suberat) und DSP (Dithiobis[Succinimidyl]Propionat) in Konzentration von 5µM bis 0,1mM eingesetzt. Die zuvor pelletierten (165000xg / 10min / 4°C) inneren Chloroplastenhüllmembranen (~10-20µg) werden in 25mM Hepes/NaOH, pH 7,6 / 8mM MgCl₂ resuspendiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von Quervernetzer gestartet und für 5-30min auf Eis oder bei 25°C inkubiert. Der Nachweis von Quervernetzungsexperimenten erfolgt durch SDS-PAGE (3.5.3), Membrantransfer (3.5.5) und Immundetektion (3.5.8).

3.8.3 Anbindung von NAD/NADP an Proteine der Chloroplastenhüllmembranen

Die Synthese von radioaktiv markiertem NADP (NADP⁺) erfolgt durch Inkubation von 100µg NAD-Kinase (Sigma, Steinheim) mit 35pmol ³²P-NAD, 40pmol NAD und 200pmol ATP für 15min bei 37°C (Angaben des Herstellers der NAD-Kinase). Das Gesamtvolumen

einer Synthesereaktion beträgt 20µl. Für einzelne Anbindungsexperimente wird ¼ der Synthesereaktion eingesetzt. Als Kontrolle werden Inkubationsansätze ohne ATP verwendet (NAD⁺), wobei eine Phosphorylierung des NAD nicht erlaubt wird.

Für den Anbindungsassay werden innere Hüllmembranen (~100µg Protein) sedimentiert (165000xg / 10min / 4°C), in 40µl Puffer A (20mM Tris, pH 7,4) resuspendiert und mit radioaktiven Nukleotiden (NAD/NAD⁺/NADP⁺) versetzt. Je nach Ansatz werden die Hüllmembranen direkt oder nach Solubilisierung mit verschiedenen Detergentien zur irreversiblen Kopplung mit UV-Licht der Wellenlänge 254nm (Universal-UV-Lampe, Lamag) für 10min auf Eis bestrahlt. Die Analyse erfolgt nach SDS-PAGE (3.5.3) durch Autoradiographie. In Einzelexperimenten wird der 40µl-Ansatz nach Anbindung und UV-Bestrahlung mit BN-Solubilisierungspuffer (200mM Aminohexansäure / 40mM Bis-Tris, pH 7,0 / 5% n-Decylmaltosid) auf ein Endvolumen von 100µl eingestellt, für 8min bei 12000xg zentrifugiert, der Überstand mit 10µl BN-Probenpuffer (5% [w/v] Coomassie Brilliant Blau G250) versetzt und der Gesamtansatz zur Analyse über BN-PAGE aufgetrennt (3.5.2). Die Analyse erfolgt durch Autoradiographie des getrockneten BN-Gels.

3.8.4 Proteasebehandlung von isolierten inneren Chloroplastenhüllmembranen

Die Topologie von Membranproteinen kann durch Behandlung mit Thermolysin oder Trypsin untersucht werden. Zu diesem Zweck werden innere Chloroplastenhüllmembranen (~10-20µg Protein) sedimentiert (165000xg / 10min / 4°C). Für die Thermolysinbehandlung wird das Membranpellet in 25mM Hepes/NaOH, pH7,6 / 5mM MgCl₂ / 0,5mM CaCl₂ resuspendiert und für 2min bei 25°C mit 10ng bis 1µg Thermolysin inkubiert. Durch Zugabe von 10mM EDTA wird die Thermolysinbehandlung gestoppt. Der Trypsinverdau wird nach Resuspendierung des Membranpellets in 50mM Hepes/NaOH, pH8,0 / 0,1mM CaCl₂ und Zugabe von Trypsin (10ng - 1µg) für 90sec bei 25°C inkubiert und durch Zugabe von 1mM PMSF abgestoppt. Die Analyse erfolgt durch SDS-PAGE (3.5.3), Membrantransfer (3.5.5) und Immundetektion (3.5.8).

3.8.5 Karbonat- und Harnstoffextraktion von Chloroplastenhüllmembranen

Zur Unterscheidung zwischen integralen Membranproteinen und membranassoziierten Proteinen werden innere Chloroplastenhüllmembranen (~10-20µg) sedimentiert (165000xg / 10min / 4°C). Das Membranpellet wird entweder in 25mM Hepes/KOH, pH7,6, 5mM MgCl₂,

0,5M NaHCO₃, pH11,5 oder in 10mM Hepes/NaOH, pH7,6 / 5mM MgCl₂ / 8M Harnstoff resuspendiert und für jeweils 15min auf Eis inkubiert. Die Membran- und die lösliche Fraktion werden durch erneute Zentrifugation (165000xg / 10min / 4°C) voneinander getrennt. Die Analyse erfolgt durch SDS-PAGE (3.5.3), Membrantransfer (3.5.5) und Immundetektion (3.5.8).

3.8.6 Extraktion von Thylakoiden

Durch die Extraktion von Thylakoiden entsprechend 1,25mg Chlorophyll mit 10mM Tricin/KOH, pH 7,8 / 500mM NaCl für 30min auf Eis wird eine Fraktion membranassoziierter Proteine der Thylakoide (ThyEx) gewonnen. Für Bindungsstudien mit psTic62 wird 1/8 bis 1/4 des Ansatzes verwendet.

3.8.7 Bindungsexperimente von psTic62

In den Bindungsexperimenten werden jeweils 10µg der rekombinant überexprimierten psTic62-Peptide IA1 / IA2 / IA3 eingesetzt. Das verwendete Thylakoidextrakt (3.8.6) wird auf eine Endkonzentration von 50mM NaCl durch Verdünnung mit 10mM Tricin, pH 7,8 / 0,05% Egg-Albumin eingestellt, mit psTic62-Peptid gemischt und für 2h inkubiert. Bei der anschließenden Inkubation des Ansatzes mit Ni²⁺-NTA-Agarose für 1h erfolgt die Anbindung der Peptide an das Säulenmaterial. Die Elution erfolgt je nach Versuch in unterschiedlichen Wasch- und Elutionsschritten.

3.9 Zellbiologische Methoden der Elektronenmikroskopie

Alle anfallenden Arbeiten zur Elektronenmikroskopie wie die Fixierung des Materials, die Mikrotomie, Immundekoration und Kontrastierung der Präparate sowie die eigentliche Elektronenmikroskopie werden von Frau Christel Glockmann, AG Soll, Botanisches Institut der Universität Kiel durchgeführt. Das Protokoll folgt den Angaben aus Pain und Mitarbeiter (1988).

3.9.1 Fixierung und Einbettung ausgewählter Präparate

Innere Hüllmembranen und Blattmaterial von Erbse werden entsprechend den Angaben von Pain und Mitarbeitern (1988) in einer Ethanolreihe entwässert und in Gelatinekapselform mit LRWhite eingebettet.

3.9.2 Ultradünnschichtmikrotomie

Die Anfertigung von Ultradünnschnitten erfolgt an einem Ultramikrotom Ultracut E (Reichert-Jung, Deutschland). Für die Immundekoration werden die Schnitte auf mit Formvar bezogene Goldgrids (2mmx1mm Slot, Gold, 3,05mm, Plano, Wetzlar) aufgebracht.

3.9.3 Immundekoration von Ultradünnschnitten

Die Inkubation der Ultradünnschnitte mit dem primären Antikörper (α Tic62, Antiserum und abgereinigtes Antiserum, siehe 3.6.2) erfolgt mit einer Verdünnung von 1:20 in TN-Puffer (100mM Tris/HCl, pH 7,5 / 150mM NaCl) / 0,5% FCS. Die Grids werden anschließend in TN-Puffer / 0,05% Tween20 gewaschen und mit Protein A G10 Auroprobe EM 10nm Gold (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) inkubiert und schließlich wiederum durch Waschschriffe in TN-Puffer / 0,5% Tween20 und in Wasser gereinigt.

3.9.4 Durchführung der Elektronenmikroskopie

Die Sichtung und Analyse der Ultradünnschnitte erfolgt an einem CM10 Elektronenmikroskop von Philips (Niederlande).

3.10 Computergestützte Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen

Alle verwendeten Programme zur Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen sind im Internet unter www.bcm.tmc.edu (Smith et al., 1996), www.expasy.ch oder www.tigr.org zugänglich. Für Datenbank-Suchläufe werden die Algorithmen Blast+Beauty X (Worley et al., 1998) und Blast+Beauty (Worley et al., 1995)

eingesetzt. Die Auswertung von Aminosäuresequenz-abgleichen erfolgt mit den Programme ClustalW (www.ebi.ac.uk) und Boxshade (www.chembnet.org/software/BOX_form.html). Für Primärstrukturanalysen von Aminosäuresequenzen werden die unter www.expasy.ch verfügbaren Programme Compute pI/MW, TMpred, ProtParam eingesetzt. Die Vorhersage chlorplastidärer Transitpeptide erfolgt mit ChloroP1.1 (Emanuelsson et al., 1999).

4 ERGEBNISSE

4.1 Aufreinigung des Tic-Komplexes der inneren Chloroplastenhüllmembran

Bisher sind fünf Proteine der inneren Chloroplastenhüllmembran beschrieben, die als putative Komponenten des Tic-Komplexes an der Translokation von Vorstufenproteinen in das Stroma beteiligt sein sollen. Tic110 wurde durch Quervernetzungsexperimente und Co-Immunpräzipitation mit Vorstufenprotein und Toc-Komponenten als erste Komponente eines Importapparates der inneren Hüllmembran identifiziert (Kessler and Blobel, 1996; Lübeck et al., 1996) und wird seither als Referenz für die Aufreinigung des Tic-Komplexes verstanden.

Caliebe und Mitarbeiter (1997) haben gezeigt, daß die Blau-Native-Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE) ebenfalls zur Aufreinigung chloroplastidärer Membranproteinkomplexe geeignet ist und über diese Methode Tic55 als weitere Komponente in einem Importkomplex mit Tic110 identifiziert. Die Identifikation der übrigen drei Tic-Komponenten basiert auf ihrer räumlichen Nähe zu Vorstufenprotein oder Tic110. Tic40 ist ursprünglich als CimCom44 identifiziert worden, dessen Beteiligung am Importprozeß durch Quervernetzung mit Vorstufenprotein belegt ist (Wu et al., 1994). Außerdem ist über Co-Immunpräzipitation die Interaktion zwischen Tic40 und Tic110 gezeigt (Stahl et al., 1999). Tic20 und Tic22 sind durch Quervernetzung mit Vorstufenprotein während einer späten Phase der Translokation identifiziert (Kouranov and Schnell, 1997). Sowohl für Tic40 als auch Tic22 wird eine Funktion als Chaperon postuliert (Stahl et al., 1999; Kouranov et al., 1998). Mit keiner der bisher verwendeten Methoden ist ein Proteinkomplex isoliert worden, der aus den beschriebenen fünf Tic-Komponenten besteht.

Ziel der Arbeit ist die biochemische Aufreinigung des Tic-Komplexes, um dessen Komposition und Funktion weiter zu untersuchen. Bisher haben nur Nielsen und Mitarbeiter (1997) und Waegemann und Soll (1995) die präparative Aufreinigung chloroplastidärer Importkomplexe über Dichtegradientenzentrifugation beschrieben, während Caliebe und Mitarbeiter (1997) den Tic-Komplex über BN-PAGE aufgereinigt haben. Beide Methoden werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzt, um den Tic-Komplex zu isolieren.

Zur Isolierung des Tic-Komplexes werden innere Chloroplastenhüllmembranen aus *Pisum sativum*, Variation 'Golf' verwendet. Nach der Solubilisierung innerer Chloroplastenhüllmembranen (~200µg Protein) mit n-Decylmaltosid werden die Proteinkomplexe über BN-PAGE in einem Gradientengel von 6,5-12% Acrylamid aufgetrennt (3.5.2). Bis zu fünf Banden zeigen sich nach der Coomassie Blau-Färbung (3.5.6) des BN-Gels (Abb. 3A). In einer denaturierenden SDS-PAGE (3.5.3) lassen sich die in der nativen Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinkomplexe in ihre Komponenten trennen (Abb. 3B).

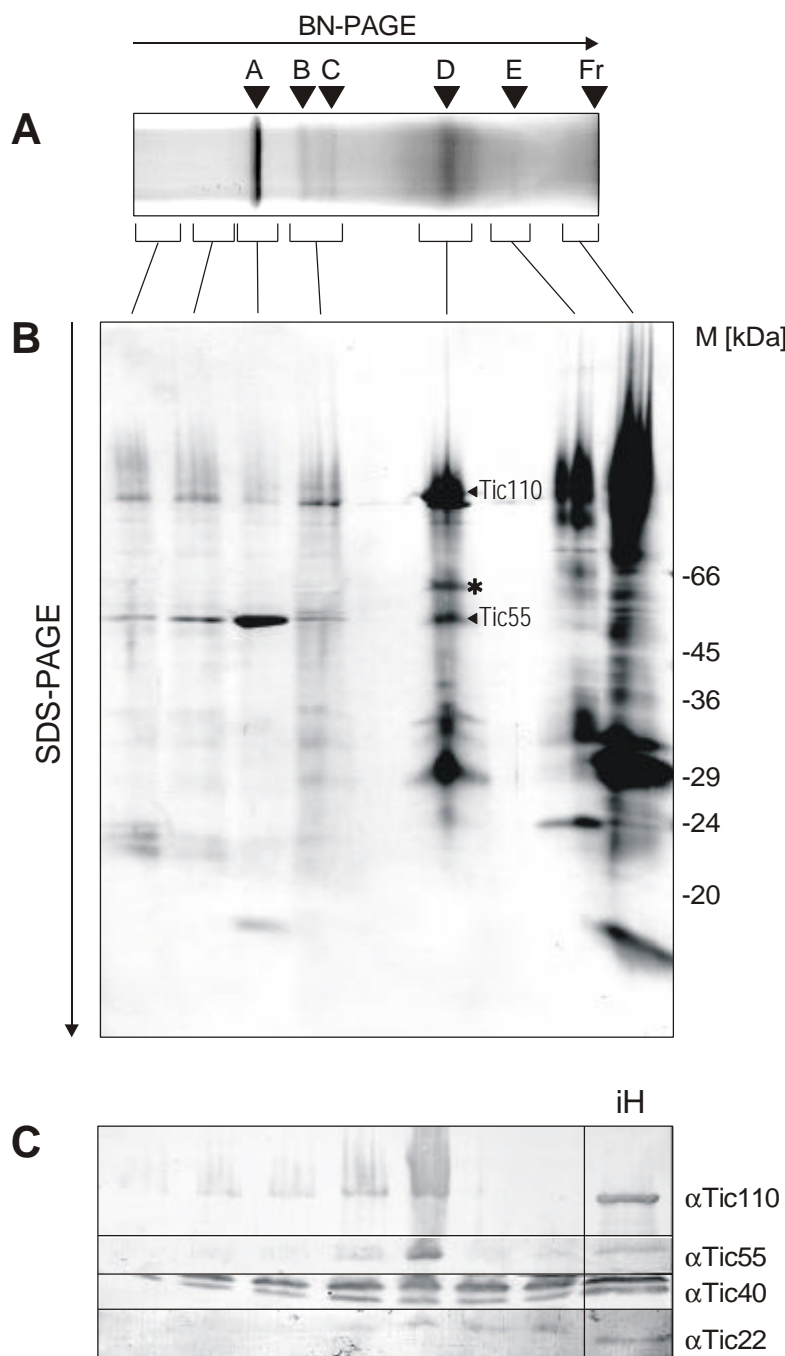


Abb. 3 Auftrennung von Proteinkomplexen der inneren Chloroplastenhüllmembran aus Erbse über Blau-Native-PAGE (BN-PAGE)

(A) Die Solubilisierung von Proteinen der inneren Chloroplastenhüllmembran (200µg Protein) erfolgt mit 1,3-3% n-Decylmaltosid. Zur Auftrennung der Proteine und Proteinkomplexe wird ein Gradientengel mit 6,5-12% Acrylamid eingesetzt. (A) Die Spur zeigt ein Gel nach Coomassie Blau-Färbung. Die mit A bis E bezeichneten Banden stellen verschiedene Proteinkomplexe dar. Fr bezeichnet die Region der Lauffront des Gels. (B) Nach der Auftrennung über BN-PAGE wird die Zusammensetzung der separierten Proteinkomplexe durch Tricin-SDS PAGE untersucht. Gezeigt ist ein Gel nach Silberfärbung. Rechts ist das Molekulargewicht (M) der Proteine des Größenstandards angegeben. Tic110 und Tic55 sind im Gel markiert, das co-migrierende 64kDa-Protein ist mit einem Stern markiert. (C) Nach der in (A/B) beschriebenen Auftrennung und dem Transfer auf Nitrozellulose erfolgt der Nachweis einzelner Proteine durch Immundetektion. Als Kontrolle werden innere Hüllmembranen (iH) aufgetragen.

Die obere Bande (Abb. 3A, Komplex A) ist Ribulose-1,5-bis-phosphat-Carboxylase/Oxygenase (RUBISCO), die eine stromale Kontamination der plastidären Membranfraktion darstellt. In der denaturierenden Geldimension werden zwei Komponenten mit apparenten Molekulargewichten um ~52 kDa und ~14 kDa nachgewiesen (Abb. 3B). Die Banden werden über Immundetektion als die große Untereinheit (LSU) und die kleine Untereinheit (SSU) der RUBISCO identifiziert (Daten nicht gezeigt). Das Molekulargewicht der RUBISCO wird mit 520 kDa angegeben (Miziorko and Lorimer, 1983).

Die zweite Hauptbande bei ~230 kDa (Abb. 3A, Komplex D) zerfällt in der SDS-PAGE in sechs Komponenten (Abb. 3B). Die Interaktion von Tic110 und Tic55 und die Aufreinigung beider Komponenten innerhalb des über BN-PAGE aufgetrennten Proteinkomplexes ist bereits beschrieben (Caliebe et al., 1997). Dieses Ergebnis kann durch Immundetektion bestätigt werden (Abb. 3C). Tic110 und Tic55 werden ausschließlich in dem als Tic-Komplex identifizierten Komplex D detektiert. Gemeinsam mit den beiden Tic-Markerproteinen Tic110 und Tic55 kann im Komplex D ein Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von ~64 kDa aufgereinigt werden, welches ebenfalls nur in diesem Komplex auftritt (Abb. 3B). Unterhalb von 40 kDa werden in der denaturierenden Geldimension weitere putative Komponenten dieses Proteinkomplexes bei 36 kDa, 34 kDa, 33 kDa und 29 kDa angefärbt (Abb. 3B). Auch Tic40 und Tic22 können in der denaturierenden, zweiten Geldimension detektiert werden, lassen sich jedoch dem Komplex D mit Tic110 und Tic55 aufgrund ihres abweichenden Laufverhaltens nicht eindeutig zuordnen (Abb. 3C). Für Tic20 liegen in dieser Arbeit keine Ergebnisse vor, da ein Antiserum gegen Tic20 nicht zur Verfügung stand.

Da nicht alle fünf in der Literatur beschriebenen Tic-Untereinheiten als Komponenten des über BN-/Tricin-SDS-PAGE isolierten Tic-Komplexes charakterisiert werden können, wird mit der Dichtegradientenzentrifugation eine weitere Methode zur Aufreinigung von Membranproteinkomplexen eingesetzt, um die Komposition des Tic-Komplexes weiter zu untersuchen. Über Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation konnten bereits Waegemann und Soll (1995) den Toc-Komplex und Nielsen und Mitarbeiter (1997) einen Toc-Tic-Superkomplex aufreinigen.

Für die Dichtegradientenzentrifugation werden in Anlehnung an die Solubilisierungsbedingungen der BN-PAGE innere Hüllmembranen entsprechend ~200µg Protein eingesetzt und mit 1,3%-3% n-Decylmaltosid (in 25mM Hepes/NaOH, pH7,6 / 50mM Amino-hexansäure) solubilisiert. Der Gradient von 5-20% Saccharose wird nach der

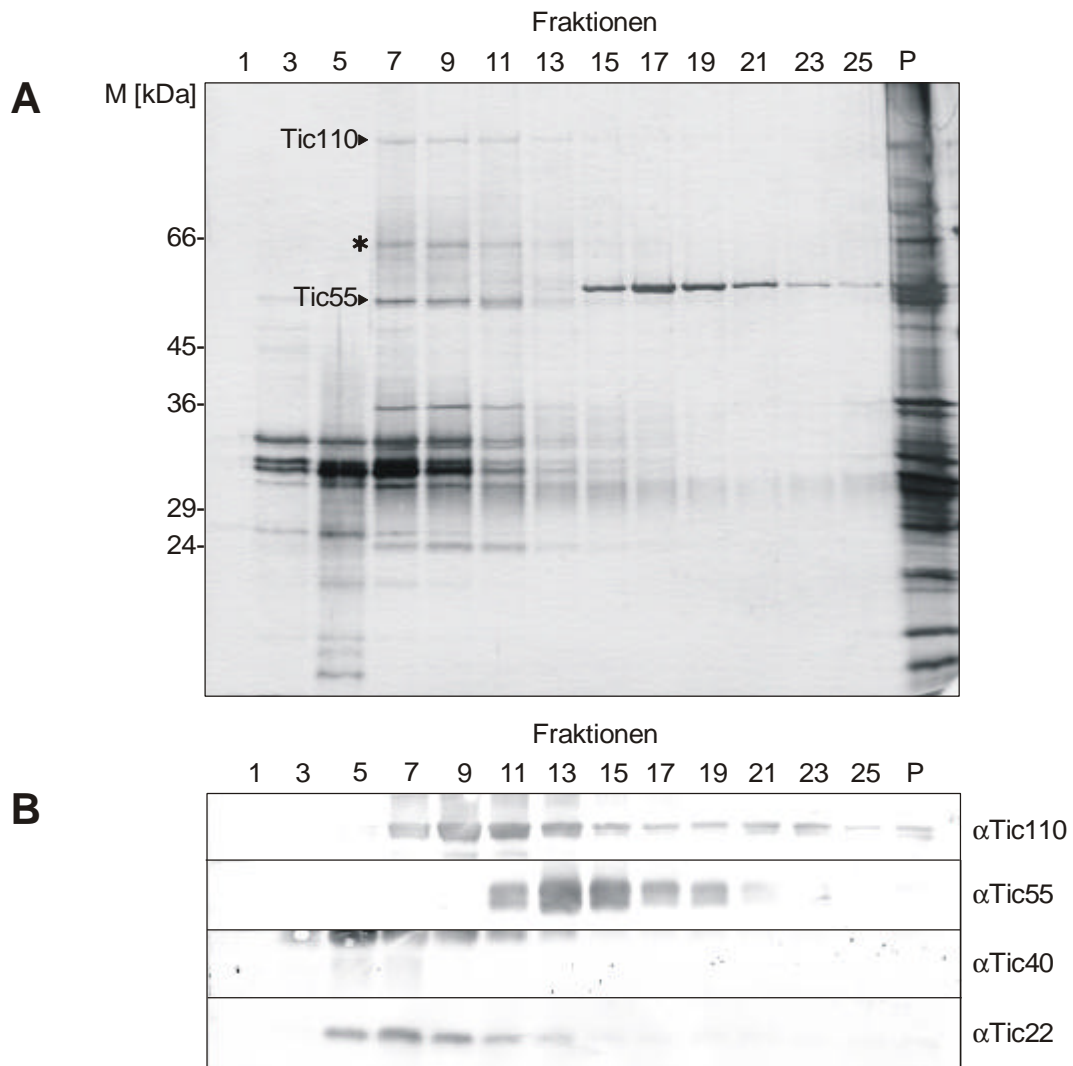


Abb. 4 Auftrennung von Proteinkomplexen der inneren Chloroplastenhüllmembran über Dichtegradientenzentrifugation

(A) Innere Chloroplastenhüllmembranen (200µg Protein) werden mit 1,3-3% n-Decylmaltosid solubilisiert. Die Auftrennung der Proteinkomplexe über Dichtegradientenzentrifugation erfolgt in einem linearen Gradienten von 5% bis 20% Saccharose (1x5cm³). Die Zentrifugation mit 312000xg für 4h wird bei 12°C durchgeführt. Die Fraktionierung (Fraktionen: 1-25; P: Pellet) wird mittels SDS-PAGE und Silberfärbung (A) sowie durch den Transfer auf Nitrozellulosemembran und anschließender Immundetektion (B) analysiert. In Abbildungsteil A sind links die Molekulargewichte (M) der Proteine des Größenstandards angegeben. Die Laufhöhen von Tic110 und Tic55 sind im Gel markiert, die Laufhöhe des co-migrierenden 64kDa-Proteins ist mit einem Stern angezeigt.

Zentrifugation durch SDS-PAGE und Immundetektion analysiert. Bei 4°C läßt sich die RUBISCO durch Zentrifugation nicht vom Tic-Komplex abtrennen (Daten nicht gezeigt). Erst mit Erhöhung der Temperatur während der Zentrifugation auf 12°C wird eine Trennung von RUBISCO und Tic-Komplex erreicht. In den Fraktionen 9 bis 13 zeigt sich ein Proteinstern (Abb. 4A), welches dem in der BN-PAGE separierten Komplex D entspricht (Abb. 3B). In den Fraktionen 9-13 werden wiederum Tic110 und Tic55 als Markerproteine des Tic-Komplexes gemeinsam aufgereinigt (Abb. 4B). Außerdem lassen sich wie über BN-/Tricin-

SDS-PAGE das Protein um ~64 kDa und weitere Proteine unterhalb 40 kDa zusammen mit den beiden genannten Tic-Komponenten aufreinigen.

Um zu demonstrieren, daß sich der über BN-PAGE (Komplex D) einerseits und über Dichtegradientenzentrifugation andererseits isolierte Tic-Komplex entsprechen, werden ausgewählte Fraktionen der Dichtegradientenzentrifugation (Fraktionen 9-13) vereinigt und zusätzlich über BN-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Coomassie Blau-Färbung (3.5.6) wird eine Bande auf der Laufhöhe des Tic-Komplexes sichtbar gemacht (Daten nicht gezeigt), die durch Immundetektion der nativen Geldimension mit Antiserum gegen Tic55 detektiert wird (Abb. 5, Spur 4). Als Kontrolle ist die Identifikation der beiden dominanten,

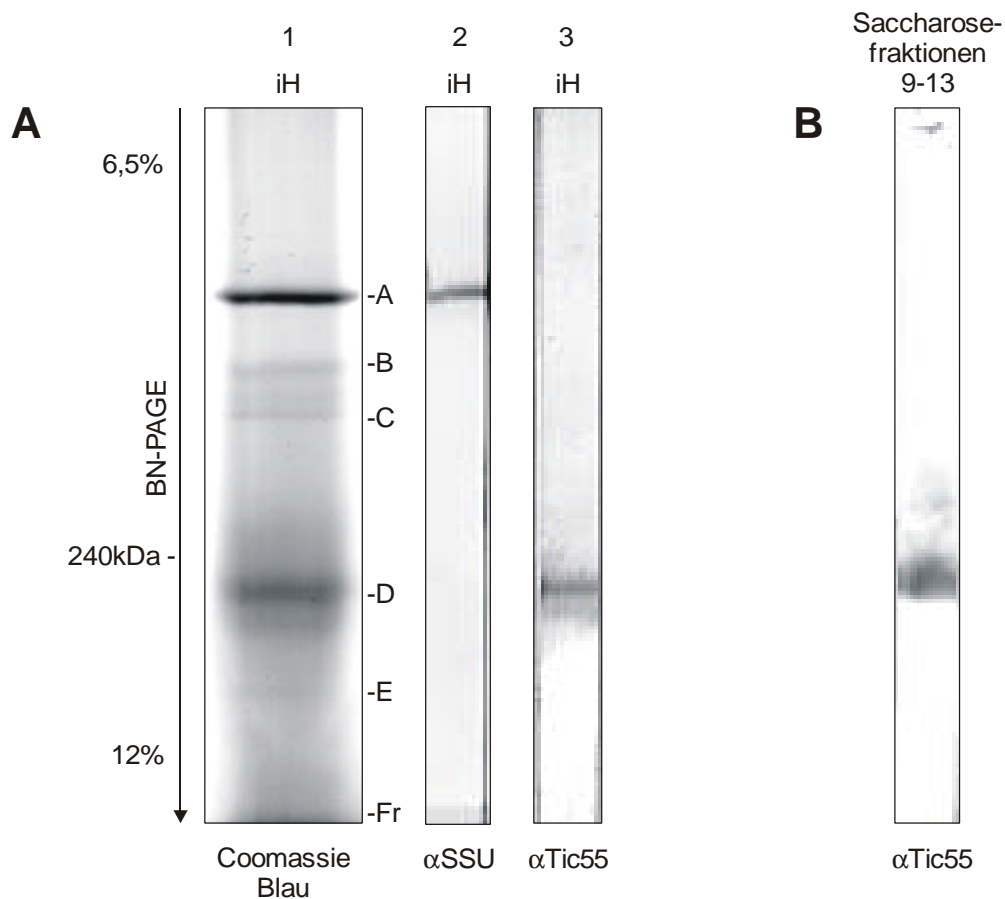


Abb. 5 Auftrennung des Tic-Komplexes über BN-PAGE nach Dichtegradientenzentrifugation

(A) Proteine der inneren Chloroplastenhüllmembran (iH) werden über BN-PAGE (3.5.2) aufgetrennt (siehe Abb. 3). Die Spur 1 zeigt ein Gel nach Coomassie Blau-Färbung, links neben der Abbildung ist die Laufhöhe der Katalase (240kDa) als Molekulargewichtsstandard markiert. Die mit A-E bezeichneten Banden stellen verschiedene Proteinkomplexe dar. Fr bezeichnet die Region der Lauffront des Gels. Nach Westerntransfer der nativ aufgetrennten Proteinkomplexe erfolgt die Immundetektion mit Antiseren gegen SSU (Spur 2) und Tic55 (Spur 3). (B) Innere Hüllmembranen werden solubilisiert und die Proteine über Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt (3.5.1). 1/3 der vereinigten Fraktionen 9 bis 13 des Saccharosegradienten (siehe Abb. 4 A/B) werden mit BN-Probenpuffer (1:10) versetzt, über BN-PAGE aufgetrennt (3.5.2) und durch anschließenden Transfer auf Nitrozellulosemembran und Immundetektion mit Antiserum gegen Tic55 analysiert.

ausschließlich über die BN-PAGE aufgetrennten Proteinkomplexe A und D durch Westerntransfer der nativen Geldimension und anschließende Immundetektion verifiziert. Die obere als RUBISCO identifizierte Bande (Komplex A) wird mit Antikörpern gegen die kleine Untereinheit (α SSU) immundekoriert (Abb. 5, Spur 2). Die zweite Hauptbande bei ~230 kDa wird - ebenfalls über Immundetektion - mit Antikörpern gegen Tic55 als Tic-Komplex identifiziert (Abb. 5, Spur 3).

Dennoch ergeben die BN-PAGE und die Dichtegradientenzentrifugation die Zusammensetzung des isolierten Tic-Komplexes betreffend abweichende Ergebnisse. In der BN-PAGE wird Tic40 über die gesamte Trennstrecke der nativen Dimension detektiert, während Tic22 innerhalb des Komplexes D als auch in Gelbereichen unterhalb dieses Komplexes auftritt. Bei der Dichtegradientenzentrifugation können beide Komponenten mit einem vergleichbaren Laufverhalten ähnlich einem Subkomplex gemeinsam in den Fraktionen 5-11 oberhalb des Tic-Komplexes aufgereinigt werden.

Die widersprüchlichen Ergebnisse aus den beiden Aufreinigungsmethoden geben Anlaß, den Tic-Komplex über zusätzliche Trennverfahren aufzureinigen, um zu untersuchen, ob alle vier Komponenten in einem stabilen Proteinkomplex assoziiert sind, oder es sich bei Tic40/Tic22 um einen eventuell nur lose an einen zentralen Tic-Komplex assoziierten Subkomplex der beiden Chaperone handelt.

Um den Tic-Komplex untersuchen zu können, wird der über BN-PAGE (3.5.2) isolierte Proteinkomplex elektrophoretisch aus dem nativen BN-Gel eluiert und aufkonzentriert (3.5.4). Das BN-Tic-Eluat wird ein zweites Mal mittels BN-PAGE aufgetrennt. Das distinkte Laufverhalten des Komplexes auf derselben Laufhöhe wie vor der Elektroelution demonstriert außerdem die Stabilität und Integrität des Tic-Komplexes (Abb. 6A). Um das identische Laufverhalten vor und nach der Elektroelution des Komplexes zu demonstrieren, werden bei der BN-PAGE auch innere Hüllmembranen als Kontrolle aufgetrennt (Abb. 6A, Spur K). Die Komposition des elektroeluierten und nochmals über BN-PAGE aufgereinigten Tic-Komplexes wird mittels SDS-PAGE einer vollständigen BN-Spur untersucht. Dieser Tic-Komplex zerfällt in drei Komponenten und wird im Folgenden als zentraler Tic-Komplex bezeichnet. Neben Tic110 und Tic55 kann auch das anfangs beschriebene 64kDa-Protein eindeutig zusammen mit diesen Tic-Markerproteinen aufgereinigt werden (Abb. 6B). Das Ergebnis dieser verbesserten Aufreinigung ist, daß die Komponenten unterhalb von 40 kDa

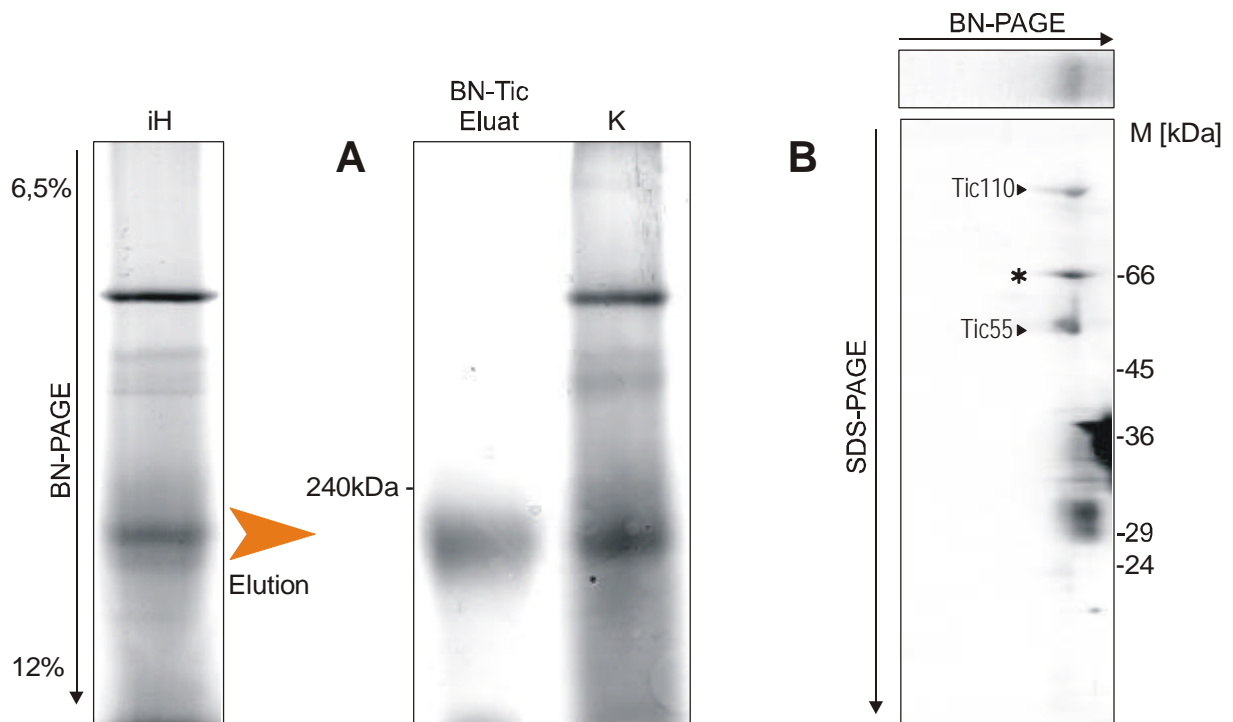


Abb. 6 Komposition einer zentralen Einheit des Tic-Komplexes

(A) Innere Chloroplastenhüllmembranen werden über BN-PAGE aufgetrennt (3.5.2) und der isolierte Tic-Komplex elektrophoretisch eluiert (3.5.4). Anschließend wird das BN-Eluat ein weiteres Mal über BN-PAGE aufgetrennt. Als Vergleich (K) werden in einem Parallelansatz innere Hüllmembranen entsprechend aufgetrennt. (B) Der isolierte Tic-Komplex wird in seine Komponenten aufgetrennt, indem die gesamte BN-Spur in eine SDS-PAGE eingeht (3.5.3). Gezeigt ist ein Gel nach Silberfärbung. Rechts neben der Abbildung sind die Molekulargewichte des Größenstandards angegeben. In der Abbildung sind die Laufhöhen von Tic110 und Tic55 markiert, die Laufhöhe des 64kDa-Proteins ist mit einem Stern gekennzeichnet.

nicht mit dieser zentralen Translokationseinheit aus den drei genann Proteineten co-migrieren, sondern als Subfraktion unterhalb des Tic-Komplexes detektiert werden. Auch Tic40 und Tic22 sind in diesem Stadium der Aufreinigung nicht mehr in dieser zentralen Translokationseinheit zu detektieren.

Die Zusammensetzung dieses zentralen Tic-Komplexes wird weiterhin durch eine Dichtegradientenzentrifugation (3.5.1) des BN-Tic-Eluats verifiziert; wiederum werden Tic110 und Tic55 in den Saccharosefraktionen 9-13 gemeinsam aufgereinigt (Abb. 7A). Auch hier tritt in den entsprechenden Fraktionen das 64kDa-Protein auf (Abb. 7A), was auch mittels Immundetektion bestätigt wird (Abb. 7B). In dem Gradient treten die Proteine unterhalb von 40 kDa auch in den Fraktionen 5-9 auf. Die Co-Migration dieser Proteine in den Fraktionen des Tic-Komplexes ist jedoch auf die geringere Trennkapazität der Methode im Vergleich zur BN-PAGE zurückzuführen.

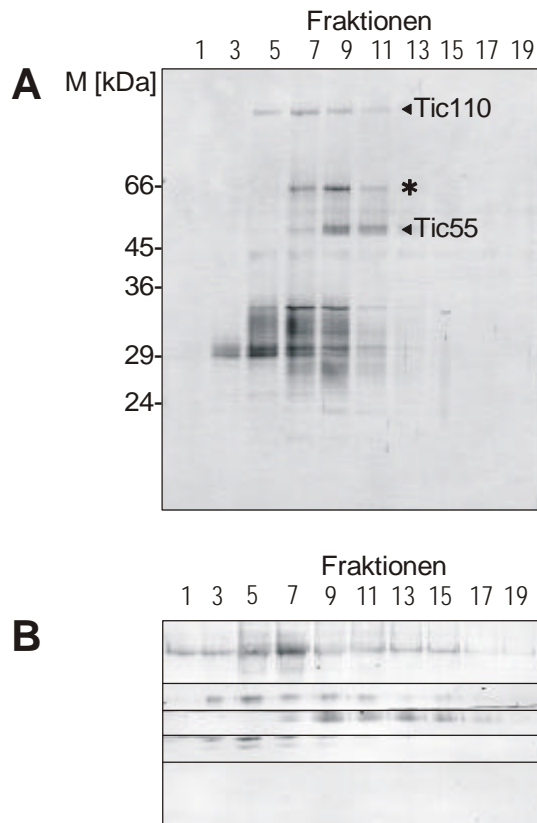


Abb. 7 Fraktionierung des BN-Tic-Eluats über Dichtegradientenzentrifugation

Innere Chloroplastenhüllmembranen werden über BN-PAGE aufgetrennt (3.5.2) und der isolierte Tic-Komplex elektrophoretisch eluiert (3.5.4). Das BN-Tic-Eluat wird anschließend über Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt (3.5.1). Ausgewählte Fraktionen des Saccharosegradienten werden über SDS-PAGE aufgetrennt und über Silberfärbung (A) oder nach Transfer auf Nitrozellulosemembran mittels Immundetektion (B) analysiert. In Abbildungsteil A sind die Molekulargewichte der Proteine des Größenstandards links gekennzeichnet. Im Gel sind die Laufhöhen von Tic110, Tic55 und des 64kDa-Proteins (*) markiert.

Als drittes Trennverfahren wird das BN-Tic-Eluat in einer anschließenden Gelfiltration über eine Sephacryl S-400 HR-Säulenmatrix fraktioniert. Ein distinkter Komplex aus Tic110, Tic55 und dem 64kDa-Protein wird zwischen 120 und 250 kDa eluiert (Abb. 8). Die Fraktionierung der chromatographischen Größentrennung wird über SDS-PAGE und Antikörperfärbung analysiert (Daten nicht gezeigt). Auch die Auftrennung des BN-Eluats durch die Gelfiltration bestätigt somit die Zusammensetzung des bis hierhin charakterisierten

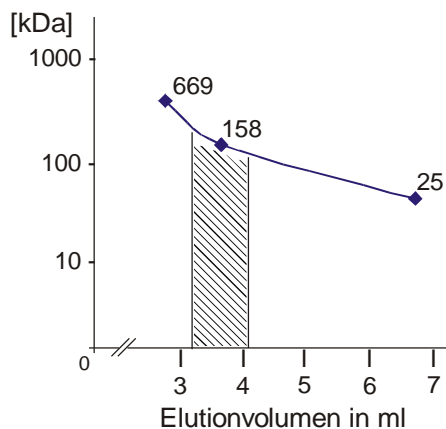


Abb. 8 Gelfiltration des BN-Tic-Eluats

Proteine der inneren Chloroplastenhüllmembran werden über BN-PAGE aufgetrennt (3.5.2) und der isolierte Tic-Komplex elektrophoretisch eluiert (3.5.4). Anschließend wird das BN-Tic-Eluat über eine Sephacryl S-400 HR Chromatographiesäule aufgetrennt (3.6.3). Die Elutionsfraktionen werden über SDS-PAGE, Transfer auf Nitrozellulosemembran und anschließende Immundetektion analysiert (Daten nicht gezeigt). Die Elution des Tic-Komplexes ist durch den schraffierten Bereich angezeigt. Die

verwendete Chromatographiesäule wird mit Proteinen bekannter Molekulargewichte kalibriert (2.12), in der Kalibrierungskurve ist die Elution und das jeweilige Molekulargewicht der Kalibrierungsproteine angegeben (Thyroglobulin: M=669 kDa / Aldolase: M=158kDa / Chymotrypsin: M=25kDa).

zentralen Tic-Komplexes aus Tic110, Tic55 und einem bisher nicht identifizierten 64kDa-Protein. Die BN-PAGE, die Dichtegradientenzentrifugation und die Gelfiltration des BN-Tic-Eluats bestätigen grundlegend, daß der elektrophoretisch eluierte Proteinkomplex kein Proteinaggregat bildet, sondern in jedem der Trennverfahren als distinkte Bande aufzureinigen ist.

4.2 Identifizierung und Charakterisierung von Tic62

Die bisher vorgestellten Daten ergeben die Aufreinigung eines zentralen Tic-Komplexes, bestehend aus Tic110, Tic55 und einem bisher nicht identifizierten Protein mit einem

Peptid 64-1:
A E E Q H L H E P

Peptid 64-2:
E Q P L S P Y T A (Y) D K

apparenten Molekulargewicht von ~64 kDa. Diese neue putative Tic-Komponente wird in weiterführenden Experimenten näher charakterisiert und ihre Funktion und Zugehörigkeit zu einer zentralen Translokationseinheit der inneren Chloroplastenhüllmembran analysiert.

Abb. 9 Peptide des 64kDa-Proteins

Das 64kDa-Protein wird aus dem isolierten Tic-Komplex aufgereinigt und über SDS-PAGE getrennt. Der Transfer erfolgt auf PVDF-Membran mit anschließender Färbung des Proteins mit Coomassie Blau G250. Die Proteinbande wird einem Verdau mit LysC unterzogen und die gewonnenen Peptide über HPLC aufgetrennt. Die Sequenzierung ausgewählter Peptide erfolgt nach Schema des Edman-Abbaus.

Der N-Terminus des aufgereinigten 64kDa-Proteins ist blockiert und die Aminosäuresequenzierung (3.1.8) damit ergebnislos. Der proteolytische Verdau des Proteins mit LysC ermöglicht die Aufreinigung und Sequenzierung von zwei

internen Peptiden (Abb. 9). Eine von dem Peptid 64-1 abgeleitete degenerierte Oligonukleotidsonde (Scr64, Abb. 10) wird zur Sichtung einer Uni-Zap™XR custom cDNA Bank (Stratagene, La Jolla, USA) ausgewählt (3.2.1). Da der Verdau des Proteins mit LysC

Peptid 64-1:
 (K) A E E Q H L H E

Sonde Scr64:
 5'-AA(AG) GC(AGCT) GA(AG) GA(AG) CA(AG) CA(CT) (CT)T(AGCT) CA(CT) GA-3'

Abb. 10 Nukleotidsequenz der Sonde Scr64 zur Sichtung einer cDNA Bank

Die degenerierte Sonde Scr64 kann aus der Aminosäuresequenz des Peptids 64-1 abgeleitet werden. Zur Sichtung einer Uni-Zap™XR custom cDNA Bank von Erbse ist die Sonde mit einer Digoxigenin-Markierung ausgestattet.

stets proteolytische Schnitte hinter Lysin (K) erzeugt, kann auch die dem Peptid vorangehende Aminosäure mit in die Basensequenz integriert werden.

4.2.1 Identifizierung und Primärstrukturanalyse von psTic62

Bei der Sichtung der Uni-Zap™XR custom cDNA Bank von Erbse (Stratagene, La Jolla, USA) mit der degenerierten Oligonukleotidsonde „Scr64“ wird der cDNA-Klon 3935 (1149bp) isoliert. Der längste zu ermittelnde offene Leserahmen des cDNA-Klons 3935 kodiert für ein Protein von 382 Aminosäuren (Abb. 11) und enthält beide Peptide (Peptid 64-1 / 64-2), die aus der proteolytischen Behandlung des 64kDa-Proteins gewonnenen wurden (Abb. 11,

```

1 - GTGGAATGTGATTGGAGAAGGCAGATCAAATTGGATCAGCATTAGGGAATGCATCAACT - 60
  - V E C D L E K A D Q I G S A L G N A S T
61 - GTGATATGTGCTATTGGTGCTAGTGAGAAGGAAATTTTCGACATTACTGGACCTTGTCGA - 120
  - V I C A I G A S E K E I F D I T G P C R
121 - ATCGATTACCGAGCTACCAAAAACCTTGTGGATGCTGCAACTGTTGCCAAAGTAAATCAC - 180
  - I D Y R A T K N L V D A A T V A K V N H
181 - TTCATATTGGTTACTTCATTGGGGACAAAACAAATTTGGTCTTCCTGCAGCTATTCTCAAT - 240
  - F I L V T S L G T N K F G L P A A I L N
241 - TTATTTTGGGGAGTCTGATTGGAAAAGGAAGGCCGAAGAAGCATTGCTAGCAAGTGGA - 300
  - L F W G V L I W K R K A E E A L L A S G
301 - ATCCATATACAATAGTGAGACCTGGTGGCATGGAGAGGCCGACTGACGCTTACAAGGAA - 360
  - I P Y T I V R P G G M E R P T D A Y K E
361 - ACACATAATGTAACCTCTGTCAACTGAAGATACTTTATTTGGGGGTCAAGTTTCAAACCTT - 420
  - T H N V T L S T E D T L F G G Q V S N L
421 - CAGGTTGCTGAACTCATGGCAATCATGGCCAAGAATCCCGATCTTTCATACTGTAAAATA - 480
  - Q V A E L M A I M A K N P D L S Y C K I
481 - GTGGAGGTTATTGCCGAGACAACTGCGCCACTAACACCTGCCGAAAAACTTCTTACAAGG - 540
  - V E V I A E T T A P L T P A E K L L T R
541 - ATACCTTCTCAACGCCCTTACATTCCCTTCGCCAAAGAAGGTACAGAAAGCAGATACAGCA - 600
  - I P S Q R P Y I P S P K K V Q K A D T A
601 - ACTGTGAGTAATACAGGTCCTCTGCTAATGTTGTAGCAGAAGTACCTAGTATTGCACCT - 660
  - T V S N T G P S A N V V A E V P S I A P
661 - CAAAAAGAAACAGCATCAAACCAGTGGCGAAAACGGAACAGCCACTTTCTCCTTATACC - 720
  - Q K E T A S K P V A K T E O P I S P Y T
721 - GCTTATGATGATTTAAAGCCACCATCATCTCCTTCTCCAACCAAGCCTAGTGAGAAGAAA - 780
  - A Y D D L K P P S S P S P T K P S E K K
781 - CAGATAAACATCAGTGATGCAGTTCACACCTATTCTTCAGATACTCCAAGTAGCATT - 840
  - Q I N I S D A V P T P I S S D T P S S I
841 - CAAGAAATAGATGGCATTCTCAGACAACATCTCCTCAAAGGGAAGGAGTCTCTATCT - 900
  - Q E I D G I S Q T T S S S K G K E S I S
901 - CCTTACGCAGCATATCCTGATTTAAAGCCTCCTAGTTCACCATCTCCGAGTGTACCAACT - 960
  - P Y A A Y P D L K P P S S P S P S V P T
961 - ACATCACTATCGAAGAGAGATACAGTAGTAGTATCAAGCAATGGACCAGCTCAACTTTCT - 1020
  - T S L S K R D T V V V S S N G P A Q L S
1021 - GTGGAAGATACACCAAAGAATGAAGAACAGCACCTTCATGAACCAAAGTCAAGGCCACTT - 1080
  - V E D T P K N E E O H L H E P K S R P I
1081 - TCACCTTATGCAATGTATGAGGACTTGAAGCCTCCTGCATCACCATCACCTTCCTTCAGA - 1140
  - S P Y A M Y E D L K P P A S P S P S F R
1141 - AAATCCTAG - 1149
  - K S *

```

Abb. 11 cDNA-Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des cDNA-Klons 3935 aus *P. sativum*
 Nach Verdau des 64 kDa-Proteins werden Peptide aufgereinigt und sequenziert. Aus dem Peptid 64-1 wird eine degenerierte Sonde (Scr64) abgeleitet, die zur Sichtung einer Uni-Zap™XR custom cDNA Bank eingesetzt wird. Der cDNA-Klon 3935 wird als positiver Klon isoliert und sequenziert. Die Aminosäuresequenzen der nach Verdau des 64kDa-Proteins mit LysC erhaltenen Peptide sind unterstrichen. Im C-terminalen Abschnitt der Aminosäuresequenz sind sich wiederholende Aminosäuresequenzmotive grau unterlegt.

Peptidabschnitte sind unterstrichen). Das kalkulierte Molekulargewicht des Proteins liegt mit 40,8 kDa (kalkulierter isoelektrischer Punkt bei pH 5,95) deutlich unter dem apparenten Molekulargewicht des isolierten Proteins. Allerdings fehlt in dem identifizierten offenen Leserahmen des cDNA-Klons 3935 ein vorgelagertes Stop-Kodon und ein Startmethionin (Abb. 11). Die Differenz zwischen dem apparenten Molekulargewicht des aufgereinigten Proteins von ~64 kDa und der kodierenden DNA-Sequenz des cDNA-Klons lassen vermuten, daß es sich um einen 5'-deletierten Teillängenklon des aufgereinigten 64kDa-Proteins handelt. Hinter dem C-terminalen Stop-Kodon findet sich ein langer nicht-translatierter Sequenzabschnitt (267bp) mit weiteren Stop-Kodonen, bis sich der polyA-Abschnitt anschließt (in Abb. 11 nicht enthalten). Im Verlauf der Arbeit war es weder über RT-PCR (RT: Reverse Transkriptase) noch mittels PCR an cDNA-Banken oder durch Sichtung weiterer cDNA- und genomischer Banken von Erbse möglich, einen Vollängenklon des 64kDa-Proteins zu isolieren (Daten nicht gezeigt).

4.2.2 Sequenzvergleiche von psTic62

Datensuchläufe mit der Aminosäuresequenz des konzeptionell translatierten cDNA-Klons 3935 (3.10) ergeben ähnliche Aminosäuresequenzen in mehreren Spezies. Nur ein genomischer Klon mit der Accession-Nummer AP002039 aus *Arabidopsis thaliana* zeigt Übereinstimmung über die gesamte Länge der Aminosäuresequenz (382 Aminosäuren). Der genomische Klon AP002039 stimmt mit dem cDNA-Klon AAC26697 aus *Arabidopsis thaliana* überein. Der cDNA-Klon von *Arabidopsis thaliana* (AAC26697) kodiert für ein Protein aus 649 Aminosäuren (Abb. 12). Als weiteres Ergebnis dieser Datensuchläufe wird der Klon mit der Accession-Nummer slr1218 von *Synechocystis* sp. PCC6803 angegeben. Die Gesamtlänge des kodierten Proteins liegt bei 219 Aminosäuren, das kalkulierte Molekulargewicht bei 23,5 kDa. Die Sequenzhomologie der von dem cDNA-Klon 3935 kodierten Aminosäuresequenz und dem *Synechocystis* sp. PCC6803-Klon slr1218 erstreckt sich ausschließlich über den N-terminalen Bereich (Abb. 12).

Alle drei Proteine zeigen in ihrem gesamten N-terminalen Bereich hohe Homologien zu Dehydrogenasen (Ermakova-Gerdes and Vermaas, 1999). Dies schließt für die Proteine aus *Arabidopsis thaliana* und *Synechocystis* sp. auch eine NAD(P)-Bindungsstelle ein, die in allen Fällen am extremem N-Terminus des Proteins liegt (Abb. 13A, Schema).

A.th-AAC26697	1	MEGTCFLRGQPLTTIPSLPSRKGFLLRWKTNRIVRFSGFKNHSVSGKRSRFDLSLRASG
P.sat-K3935	1	-----
Syn-slr1218	1	-----
		▼
A.th-AAC26697	61	PIRASSVVTEASPTNLNSKEEDLVFVAGATGKVGSRTVRELLKLGFRVRAGVRSRQRAAGS
P.sat-K3935	1	-----
Syn-slr1218	1	-----MKVLLVIGATGETGKRVVNTLTDROIAVRALVRNYDSAKA
A.th-AAC26697	121	LVQSVKEMKLQNTDEGTQRSVCVFSFAVEKLEIVECDLEKKDSIQPALGNASVVICCIGA
P.sat-K3935	1	-----VECDLEKADQIGSALGNASTVICAIGA
Syn-slr1218	40	VLP-----PG-----TEIMVGDLLLEPETIKAAIAGCTVVVINAAGA
A.th-AAC26697	181	SEKEISDITGPNRIDYLATKNLVDAATSAAKVNNFILVTSLGTNKKFGFPAAILNLFWCVLC
P.sat-K3935	28	SEKEIFDITGPNRIDYRATKNLVDAATVAKVNHFILVTSLGTNKKFGLPAAILNLFWCVLI
Syn-slr1218	75	RPS--ADLTGPFKVDYLGTRNLVDTAKANGIEQLVVLVSSLCVSNLFHP---LNLFGLILV
A.th-AAC26697	241	WKRKAEELIESGLNYAIVRPGMERPTDAYKETHNLTLLALDDTLFGGQVSNLQVAELLA
P.sat-K3935	88	WKRKAEELLASGTPYTVRPGMERPTDAYKETHNVTLSTEDTLFGGQVSNLQVAELMA
Syn-slr1218	130	WKQWGENYLRQSGVPTIVRPGGLKN---E-DNDNAIVMAGADTLFDGSIQRQVAEACV
A.th-AAC26697	301	CMAKNPQLSFSKIVEVVAETTAPLTPIEKLLLEKIPSKRPYVPPKASVATKEVKPVPTKP
P.sat-K3935	148	IMAKNPDLSYCKIVEVVAETTAPLTPAEKLLTRIPSORPYIPSPKK-VQKADTATVSN TG
Syn-slr1218	186	ESLFSF-SAKNKIVETVSKPDIEVQSFDEL FAMVR-----
A.th-AAC26697	361	VTQEP TAPKED EAPK EKNV KPRPLSPYASYEDLKPPTSP IPNSTTSVSPAKSKEVDATQ
P.sat-K3935	207	PSANVVAEVPSIAPOKETASKP-----
Syn-slr1218		-----
A.th-AAC26697	421	VPVEANVVPVDPDSTSNVPVVEVKQVEEKKERPLSPYARYENLKPPSSPSP TASSTRKSDS
P.sat-K3935	229	-----VAKTEQPLSPYTAYDDLKPPSSPSP TPKPSEKQIN
Syn-slr1218		-----
A.th-AAC26697	481	LSPGPTDSDTDKSSSTVAKTVTETAVATSVTETSVAATSVPEAVATSVTETAAPATSKMRP
P.sat-K3935	264	IS-----DAVPTPISSDTPSSIQIEIDGISQTTSSSKGKES
Syn-slr1218		-----
A.th-AAC26697	541	LSPYAIYADLKPPPTSP TPASTGPKAAASVEDNSELPGGNNDVLKTVDGNLNTIPPSTPEA
P.sat-K3935	299	LSPYAAYPDLKPPSPSPS--VPTTSLSKRDTVVVSSNG-----
Syn-slr1218		-----
A.th-AAC26697	601	VPVVS SAIDTSLASGDNTAQP KPRPLSPY TMYADMKPP TSP LPS PVTNH
P.sat-K3935	336	-PAQLSVEDTPKNEEQHLHEPKSRPLSPYAMYEDLKPPASPSPSFRKS-
Syn-slr1218		-----

Abb. 12 Sequenzvergleich der konzeptionell translatierten Aminosäuresequenz des cDNA-Klons 3935 aus *Pisum sativum*

Sequenzvergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des cDNA-Klons 3935 aus *Pisum sativum* mit *Synechocystis* sp. PCC6803 (slr1218) und *Arabidopsis thaliana* (AAC26697). Identische Aminosäuren sind schwarz, homologe Aminosäuren sind grau unterlegt. Das von dem cDNA-Klon AAC26697 aus *Arabidopsis thaliana* abgeleitete Protein trägt laut computergestützter Vorhersage mit dem Programm ChloroP 1.1 eine Prozessierungsstelle hinter der Aminosäure Arg63, die mit einem Pfeil markiert ist.

Die Datensuchläufe ergeben auch Homologien zu konzeptionell translatierten Proteinen aus *Zea mays* (BG320430), *Medicago truncatula* (BE322329, AW696271), *Lycopersicon penelli* (AW398676), *Lycopersicon esculentum* (AW442902), *Glycine max* (AW202191) und *Solanum tuberosum* (BE340947). In all diesen Fällen zeigen die cDNA-Klone Homologien zu Sequenzabschnitten im C-Terminus der abgeleiteten Aminosäuresequenz des cDNA-Klons 3935. Allerdings sind alle angegebenen cDNA-Sequenzen nur Teillängenklone der entsprechenden Proteine, die weder ein Start- oder Stop-Kodon enthalten.

Sequenzhomologien für die gesamte Primärsequenz der abgeleiteten Aminosäuresequenz des cDNA-Klons 3935 sind nur in pflanzlichen Organismen zu finden. Für alle aufgeführten cDNA-Klone läßt sich nach konzeptioneller Translation ein repetitives Aminosäuremotiv in der C-terminalen Domäne ermitteln, dessen Aminosäuresequenz über alle pflanzlichen Spezies hinweg konserviert ist.

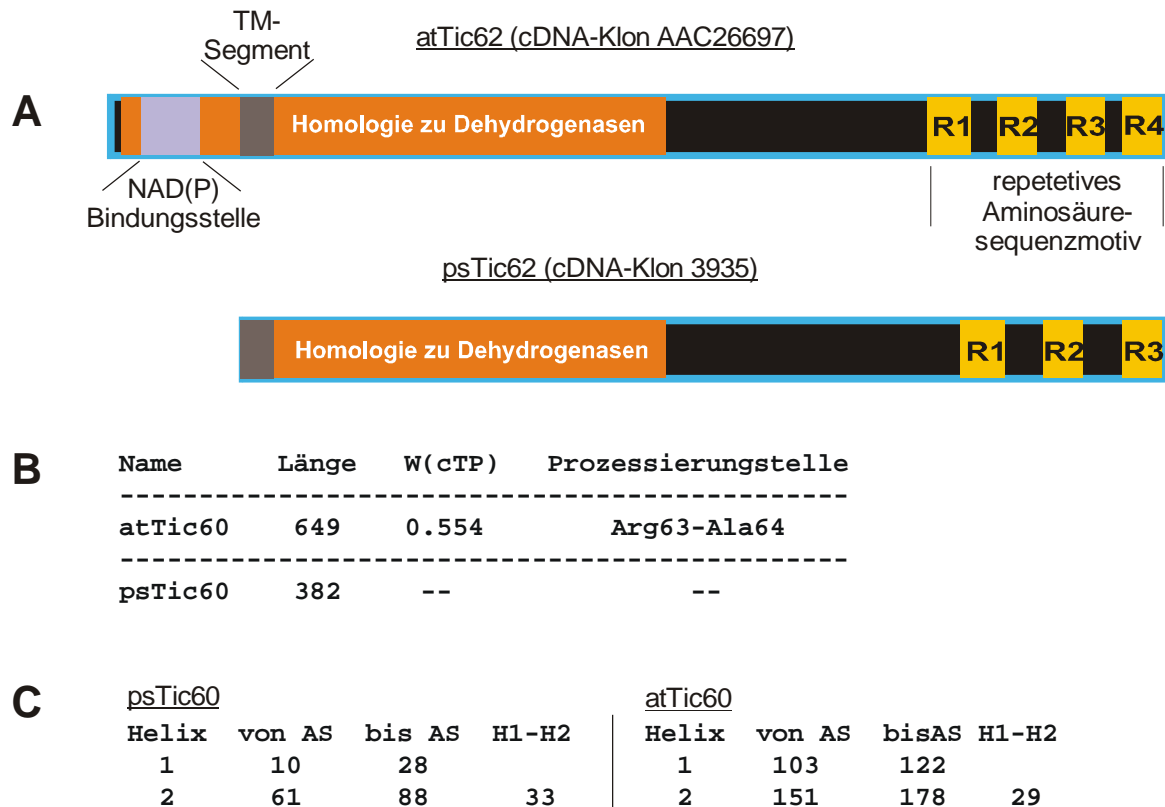


Abb. 13 Analysen zur Primärsequenz von psTic62 und atTic62

(A) Schema zur Primärstruktur von atTic62 und psTic62. Transmembrandomäne : TM-Segment (B) Vorhersage zur Lokalisierung und Prozessierung von atTic62 und psTic62. W(cTP): Wahrscheinlichkeit für ein in Plastiden dirigierendes Transitpeptid. Für psTic62 wird kein Transitpeptid und eine Prozessierungsstelle vorhergesagt. Verwendet wird für die Vorhersagen das Programm ChloroP 1.1 (3.10). (C) Vorhersage der Transmembranhelices in psTic62 (abgeleitete Aminosäuresequenz des cDNA-Klons 3935 aus *P. sativum*) und atTic62 (abgeleitete Aminosäuresequenz des cDNA-Klons AAC26697 von *A. thaliana*). Die computergestützte Vorhersage möglicher Transmembranhelices und deren Position wird mit dem Programm TMpred erstellt. H1-H2: Abstand der vorhergesagten Transmembranhelices Helix 1 und Helix 2.

Der cDNA-Klon von *Arabidopsis thaliana* (AAC26697) kodiert für ein Protein mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 69,2 kDa. Nach Vorhersage durch das Programm ChloroP1.1 (3.10) besitzt dieses putative Protein aus *A. thaliana* ein Transitpeptid, das zum Import in den Chloroplasten dirigiert (Abb. 13B). Die Prozessierungsstelle wird zwischen den Aminosäuren Arg63 und Ala64 angegeben (Abb. 13B). Daraus ergibt sich ein matures Protein von 586 Aminosäuren mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 62,1 kDa. Aufgrund der

hohen Übereinstimmung zwischen der abgeleiteten Aminosäuresequenz des cDNA-Klons 3935 von *Pisum sativum* und dem cDNA-Klon AAC26697 von *Arabidopsis thaliana* (Abb. 12 / 14) werden beide Proteine als Homologe verschiedener Spezies betrachtet. Gemäß der Nomenklaturregeln wird das Protein in den folgenden Abschnitten der Arbeit als Tic62 bezeichnet. Die Bezeichnung Tic zeigt die Zugehörigkeit des Proteins zum Importkomplex der inneren Chloroplastenhüllmembran, die beigestellte Zahl gibt das kalkulierte Molekulargewicht des Proteins (Schnell et al., 1997) mit Bezug auf den cDNA-Klon AAC26697 aus *Arabidopsis thaliana* an. Die Präfixe at (*Arabidopsis thaliana*) und ps (*Pisum sativum*) zeigen den Bezugsorganismus des betreffenden Proteins an. In Abbildung 13A sind die von den oben genannten cDNA-Klonen abgeleiteten Proteine aus *Arabidopsis thaliana* (atTic62) und *Pisum sativum* (psTic62) mit ihren Charakteristika einander gegenübergestellt, wobei für psTic62 über den N-Terminus des Proteins keine Aussagen gemacht werden können, da der entsprechende cDNA-Klon 3935 N-terminal deletiert ist.

Für das konzeptionell translatierte Protein aus Erbse (psTic62) wird kein N-terminales Transitpeptid vorhergesagt, vermutlich da die 5'-Region des cDNA-Klons nicht isoliert werden konnte (Abb. 13B). Der kalkulierte isoelektrische Punkt des maturen atTic62 liegt bei pH 5,49 und entspricht damit den Werten anderer Proteine der inneren Chloroplastenhüllmembran. Auch für die Teillängensequenz von psTic62 ergibt sich mit pH 5,95 ein kalkulierter isoelektrischer Punkt im sauren pH-Bereich. Strukturvorhersagen mit dem Programm TMpred (3.10) weisen in atTic62 und psTic62 maximal zwei Transmembranhelices aus (Abb. 13C).

AS	psTic62 AS1-382	atTic62 AS91-586
	PA	PA
Ala (A)	9.2%	9.7%
Arg (R)	2.6%	2.2%
Asn (N)	3.4%	4.4%
Asp (D)	4.7%	4.6%
Cys (C)	1.0%	1.0%
Gln (Q)	3.1%	1.6%
Glu (E)	6.3%	7.1%
Gly (G)	4.2%	3.4%
His (H)	1.0%	0.4%
Ile (I)	6.0%	3.6%
Leu (L)	7.3%	7.1%
Lys (K)	7.6%	7.7%
Met (M)	1.0%	1.0%
Phe (F)	1.6%	1.2%
Pro (P)	11.0%	12.7%
Ser (S)	11.8%	10.3%
Thr (T)	8.1%	9.9%
Trp (W)	0.5%	0.4%
Tyr (Y)	2.9%	2.6%
Val (V)	6.5%	9.1%
Asp+Glu	11.0%	11.7%
Arg+Lys	10.2%	9.9%

Abb. 14 Vergleich der Aminosäurezusammensetzung bekannter Sequenzabschnitte von psTic62 und atTic62
 Angegeben sind in tabellarischer Form die prozentualen Anteile (PA) der einzelnen Aminosäuren an der Gesamtzahl der Aminosäuren in dem ausgewählten Sequenzbereich der Proteine. Außerdem sind die prozentualen Anteile der negativ geladenen Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäuren (Asp+Glu) wie auch der positiv geladenen Aminosäuren Arginin und Lysin (Arg+Lys) am Ende der Abbildung extra ausgewiesen. Die Analyse der Aminosäurezusammensetzung erfolgt über das Programm ProtParam (3.10).

Auch die Positionen der vorhergesagten Transmembrandomänen entsprechen sich in beiden Proteinen, orientiert am C-Terminus der Proteine (Abb. 13C). Auch der Abstand zwischen den Transmembrandomänen ist in beiden Proteinen ähnlich. In Abbildung 14 sind außerdem die Aminosäurezusammensetzungen des Sequenzabschnitts von AS1-AS382 von psTic62 und von AS91-AS586 von atTic62 verglichen. Die Sequenzabschnitte weisen in ihrer Aminosäurezusammensetzung nur geringfügige Unterschiede auf, was die Homologie beider Proteine unterstreicht. Auffällig ist der sehr hohe Anteil von Prolin (11,1%) und Serin (10,4%). Der weitaus überwiegende Teil sowohl von Prolin als auch Serin liegt in einer großen C-terminalen Domäne, während z.B. die fünf Cysteine der maturen Proteine alle im N-terminalen Abschnitt zu finden sind. Auch die Anteile negativ und positiv geladener Aminosäuren sind in beiden Sequenzabschnitten nahezu identisch. Auffällig sind außerdem repetitive Aminosäuresequenzmotive im C-terminalen Abschnitt beider Proteine, die jeweils

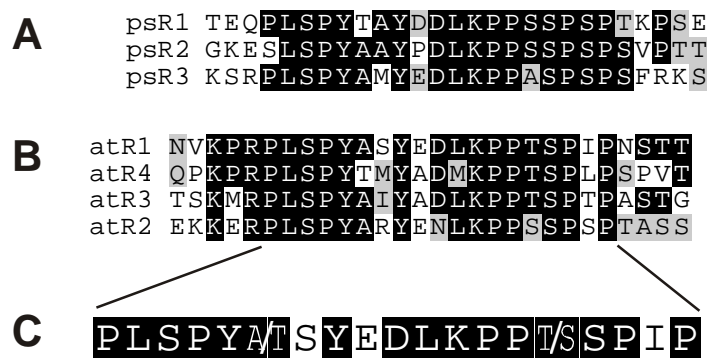


Abb. 15 Sequenzvergleich der internen repetitiven Aminosäuresequenzen in psTic62 und atTic62

(A) Sequenzvergleich der repetitiven Aminosäuresequenzabschnitte (psR1/2/3) im C-terminalen Bereich von psTic62. (B) Sequenzvergleich der repetitiven Aminosäuresequenzabschnitte (atR1/2/3/4) im C-terminalen Bereich von atTic62. (C) Repetitives Motiv von Tic62. Konsensussequenz der repetitiven Sequenzmotive von psTic62 und atTic62.

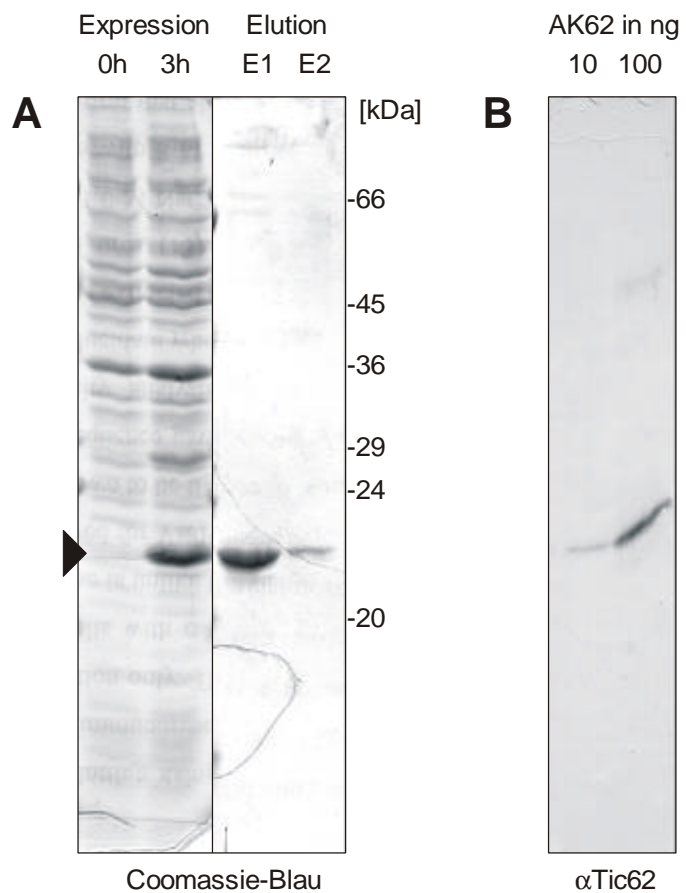
etwa 20 Aminosäuren umfassen (Abb. 15A/B). Im Sequenzvergleich von psTic62 zu atTic62 läßt sich ein Konsensusmotiv ermitteln, dessen Aminosäuresequenz über alle pflanzlichen Spezies hinweg hoch konserviert ist (Abb. 15C). Allerdings unterscheidet sich die Anzahl der repetitiven Motive zwischen den Organismen: psTic62 trägt drei Motive, während atTic62 über vier Motive verfügt und andere homologe Proteine auch mehr als vier der genannten Sequenzmotive aufweisen (Daten nicht gezeigt).

4.2.3 psTic62 ist ein integrales Protein der inneren Chloroplastenhüllmembran

Zur weiteren Charakterisierung des Proteins wurde ein Antiserum gegen ein Teillängenprotein (von AS233-AS355) der kodierenden Sequenz des cDNA-Klons 3935 hergestellt. Das rekombinant überexprimierte Peptid wird als lösliches Produkt aufgereinigt (3.1.7) und direkt für die Immunisierung von Kaninchen der Spezies „Weiße Neuseeländer“ eingesetzt (3.7).

Abb. 16 Herstellung eines Antigens von psTic62

(A) Die Qualität der Überexpression und Aufreinigung des Peptids AK62 sowie des hergestellten Antiserums wird mittels SDS-PAGE analysiert. Gezeigt sind Bakterienzellextrakte entsprechend 150µl Bakterien-suspension vor der Induktion (0h) und nach drei Stunden (3h). Nach dem Zellaufschluß wird das Peptid über Ni²⁺-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Elution des Peptids erfolgt durch 100mM Imidazol (Spuren E1 / E2). Gezeigt ist ein Gel nach Färbung mit Coomassie-Blau. Die Laufhöhe des Peptids ist mit einem Pfeil markiert. Rechts neben der Abbildung sind die Molekulargewichte der Proteine des Größenstandards angegeben. (B) In den beiden Spuren sind unterschiedliche Mengen (10ng / 100ng) des Peptids AK62 zum Test des Antiserums mittels Immundetektion aufgetragen.



In Abbildung 16 ist die Überexpression des Peptids im pET-System und nach Aufreinigung über Ni²⁺-Affinitätschromatographie (3.6.1) sowie ein Test des Antiserums gegen das eingesetzte Antigen dargestellt. Die Laufhöhe des Antigens in der SDS-PAGE bei ~22 kDa weicht deutlich von dem kalkulierten Molekulargewicht des Peptids mit 14,1 kDa ab. Diese Differenz im Laufverhalten des Peptids könnte in einer äußerst stabilen Sekundärstruktur oder der Bildung von SDS-stabilen Homodimeren begründet sein. Das Antiserum detektiert das eingesetzte Antigen (Abb. 16) und ausschließlich psTic62 in Blattextrakt und Chloroplasten (Abb. 17A, links).

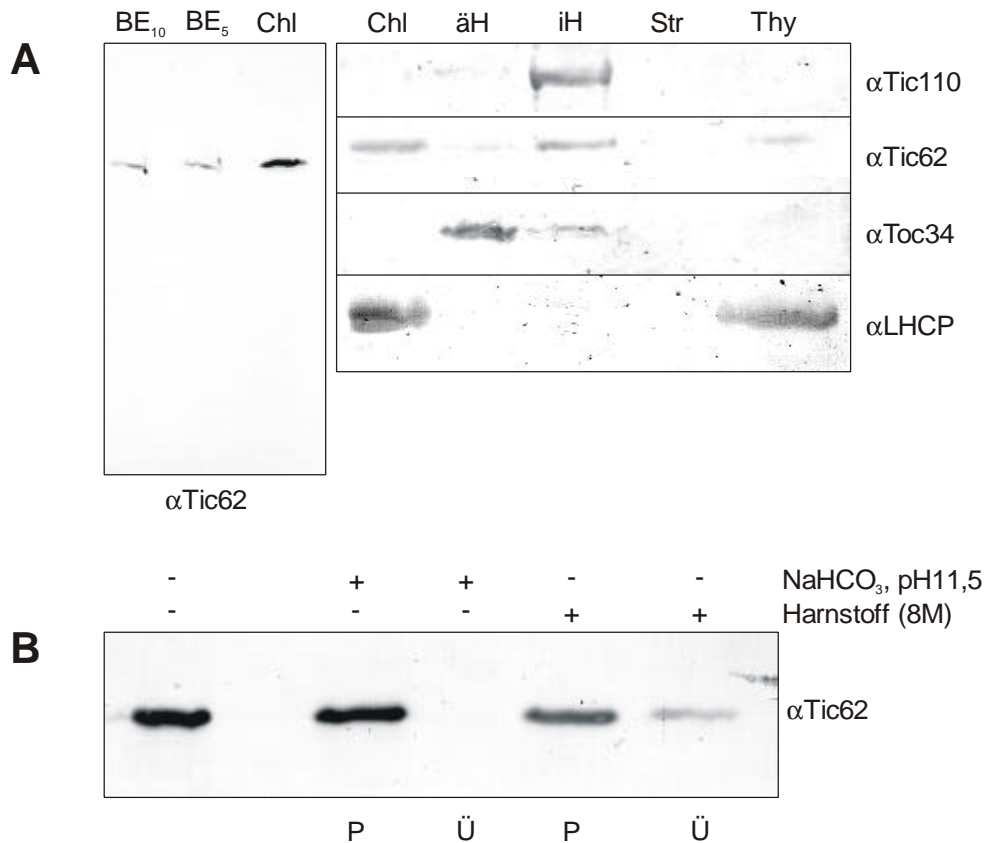


Abb. 17 Charakterisierung von psTic62

(A) Lokalisierung von psTic62. Der linke Abbildungsteil zeigt die Immundetektion mit Antiserum gegen psTic62. Aufgetragen sind Blattextrakte zehn Tage alter (BE₁₀) und fünf Tage alter Erbsen (BE₅) sowie Chloroplasten, die über SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert werden. Rechter Abbildungsteil: Für die plastidären Subfraktionen der äußeren Hüllmembran (äh), inneren Hüllmembran (iH), der Stromafraktion (Str) und der Thylakoide (Thy) werden entsprechende Proteinmengen über SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Westerntransfer erfolgt die Immundetektion mit Antiseren von Markerproteinen der eingesetzten Subfraktionen. Außerdem wird Antiserum gegen Tic62 verwendet. (B) Membranständigkeit von psTic62. Bei der alkalischen Behandlung und Harnstoffextraktion von inneren Chloroplastenhüllmembranen wird Material entsprechend 20µg Protein mit 0,1M NaHCO₃ bzw. 8M Harnstoff für 15min auf Eis inkubiert und mittels Zentrifugation (165000xg, 10min, 4°) in eine lösliche (Ü) und eine unlösliche Fraktion (P) getrennt. Die Proteine der einzelnen Fraktionen werden über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und durch Immundetektion mit Antiserum gegen Tic62 gefärbt.

Die Lokalisierung mit Antiserum gegen psTic62 weist psTic62 als Bestandteil der inneren Chloroplastenhüllmembran aus (Abb. 17A, rechts). Hierzu werden entsprechende Proteinmengen aller plästidärer Subfraktionen über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit Markerproteinen der einzelnen Subfraktionen immundekoriert. psTic62 ist ein integrales Protein der inneren Chloroplastenhüllmembran, denn trotz der Extraktion von inneren Hüllmembranen mit Natriumkarbonat oder Harnstoff ist nach der Trennung von löslichen und unlöslichen Probenanteilen das Protein hauptsächlich in der Membranfraktion zu detektieren (Abb. 17B). Diese Resultate entsprechen den computergestützten Vorhersagen eines N-terminalen Membranankers in psTic62 (Abb. 13C).

4.2.4 psTic62 exponiert eine C-terminale Domäne in das Stroma

Die Orientierung von psTic62 in der Membran wird im Vergleich zu Tic110 durch Inkubation von Vesikeln der inneren Chloroplastenhüllmembran mit verschiedenen Proteasen untersucht (3.8.4). psTic62 ist im Vergleich zu Tic110 proteaseresistent in die Membran integriert. Bei Trypsinmengen, die zur Degradation von Tic110 führen, ist psTic62 weiterhin auf der Laufhöhe des unbehandelten Proteins zu detektieren (Abb. 18, links). Der Antikörper gegen

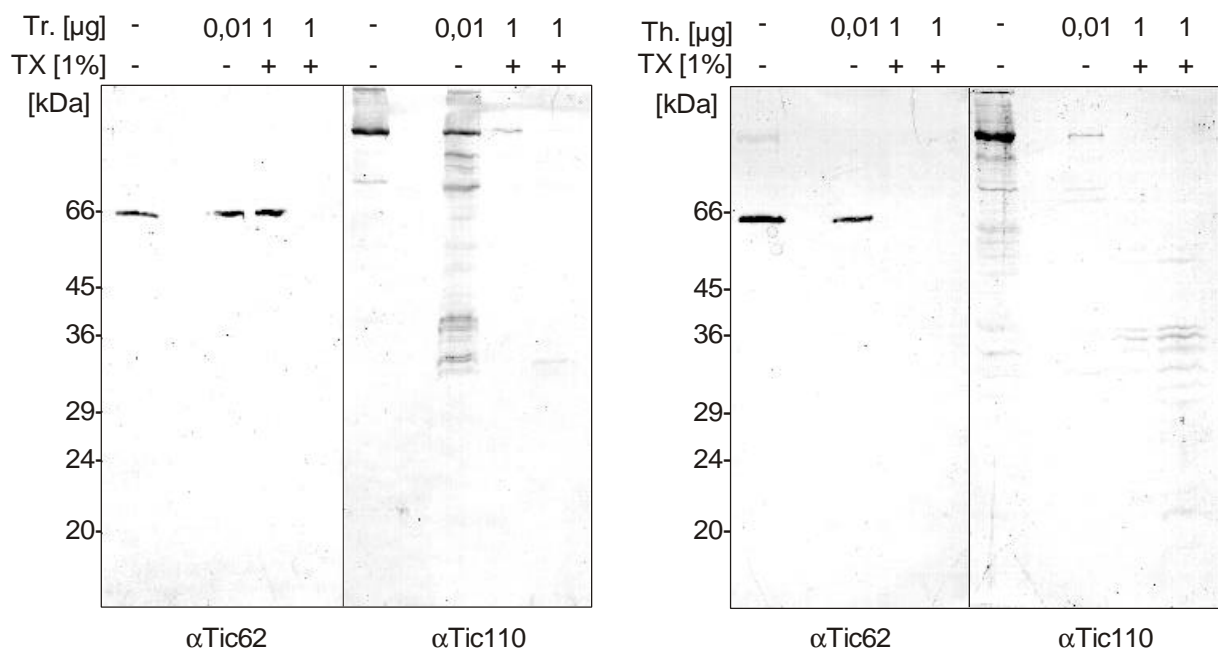


Abb. 18 Proteasebehandlung innerer Chloroplastenhüllmembranen

Proteine der inneren Chloroplastenhüllmembran (entsprechend 10 μ g Protein) werden mit unterschiedlichen Proteasen verschiedener Konzentrationen inkubiert. Die Proben werden über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und jeweils mit Antisera gegen psTic62 und Tic110 immunodetektiert. Als Kontrolle werden die Ansätze während der Proteasebehandlung durch Zugabe von 1% Triton X-100 (TX [1%]) solubilisiert. Linker Abbildungsteil: Behandlung mit Trypsin (Tr.). Rechter Abbildungsteil: Behandlung mit Thermolysin (Th.). Links neben den Abbildungsteilen sind jeweils die Molekulargewichte der Proteine des Größenstandards angegeben.

psTic62 ist gegen einen am extremen C-Terminus liegenden Sequenzabschnitt von psTic62 gerichtet. Der Trypsinverdau innerer Hüllmembranen ergibt keine Abbauprodukte, was auf einen proteolytisch geschützten C-Terminus von psTic62 hinweist. Nach der Thermolysinbehandlung innerer Hüllmembranen ist eine Reduktion an detektierbarem psTic62 zu beobachten. Eventuell beruht dies auf dem Kollabieren der Membranvesikel, wodurch beide Membranseiten für die Protease zugänglich würden. Im Vergleich zu der Trypsinbehandlung innerer Hüllmembranen ist jedoch schon bei Mengen von 10ng Thermolysin eine fast vollständige Degradation von Tic110 zu beobachten. Auch hier werden

Abbauprodukte von psTic62 nicht detektiert (Abb. 18, rechts). Die Orientierung der C-terminalen Domäne von psTic62 wird durch Immunogoldmarkierung von psTic62 genauer untersucht.

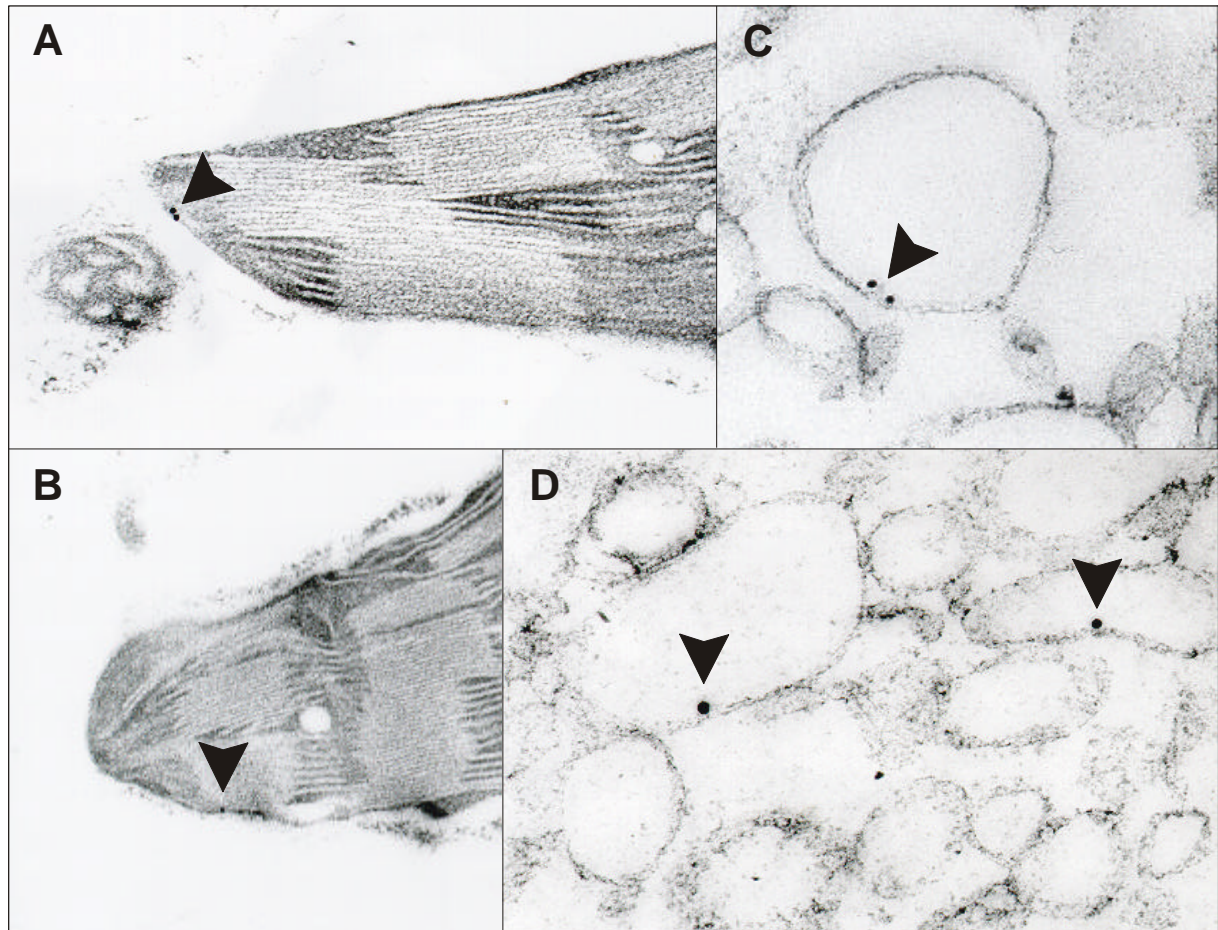


Abb. 19 Immunogoldmarkierung von Ultradünnschnitten mit Antiserum gegen psTic62

Immunogoldmarkierung von Ultradünnschnitten ganzer Erbsenblätter (A/B) und Vesikeln innerer Chloroplastenhüllmembranen (C/D) mit abgereinigtem Antiserum gegen psTic62 (3.6.2). Die Fixierung, Immunogoldmarkierung und Kontrastierung erfolgt nach den in 3.9 beschriebenen Protokollen. Immunogoldmarkierungen sind mit Pfeilen kenntlich gemacht.

Die Immunogoldmarkierung von Ultradünnschnitten ganzer Erbsenblätter und Vesikeln der inneren Chloroplastenhüllmembran zeigen eine stromale Exposition dieser C-terminalen Domäne. Für diese Versuche wurde der Antikörper zusätzlich über Affinitätschromatographie (3.6.2) gegen Thylakoidproteine abgereinigt, da zuvor Kreuzreaktionen des Antiserums an Plasmodesmata und in Thylakoiden eine eindeutige Zuordnung nicht zuließen. In Chloroplasten aus ganzen Blättern ebenso wie in Vesikeln der inneren Hüllmembran finden sich danach die Goldmarkierungen ausschließlich an der Innenseite der inneren Hüllmembran, dem Stroma zugewandt (Abb.19). Die Experimente zur Immunogoldmarkierung von psTic62 werden von Frau Glockmann (AG Soll) durchgeführt.

4.3 Komplexzugehörigkeit von psTic62

Die in Abschnitt 4.2 vorgestellten Daten zeigen psTic62 als neue Komponente des Tic-Komplexes, die über Silberfärbung sowohl in der denaturierenden Tricin-SDS-PAGE des BN-Tic-Komplexes (Abb. 3B) als auch in den entsprechenden vereinigten Fraktionen 9-13 des Saccharosegradienten aus der Dichtegradientenzentrifugation (Abb. 4A) detektiert wird. In

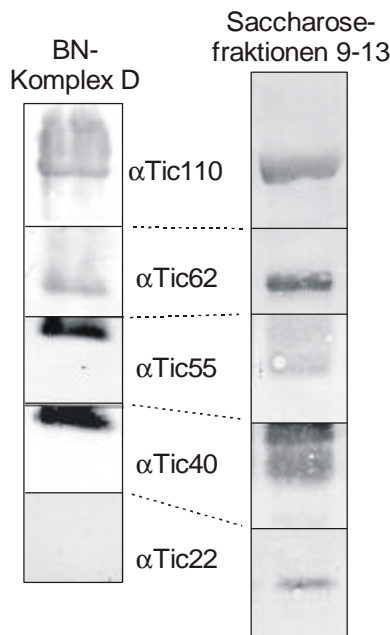


Abb. 20 Zugehörigkeit von psTic62 zum Tic-Komplex

Die linke Spur zeigt die Auftrennung des über BN-PAGE isolierten Ausgangskomplexes in einer denaturierenden Geldimension. In der rechten Spur ist die Auftrennung des über Dichtegradientenzentrifugation in den Fraktionen 9-13 isolierten Komplexes mittels SDS-PAGE dargestellt. Zwischen den Spuren sind die verwendeten Antiseren gegen verschiedene Tic-Komponenten zugeordnet.

diesem Ausgangskomplex, isoliert über BN-PAGE (Abb. 20, links) oder Dichtegradientenzentrifugation (Abb. 20, rechts) ist psTic62 als Komponente beider Tic-Komplexe über Immundetektion mit Antiserum gegen psTic62 nachzuweisen. Auch Tic40 ist zu detektieren, während Tic22 in der hier gezeigten Präparation nicht als Komponente des BN-Tic-Komplexes detektiert wird. Inwieweit dies ein Detektionsproblem ist oder tatsächlich auf ein Fehlen von Tic22 in diesem Ausgangskomplex hindeutet, kann nicht zweifelsfrei geklärt werden.

Quervernetzungsexperimente sind Grundlage für die Identifikation einer Reihe von Importkomponenten (Ma et al., 1996; Kouranov and Schnell, 1997). Auch über die Co-Immunpräzipitation mit Toc- oder Tic-Komponenten ist die Zugehörigkeit von Proteinen zur Importmaschinerie (Stahl et al., 1999; Caliebe et al., 1997) belegt. Auch für psTic62 soll die Zugehörigkeit zum Tic-Komplex über diese beiden Methoden untersucht werden.

Nach Quervernetzungsversuchen an Vesikeln der inneren Hüllmembran mit CuCl_2 und Natriumtetrathionat werden mit Antiserum gegen psTic62 keine spezifischen Produkte isoliert. Quervernetzungsexperimente mit Bis[sulfosuccinimidyl]Suberat (BS^3) und Dithiobis[Succinimidyl]Propionat (DSP) an inneren Hüllmembranen ergeben ein Produkt bei ca. 110-120 kDa (Abb. 21, Produkt durch Pfeil markiert), welches sich mit Antiserum gegen psTic62 anfärben läßt. Der Partner von psTic62 in diesem Produkt der Quervernetzung kann wegen der geringen Mengen in weiterführenden Experimenten nicht identifiziert werden.

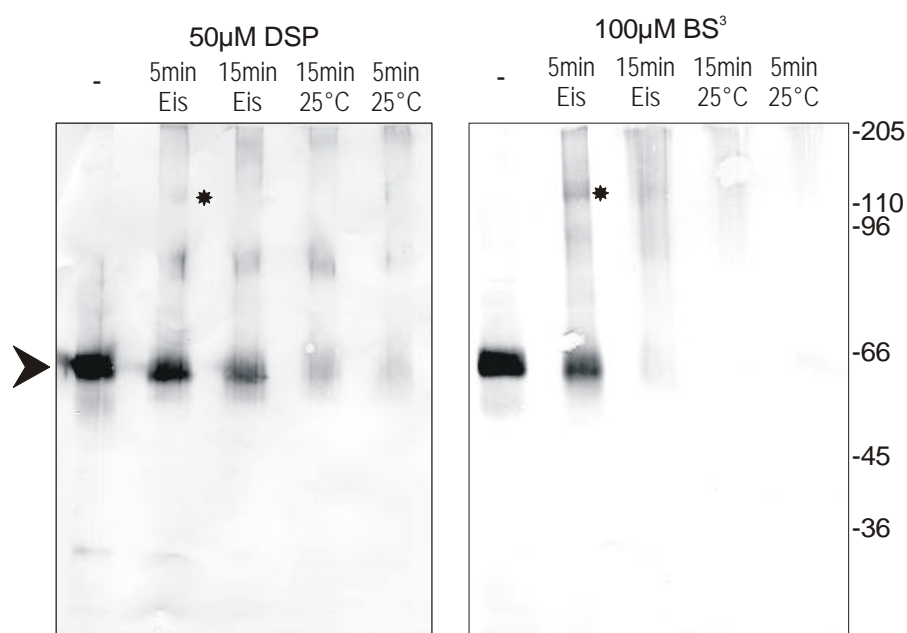


Abb. 21 Quervernetzungsexperimente von psTic62

Innere Chloroplastenhüllmembranen ($20\mu\text{g}$ Protein) werden mit den Quervernetzungsreagenzien DSP und BS^3 für 5-15min bei 25°C oder auf Eis (4°C) inkubiert, über SDS-PAGE aufgetrennt, nach Transfer auf Nitrozellulosemembran mit Antiserum gegen Tic62 immundekoriert. Quervernetzungsprodukte sind durch Sternchen, psTic62 mit einem Pfeil markiert. Auf der rechten Seite der Abbildung sind die Molekulargewichte des Größenstandards angegeben.

Mit Ausnahme der Quervernetzungsexperimente trennen die bisher beschriebenen Methoden (BN-PAGE, Dichtegradientenzentrifugation, Gelfiltration) Proteinkomplexe entsprechend ihres Molekulargewichts auf. Um eine direkte Interaktion der einzelnen Komponenten in diesem aufgereinigten zentralen Tic-Komplex zu zeigen, werden Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Co-Immunpräzipitationen mit Antiseren gegen verschiedene Tic-Komponenten nach Solubilisierung innerer Hüllmembranen mit nicht-ionischen Detergentien ergeben keine verwertbaren Resultate (Daten nicht gezeigt).

Weitere Ansätze mit BN-Tic-Eluat und Antiseren gegen Tic110, Tic55 und psTic62 sowie mit Preimmunserum werden durchgeführt. Innere Chloroplastenhüllmembranen werden über BN-PAGE aufgetrennt, der isolierte BN-Tic-Komplex elektrophoretisch aus dem BN-Gel eluiert

und das Eluat einer Immunpräzipitation unter nativen Bedingungen (3.8.1) unterzogen. Als Kontrolle wird die Immunpräzipitation auch mit Preimmunserum durchgeführt. Das Antiserum gegen psTic62 fällt Tic110 und psTic62 aus dem BN-Eluat (Abb. 22, Spur 2), wobei die Effizienz etwas niedriger ist als in den Parallelansätzen mit Antiseren gegen Tic110 und Tic55. Das Laufverhalten des Antigens differiert in der SDS-PAGE zwischen dem kalkulierten und apparenten Molekulargewicht. Wenn dies auf äußerst stabile

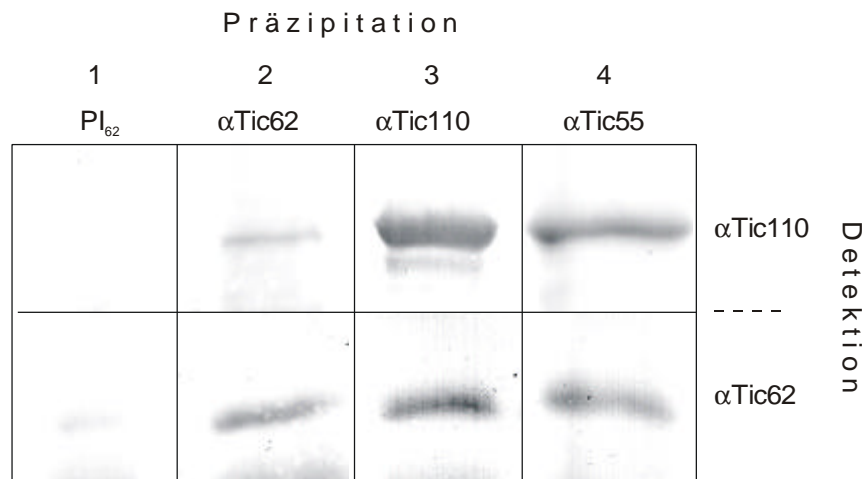


Abb. 22 Immunpräzipitation des BN-Tic-Eluats

Innere Chloroplastenhüllmembranen (600µg Protein) werden solubilisiert und die Proteine über Blau-Native PAGE (3.5.2) getrennt, der isolierte Tic-Komplex elektroeluiert (3.5.4) und einer Immunpräzipitation unter nativen Bedingungen unterzogen (3.8.1). Als Kontrolle wird die Immunpräzipitation mit Preimmunserum (PI₆₂) durchgeführt.

Sekundärstrukturen des Antigens zurückzuführen ist, könnte die Erkennung bestimmter Epitope von psTic62 durch den Antikörper nach der Elektroelution eventuell erschwert sein. Das Antiserum gegen Tic110 fällt psTic62 und Tic110 (Abb. 22, Spur 3). Tic55 und die schweren Ketten des primären Antikörpers, die bei etwa 50 kDa laufen, werden in der SDS-PAGE nur unzureichend getrennt. Daher ist auf die Detektion von Tic55 nach der Immunpräzipitation verzichtet worden. In der Immunpräzipitation mit Antiserum gegen Tic55 werden allerdings sowohl psTic62 als auch Tic110 co-immunpräzipitiert (Abb. 22, Spur 4). In der Kontrolle mit Preimmunserum wird keines der genannten Tic-Proteine präzipitiert.

4.4 Funktionelle Charakterisierung von psTic62

Tic55 ist eine Komponente des Tic-Komplexes, die sich bereits aufgrund eines von der Primärsequenz abzuleitenden Eisen-Schwefel-Zentrums und einer mononukleären Eisenbindungsstelle als Redoxcarrier anbietet. Die Sequenzvergleiche von Tic62 weisen auf die Homologie des N-Terminus von Tic62 zu Dehydrogenasen hin (Ermakova-Gerdes et al., 1999). Die Primärstrukturanalyse von atTic62 zeigt entsprechend dieser Homologie eine NAD(P)-Bindungsstelle am N-Terminus (Abb. 23). Für psTic62 ist diese NAD(P)-

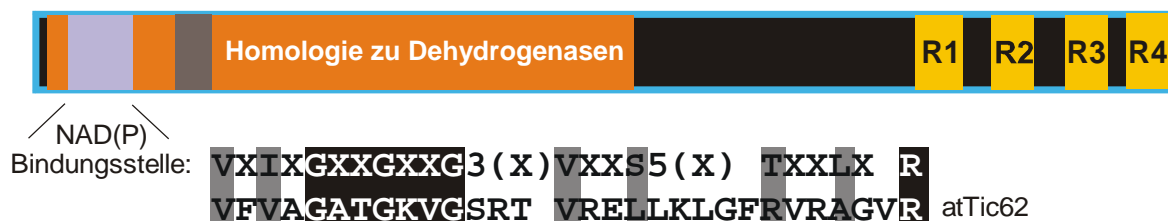


Abb. 23 Schematische Darstellung der Primärstruktur von atTic62

Sequenzvergleiche von atTic62 ergeben für den N-Terminus des Proteins Ähnlichkeiten zu Dehydrogenasen, inklusive einer konservierten NAD(P)-Bindungsstelle. Im unteren Abbildungsteil ist der Vergleich der NAD(P)-Bindungsstelle (Ermakova-Gerdes and Vermaas, 1999) mit der N-terminalen Aminosäuresequenz von atTic62 dargestellt. Konservierte Aminosäuren sind schwarz, die Positionen hydrophober Aminosäuren grau unterlegt.

Bindungsstelle nicht bekannt, da der isolierte cDNA-Klon am 5'-Ende deletiert ist. Der bisher für psTic62 bekannte Sequenzabschnitt (AS1-AS382) enthält keine vorhergesagte NAD(P)-Bindungsstelle. Um die für atTic62 vorhergesagte NAD(P)-Bindungsstelle auch für psTic62 zu verifizieren und darüberhinaus deren Funktionsfähigkeit zu demonstrieren, werden NAD(P)-Bindungsassays an inneren Chloroplastenhüllmembranen durchgeführt.

4.4.1 psTic62 bindet NAD/NADP

Für die Anbindungsexperimente soll radioaktiv markiertes NAD und NADP eingesetzt werden. Da ^{32}P -NADP nicht käuflich zu erwerben ist, wird in einer Phosphorylierungsreaktion ^{32}P -NAD mit ATP und NAD-Kinase (Sigma, Deisenhofen) für 15min bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle werden in allen Experimenten drei verschiedene Ansätze mit radioaktiv markierten Nukleotiden eingesetzt:

- a) NAD : ^{32}P -NAD
- b) NAD+ : Phosphorylierungsansatz mit ^{32}P -NAD und NAD-Kinase, ohne ATP
- c) NADP+ : Phosphorylierungsansatz mit ^{32}P -NAD, NAD-Kinase und ATP

Die inneren Hüllmembranen werden vor der Inkubation mit radioaktiv markierten Nukleotiden entweder nicht behandelt, mit Triton X-100 oder SDS solubilisiert. Anschließend werden die inneren Hüllmembranen mit radioaktiv markiertem NAD, NAD⁺ oder NADP⁺ inkubiert und gleichzeitig mit UV-Licht (λ=254nm) bestrahlt (3.8.3). Die Analyse erfolgt nach SDS-PAGE und anschließendem Westerntransfer über Autoradiographie und Immundetektion mit Antiserum gegen psTic62. Auf der Höhe von 64 kDa wird nach Autoradiographie eine Bande nachgewiesen, die nach Anbindung von NAD, NAD⁺ oder NADP⁺ zu sehen ist (Abb. 24, NAD-Anbindung nicht gezeigt). Das Antiserum gegen

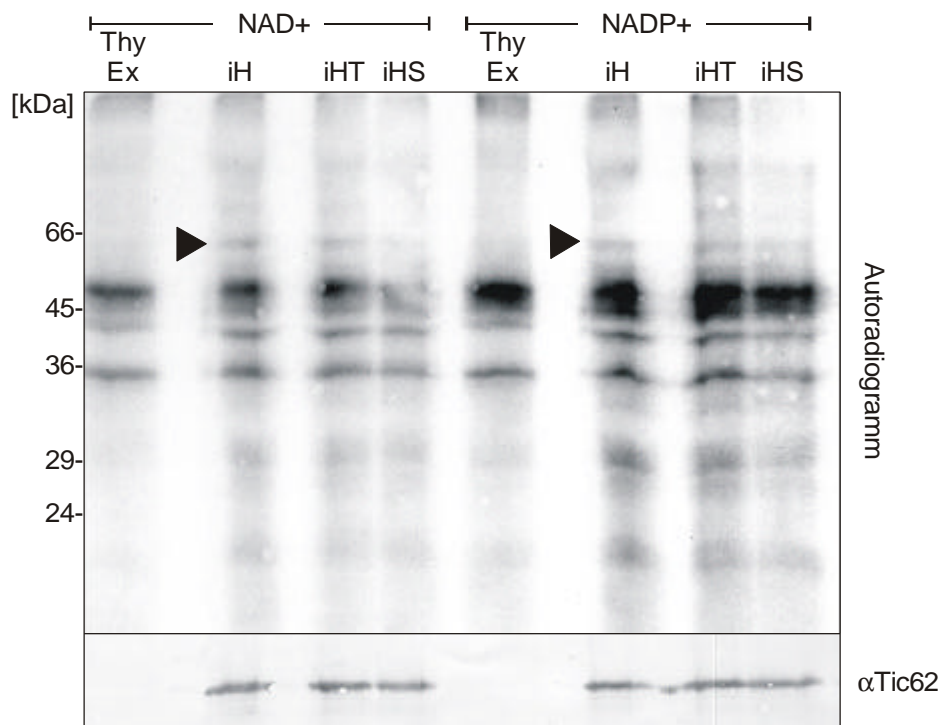


Abb. 24 Anbindung von NAD⁺/NADP⁺ an psTic62 aus Erbse

Innere Chloroplastenhüllmembranen werden entweder nicht behandelt (iH), mit 0,1% Triton X-100 (iHT) oder 1% SDS solubilisiert (iHS) und während der anschließenden Inkubation mit radioaktiv markiertem NAD⁺/NADP⁺ mit UV-Licht bestrahlt. Auf der Laufhöhe von Tic62 ist im Autoradiogramm eine Bande zu detektieren, die auch mit Antiserum gegen Tic62 angefärbt wird. Parallel werden Kontrollen mit Tic62-freiem Thylakoidextrakt (ThyEx) durchgeführt. Die Immundetektion im unteren Teil der Abbildung zeigt, daß Tic62 nicht in den Ansätzen mit Thylakoidextrakt (ThyEx) zu detektieren ist. Im Autoradiogramm ist außerdem sowohl in den Ansätzen mit inneren Hüllmembranen als auch Thylakoidextrakt nach Anbindung von NAD⁺ und NADP⁺ eine radioaktive Bande bei 35kDa zu detektieren, was der Laufhöhe der Ferredoxin-NADP Oxidoreduktase (FNR) entspräche. Eine Immundetektion mit Antiserum gegen FNR wurde jedoch nicht durchgeführt. Links neben der Abbildung sind die Molekulargewichte der Proteine des Größenstandards angegeben.

psTic62 reagiert ebenfalls mit dieser Bande, sodaß davon ausgegangen werden kann, daß auch psTic62 eine NAD(P)-Bindungsstelle innerhalb des nicht bekannten N-Terminus enthält. Die Bindung von NAD(P) an psTic62 erfolgt nicht nach Solubilisierung der Membran mit SDS, welches die Sekundärstruktur von Proteinen durch Denaturierung zerstört. Da psTic62

sowohl NAD⁺ als auch NADP⁺ bindet, ist eine Aussage über die Präferenz von psTic62 für eine der beiden Nukleotidformen auf der Basis der durchgeführten Experimente nicht möglich. Die Effizienz der NADP-Synthese aus ³²P-NAD vor dem Anbindungsexperiment ist nicht geklärt, und die Anteile an NAD und NADP in entsprechenden Anbindungsversuchen wurden nicht ermittelt. Als Kontrollen werden Anbindungsexperimente mit Thylakoidextrakt (3.8.6) durchgeführt, welches kein psTic62 enthält (Abb. 24, Spuren ThyEx, Immundetektion mit Antiserum gegen psTic62). Prominente Banden im Bereich von ~55 kDa bis ~35 kDa können keinen bekannten Proteinen zugeordnet werden. Die Signale werden in allen Ansätzen detektiert, in denen die NAD-Kinase enthalten ist. Ob die Banden von NAD(P)-bindenden Proteinen resultieren, die sowohl im Thylakoidextrakt als auch in inneren Hüllmembranen vorhanden sind, oder als unspezifische Signale zu bewerten sind, bleibt offen. Als eine NAD(P)-bindende Komponente des Thylakoidextrakts kommt die Ferredoxin-NADP⁺ Oxidoreduktase (Molekulargewicht = 34,9 kDa) in Frage. Die Bande bei ~35 kDa kann der Ferredoxin-NADP⁺ Oxidoreduktase jedoch nicht eindeutig zugeordnet werden.

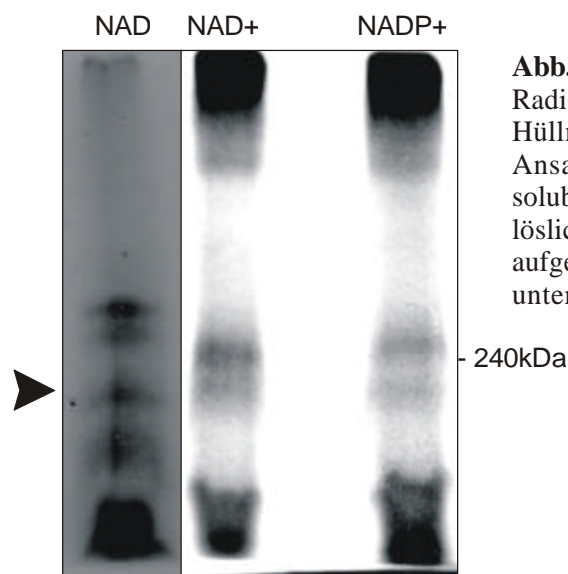


Abb. 25 Anbindung von NAD(P) an den Tic-Komplex
Radioaktiv markiertes NAD, NAD⁺, NADP⁺ wird an innere Hüllmembranen durch UV-Vernetzung angebinden, der Ansatz mit 3% n-Decylmaltosid solubilisiert, nicht-solubilisierendes Material pelletiert (12000xg / 8min) und die lösliche Proteinfraction des Überstands über BN-PAGE aufgetrennt. Das getrocknete Gel wird einer Autoradiographie unterzogen. Es werden drei unterschiedliche Ansätze aufgetragen. NAD: Anbindung von radioaktiv markiertem NAD an innere Hüllmembranen; NAD⁺: Anbindung von NAD⁺ an innere Hüllmembranen; NADP⁺: Anbindung von NADP⁺ an innere Hüllmembranen. Die Laufhöhe des Tic-Komplexes ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

In einem weiteren Experiment kann durch Anbindung von radioaktiv markiertem NAD/NAD⁺/NADP⁺ und anschließender BN-PAGE die Bindung von NAD an den Tic-Komplex gezeigt werden. Die Autoradiographie des BN-Gels ergibt u.a. eine radioaktive Bande auf der Laufhöhe des Tic-Komplexes (Abb. 25). Bezugnehmend auf die bisher vorgestellten Daten scheint psTic62 der einzige Kandidat für eine NAD(P)-bindende Komponente im Tic-Komplex. Auch aus diesem Experiment läßt sich keine Präferenz einer Komponente des Tic-Komplexes für eines der beiden Nukleotide ableiten. Außerdem werden weitere Banden im BN-Gel detektiert. Die Identifizierung dieser Proteinkomplexe und/oder

NAD(P)-bindender Untereinheiten ist nicht möglich, da keine Proteine oder Proteinkomplexe der inneren Chloroplastenhüllmembran beschrieben sind, die entweder NAD oder NADP binden.

4.4.2 psTic62 rekrutiert die Ferredoxin-NADP⁺ Oxidoreduktase an der inneren Chloroplastenhüllmembran

Einen weiteren Ansatz zur Klärung der Funktion von Tic62 bietet ein repetitives Sequenzmotiv im C-terminalen Abschnitt des Proteins. Repetitive Aminosäuresequenzmotive sind oft Bestandteil von Protein-Protein-Wechselwirkungen (Lamb et al., 1995). Wie bereits in Abschnitt 4.2.2 ausgeführt, umfassen die repetitiven Sequenzmotive von psTic62 etwa 20 hydrophobe Aminosäuren. Um die mögliche Funktion der repetitiven Sequenzmotive von psTic62 als Domänen für eine Interaktion mit anderen Proteinen zu testen und mögliche Partner zu identifizieren, werden verschiedene Konstrukte von psTic62 zur Sichtung einer HybriZAP™ Two-Hybrid cDNA Bank eingesetzt. Die eingesetzten psTic62-Konstrukte sind in Abbildung 26B dargestellt.

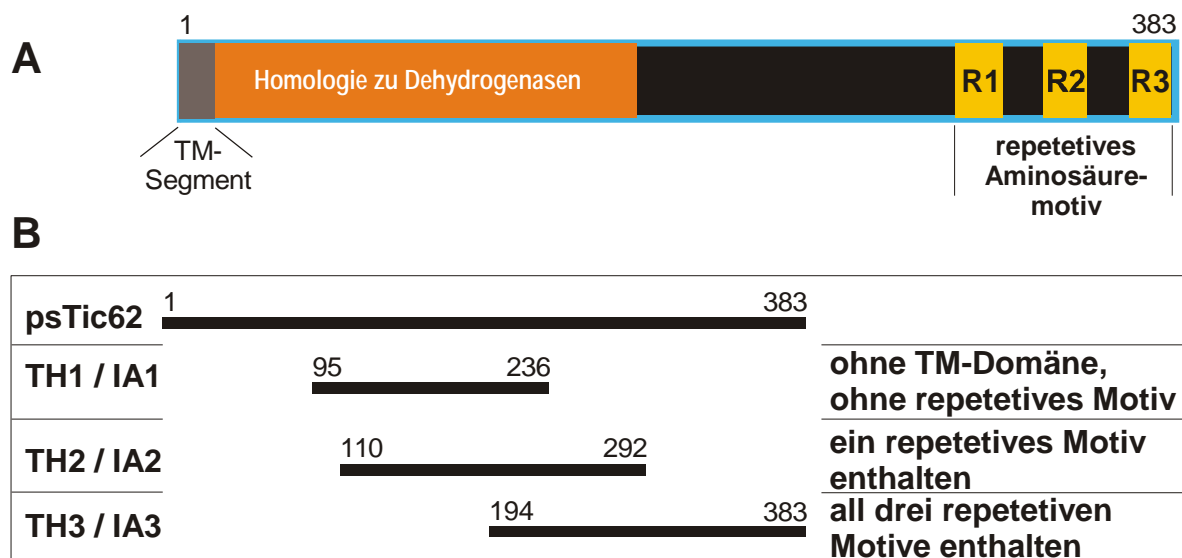


Abb. 26 Übersicht der psTic62-Konstrukte zur Sichtung einer HybriZAP™ Two-Hybrid cDNA Bank (TH1/2/3) und die Durchführung von Bindungsexperimenten (IA1/2/3)

(A) Schematische Darstellung der Primärsequenz von psTic62. Im C-terminalen Abschnitt sind die Positionen der drei repetitiven Aminosäuresequenzmotive (R1/2/3) angedeutet. TM-Segment: Transmembrandomäne. (B) Die drei Konstrukte TH1, TH2 und TH3 enthalten unterschiedliche Sequenzabschnitte von psTic62, die in den pBD-Vektor subkloniert werden. Identische Sequenzabschnitte werden in pET21d-Vektor subkloniert (IA1 / IA2 / IA3), in B121(DE3) überexprimiert und für Bindungsexperimente von psTic62 eingesetzt. Die Zahlen an den Sequenzblöcken geben die Positionen der ersten und letzten Aminosäure an, orientiert an der Gesamtlänge des Teillängenproteins psTic62 (A). TM-Domäne: Transmembrandomäne

Insgesamt werden vier Klone im Verlauf der Sichtungen durch Blaufärbung nach Galaktosidase-Aktivierung identifiziert, von denen drei mit dem Konstrukt TH3 und eines mit dem Konstrukt TH2 isoliert werden. Konstrukt TH1 ergibt im Galaktosidase-Assay kein positives Resultat.

pBD-Konstrukt	pAD-Konstrukt	Sichtungsergebnis
TH3	FNR	+++
TH2	FNR	+
TH1	FNR	-
-	FNR	-
Toc12	FNR	-
Tic110 [1]	FNR	-
Tic110 [2]	FNR	-
Tic110 [3]	FNR	-
Tic110 [4]	FNR	-
Tic110 [5]	FNR	-
pLaminC	FNR	-
p53	FNR	-
p53	pSV40	+

Tab. 1 Verifikation der Ergebnisse aus der Sichtung der HybriZAP™ Two-Hybrid cDNA Bank mit psTic62-Konstrukten

Als Ergebnis der Sichtung der HybriZAP™ Two-Hybrid cDNA Bank wird die Ferredoxin-NADP Oxidoreduktase (FNR) als Interaktionspartner von psTic62 identifiziert. Zur Bestätigung des Sichtungsergebnisses werden nochmals die verwendeten psTic62-Konstrukte mit der FNR co-transformiert. Als Kontrolle auf Autoinduktion wird außerdem die FNR allein in Hefen transformiert. Darüberhinaus werden auch ausgewählte Konstrukte verschiedener Sequenzabschnitte von Tic110 mit der FNR co-transformiert und die Kontrolltransformationen des Herstellers durchgeführt. Dazu zählen die Co-Transformationen der FNR mit den Plasmiden p53 bzw. pLaminC. Als methodische Positivkontrolle erfolgt die Co-Transformation der Hefen mit den Kontrollplasmiden pSV40 und p53.

Alle vier cDNA-Klone werden nach Sequenzierung als Vorstufenprotein der Ferredoxin-NADP⁺ Oxidoreduktase (FNR) aus Erbse (Accession-Nummer X99419) identifiziert. Das Vorstufenprotein der FNR besteht aus 377 Aminosäuren, die Prozessierungsstelle liegt zwischen den Aminosäuren 51 und 52. Das mature Protein hat ein kalkuliertes Molekulargewicht von 34,9 kDa.

Zur Verifikation der Sichtungsergebnisse wurden Kontrolltransformationen durchgeführt. Nach der Transformation der FNR ist keine Autoinduktion zu detektieren. Auch die Kontrolltransformationen verschiedener Konstrukte von Tic110 oder Toc12 (siehe 2.9) mit der FNR ergeben in keinem der Fälle eine Aktivierung der Galaktosidase. Diese Ergebnisse

entsprechen somit den Erwartungen, da von einer Interaktion von Tic110 oder Toc12 mit der FNR nicht ausgegangen wurde (Toc12 ist als Protein der äußeren Chloroplastenhüllmembran identifiziert). Auch die ausgewiesenen Positiv- und Negativkontrollen des Herstellers bestätigen den korrekten Verlauf der Sichtung der HybriZAP™ Two-Hybrid cDNA Bank. Die Co-Transformation der Kontrollplasmide p53 oder pLaminC mit der FNR ergeben keine Galaktosidase-Aktivierung, während die Co-Transformation mit den Plasmiden pSV40 und p53 (Positivkontrolle des Herstellers) mit einer Blaufärbung die erwartete Aktivierung der Galaktosidase zeigen. In allen weiteren Co-Transformationen der psTic62-Konstrukte TH3 und TH2 mit der FNR ist die Interaktion der Proteine über Blaufärbung nachzuweisen, während bei Verwendung des Konstrukts TH1 keine positiven Signale detektiert werden.

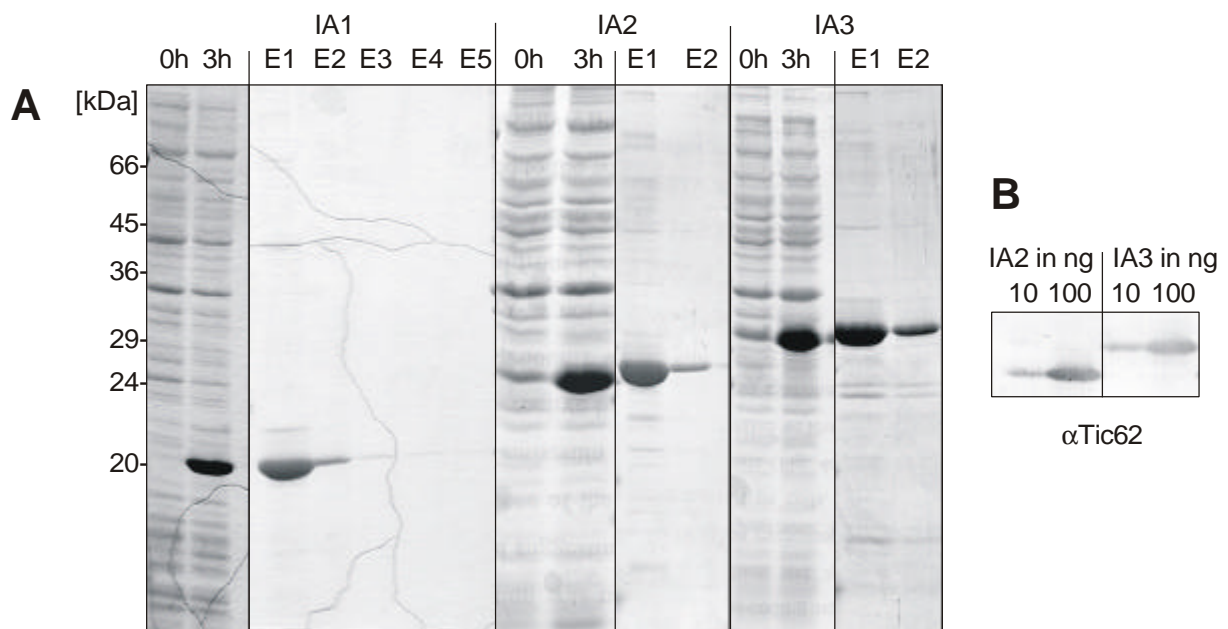


Abb. 27 Herstellung der psTic62-Peptide IA1, IA2 und IA3

(A) Die Qualität der Überexpression und Aufreinigung der Peptide wird mittels SDS-PAGE analysiert. Aufgetragen werden Bakterienzelleextrakte (entsprechend 150µl Bakteriensuspension) vor der Induktion (0h) und nach drei Stunden (3h). Nach dem Zellaufschluß werden die Peptide jeweils durch Affinitätschromatographie (3.6.1) aufgereinigt. Die Elution der Peptide erfolgt durch 100mM Imidazol (E1 / E2). Gezeigt ist ein Gel nach Coomassie-Blau-Färbung. (B) Verschiedene Mengen der psTic62-Peptide IA2 und IA3 werden über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit Antiserum gegen psTic62 immundekoriert. Das verwendete Antiserum ist gegen einen extremen C-terminalen Abschnitt von psTic62 generiert und erkennt nicht die Aminosäuresequenz des zum N-Terminus hin gelegenen Peptids IA3.

Um die Interaktion zwischen psTic62 und der Ferredoxin-NADP⁺ Oxidoreduktase auf anderem Wege zu bestätigen, wird ein Bindungsexperiment etabliert (3.8.7). Die rekombinant exprimierten psTic62-Peptide (IA1, IA2, IA3) tragen einen Histidin₆-Rest am C-Terminus und entsprechen den im Hefe-Zwei-Komponenten-System verwendeten Konstrukten (Abb.

26B). Die Überexpression und Aufreinigung der drei Konstrukte IA1, IA2, IA3 ist in Abbildung 27 gezeigt. Alle drei Konstrukte werden löslich überexprimiert und sind mittels eines N-terminalen Histidin₆-Rests über Ni²⁺-Affinitätschromatographie aufzureinigen. Wie schon bei der Herstellung des Antigens AK62 (Abb. 16) zeigt sich in der SDS-PAGE, daß das apparente Molekulargewicht aller drei Konstrukte zwischen 20 kDa und 30 kDa liegt, während die kalkulierten Massen mit 12-20 kDa berechnet werden (Abb. 27).

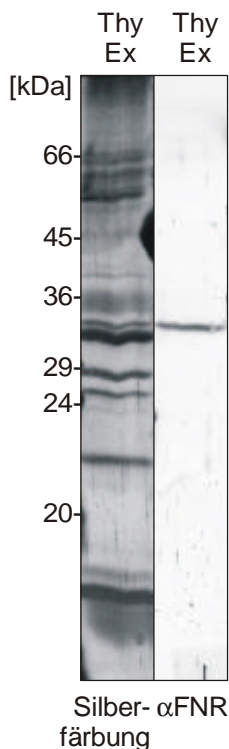


Abb. 28 Salzextraktion von Thylakoiden

Thylakoide (entsprechend 1,25mg Chlorophyll) werden pelletiert und in 20mM Tris, pH7,5 / 500mM NaCl resuspendiert, 30min auf Eis inkubiert und wiederum pelletiert. Der Überstand (ThyEx) wird für weitere Experimente eingesetzt. 1/100 des Proteinextrakts wird über SDS-PAGE aufgetrennt und einer Silberfärbung (Spur links) unterzogen oder auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit Antiserum gegen FNR immundekoriert (Spur rechts). Die Molekulargewichte der Proteine des Größenstandards sind links neben der Abbildung angegeben.

Um ein Proteinextrakt mit FNR zu erhalten, werden Thylakoide entsprechend 1,25mg Chlorophyll isoliert und anschließend einer Extraktion mit 10mM Tricin/KOH, pH 7,8 / 500mM NaCl unterzogen (3.8.6). Außerdem enthält dieses grobe Thylakoidextrakt eine Reihe weiterer Proteine (Abb. 28). Die FNR kann als Komponente dieses Thylakoidextrakts durch Immundetektion nachgewiesen werden (Abb. 28).

Für die Interaktionsversuche wird das Thylakoidextrakt (3.8.6) verdünnt, um eine Endkonzentration von 5mM NaCl zu erreichen. Nach Bindung der Peptide IA2 und IA3, die jeweils repetitive Aminosäuresequenzmotive enthalten, bindet die FNR an das Ni²⁺-Affinitätsmaterial. In beiden Fällen ist die FNR auch im Durchfluß zu detektieren, da nicht der gesamte FNR-Pool an die jeweiligen psTic62-Peptide gebunden wird; FNR kann nicht durch Salz eluiert werden (Abb. 29A). Dies unterstreicht die Spezifität und Stärke der Interaktion zwischen dem jeweiligen Peptid und der gebundenen FNR. Als Kontrolle wird Thylakoidextrakt ohne psTic62-Peptid über Ni²⁺-Affinitätsmaterial gegeben, um die unspezifische Bindung der FNR an das Material auszuschließen. Die FNR wird in diesem Fall

allein im Durchfluß detektiert (Abb. 29A). Das Bindungsexperiment mit dem psTic62-Konstrukt IA1 zeigt das gleiche Ergebnis wie die Kontrolle (Abb. 29A, IA1). Die FNR ist nur im Durchfluß zu detektieren, da das psTic62-Peptid IA1 die FNR nicht binden kann. IA1 trägt keines der repetitiven Aminosäuresequenzmotive aus psTic62. In allen Experimenten können die verwendeten psTic62-Peptide über die Ni²⁺-Affinitätschromatographie nach der Anbindung des Thylakoidextrakts aufgereinigt werden (Daten nicht gezeigt). Die FNR ist ein NAD(P)-bindendes Enzym, welches das Nukleotid über hydrophobe Wechselwirkungen bindet (Bruns and Karplus, 1995). Weiterhin gilt es daher auszuschließen,

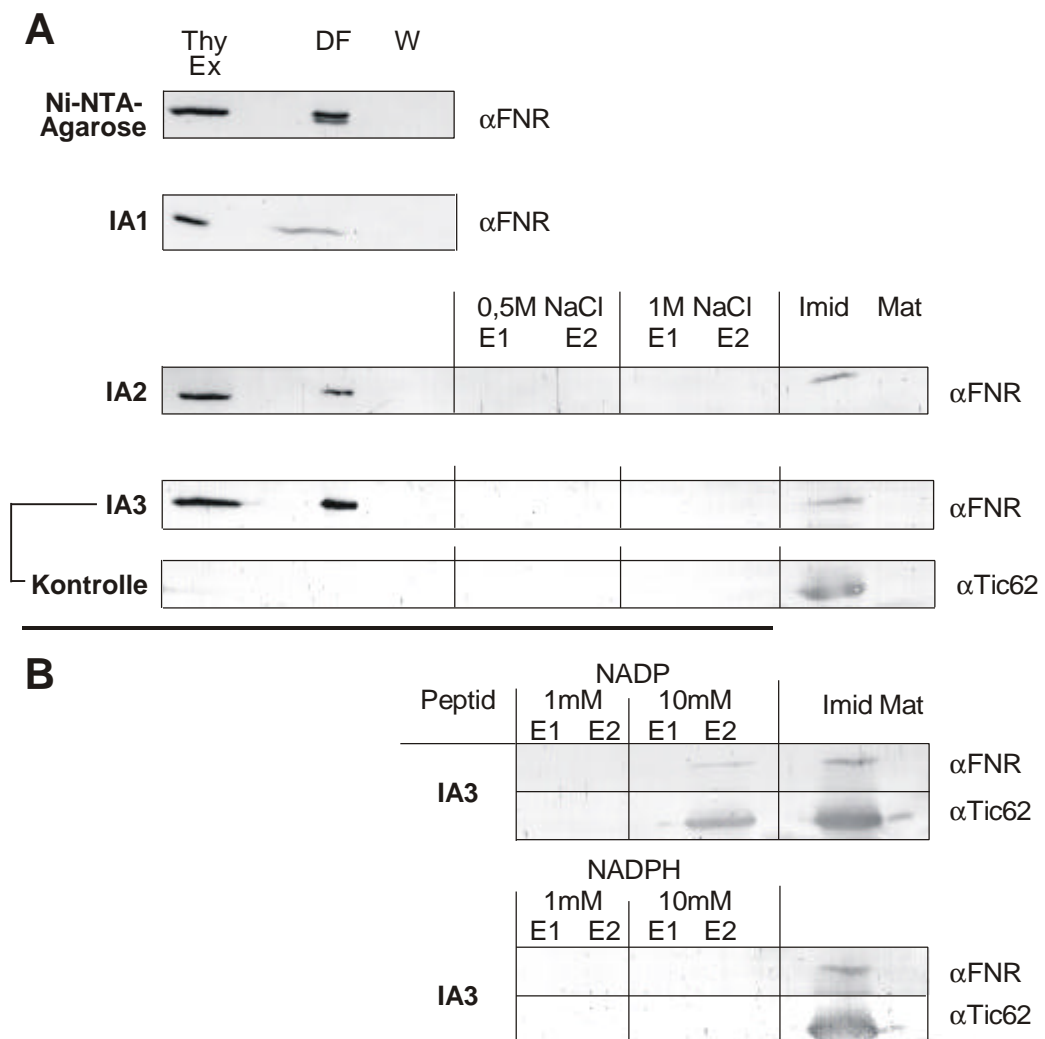


Abb. 29 Interaktion von psTic62 mit der Ferredoxin-NADP Oxidoreduktase

Thylakoide werden mit 0,5M NaCl extrahiert. (A) Das Thylakoidextrakt wird ohne (Ni-NTA-Agarose) und mit verschiedenen psTic62-Peptiden (IA1/2/3) inkubiert und anschließend über Ni²⁺-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Exemplarisch ist die Detektion von IA3 mit Antiserum gegen psTic62 gezeigt (Kontrolle). (B) Thylakoidextrakt wird mit psTic62-Peptid IA3 inkubiert und anschließend über Ni²⁺-Affinitätschromatographie aufgereinigt. ThyEx: Thylakoidextrakt; DF: Durchfluß; W; Waschschrift; E1/E2: Elutionsschritte; Imid: Elution mit Imidazol (100mM); Mat: Säulenmaterial.

daß eines der repetitiven Aminosäuresequenzmotive aus psTic62 in Konkurrenz zu NADP oder NADPH unspezifisch an die NAD(P)-Bindungsstelle der FNR koppelt. In Parallelexperimenten zeigt sich, daß die FNR nach Bindung an das psTic62-Peptid IA3 auch mit NADP und NADPH nicht zu eluieren ist (Abb. 29B). Die Elution eines geringen Anteils der FNR bei Inkubation mit 10mM NADP ist nicht auf eine Konkurrenz um dieselbe Bindungsstelle zu erklären, da wie die FNR auch ein Teil des Peptids IA3 eluiert. Die Elution beider Proteine liegt vermutlich in der Oxidation des Säulenmaterials durch NADP begründet, wodurch die Bindungskapazität des Materials stark reduziert wird. Die spezifische Interaktion zwischen psTic62 und der Ferredoxin-NADP⁺ Oxidoreduktase kann somit auch in den durchgeführten Bindungsexperimenten gezeigt werden.

5 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wird Tic62 als Komponente einer zentralen Translokationseinheit der inneren plastidären Hüllmembran gemeinsam mit Tic110 und Tic55 aufgereinigt und charakterisiert. Zusammen mit dem Eisen-Schwefel-Protein Tic55 könnte Tic62 ein Redox-Regulationssystem der Proteintranslokation an der inneren Hüllmembran darstellen.

5.1 Aufreinigung eines zentralen Tic-Komplexes

Tic110 ist von den bisher charakterisierten Tic-Komponenten der allgemein anerkannte Bestandteil des Importkomplexes der inneren Hüllmembran (Kessler and Blobel, 1996; Lübeck et al., 1996; Akita et al., 1997) und wird daher als Standard zur Charakterisierung des Tic-Komplexes eingesetzt. Mit Tic55 (Caliebe et al., 1997), Tic40 (Stahl et al., 1999), Tic22 und Tic20 (Kouranov and Schnell, 1997) werden seither vier weitere Proteine basierend auf unterschiedlichen Methoden aufgereinigt. Die Arbeiten von Caliebe und Mitarbeitern (1997) haben bereits die Aufreinigung eines Proteinkomplexes durch BN-PAGE gezeigt, der neben Tic110 auch Tic55 und weitere, bisher nicht charakterisierte Komponenten enthält. Tic40 kann mit Tic110 co-immunpräzipitiert werden und interagiert mit Vorstufenprotein während der Translokation (Stahl et al., 1999; Ko et al., 1995). Für Tic22 und Tic20 ist bisher nur die Interaktion mit Vorstufenprotein über Quervernetzungsversuche belegt (Kouranov and Schnell, 1997).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde für die präparative Aufreinigung des zentralen Tic-Komplexes aus isolierten Vesikeln der inneren Hüllmembran die Blau-Native Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE) verbessert. Die BN-PAGE wurde für die Trennung und Aufreinigung mitochondrieller Atmungskettenkomplexe entwickelt (Schägger and von Jagow, 1991; Schägger et al., 1994). Auch für die Charakterisierung der Präprotein-Translokasen der äußeren und inneren Mitochondrienmembran von Pilzen und Pflanzen fand die BN-PAGE schon Anwendung (Dekker et al., 1996; Dekker et al., 1997; Jansch et al., 1998).

Ein mit Hilfe der BN-PAGE aufgereinigter Proteinkomplex der inneren Chloroplastenhüllmembran mit einem apparenten Molekulargewicht von ~230 kDa enthält – in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Caliebe und Mitarbeitern (1997) - neben

Tic110 und Tic55 mindestens vier weitere bisher nicht charakterisierte Proteine zwischen ~64 kDa und ~20 kDa (Abb. 3B). Darüberhinaus können auch Tic40 und Tic22 in dem über BN-PAGE isolierten Tic-Komplex gemeinsam mit Tic110 und Tic55 detektiert werden. Allerdings können große Mengen von Tic40 und Tic22 auch außerhalb dieses Komplexes nachgewiesen werden (Abb. 3C). Während Tic40 sowohl im hoch- als auch im niedermolekularen Bereich der nativen Geldimension zu finden ist, wird Tic22 hauptsächlich in Bereichen detektiert, die unterhalb des Tic-Komplexes liegen. Da für Tic20 kein Antiserum zur Verfügung steht, können in dieser Arbeit keine Aussagen über dessen Assoziation mit dem Tic-Komplex gemacht werden.

Die Summe der Molekulargewichte aller bekannten Tic-Komponenten ergäbe ein Molekulargewicht von ~300 kDa, vorausgesetzt die einzelnen Komponenten liegen in stöchiometrischen Mengen vor. Das Molekulargewicht des mit Hilfe von BN-PAGE isolierten Komplexes kann mit ~230 kDa nur geschätzt werden, da die Laufhöhe eines Proteinkomplexes nur in Abhängigkeit von seiner Gestalt und dem isoelektrischen Punkt der einzelnen Bestandteile mit seinem Molekulargewicht korreliert. Insbesondere ein niedriger isoelektrischer Punkt kleiner als pH 5 kann zu einem abnormalen Laufverhalten führen (Schägger et al., 1994).

Die bisherigen Ergebnisse zur Isolierung des Tic-Komplexes über die BN-PAGE sollen durch Dichtegradientenzentrifugation in einem linearen Saccharosegradienten bestätigt werden. In den Fraktionen 9-13 (Abb. 4A) wird ein Proteinkomplex aufgereinigt, dessen Komposition dem Komplex D aus der BN-PAGE (Abb. 3B) weitgehend entspricht. Wieder werden Tic110 und Tic55 gemeinsam in den Fraktionen 9-13 nachgewiesen. Auch Tic40 und Tic22 treten in diesen Fraktionen zusammen mit Tic110 und Tic55 auf, allerdings wird die überwiegende Menge Tic40 und Tic22 in den Fraktionen 5-11 oberhalb des Tic-Komplexes gefunden (Abb. 4B), und nur geringe Anteile beider Proteine laufen gemeinsam mit Tic110 und Tic55. In der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteinkomplexe laufen Tic40 und Tic22 wegen des niedrigeren Molekulargewichts unterhalb des Tic-Komplexes. Entsprechend findet sich ein Subkomplex dieser beiden Proteine in der Dichtegradientenzentrifugation oberhalb des Tic-Komplexes. Anders verhält sich ein 64kDa-Protein während beider Aufreinigungsmethoden, das einzig in den Fraktionen mit Tic110 und Tic55 zu detektieren ist (Abb. 3B/4A).

Um die Aufreinigung des Tic-Komplexes weiter zu verbessern und somit die Komposition genauer zu analysieren, wird der über BN-PAGE isolierte Tic-Komplex elektroeluiert und in

verschiedenen Experimenten einer weiteren nativen PAGE, einer Dichtegradientenzentrifugation oder einer Gelfiltration unterzogen.

Alle drei Methoden zeigen, daß eine zentrale Einheit des Tic-Komplexes stabil isoliert wird (Abb. 5/6/7). Diese zentrale Translokationseinheit der inneren Chloroplastenhüllmembran besteht aus drei Komponenten: Tic110, Tic55 und dem oben genannten 64kDa-Protein. Stöchiometrisch zeigen sich alle drei Komponenten in diesem Subkomplex in einander entsprechenden Verhältnissen, soweit entsprechende Aussagen anhand von Silberfärbungen möglich sind (Abb. 5C). In der denaturierenden Geldimension einer vollständigen BN-Spur zeigt sich außerdem, daß die Komponenten unterhalb von 40 kDa nicht auf Höhe des Tic-Komplexes laufen. Tic40 und Tic22 werden nicht als Komponenten dieses zentralen Tic-Komplexes detektiert. Auch nach einer Dichtegradientenzentrifugation des BN-Tic-Eluats ist eine zentrale Einheit des Tic-Komplexes aus Tic110 und Tic55 mit dem 64kDa-Protein zu isolieren (Abb. 6A). In diesem Fall sind Tic40 und Tic22 zwar zu detektieren, finden sich jedoch hauptsächlich oberhalb des Tic-Komplexes (Abb. 6B), was auf das im Vergleich zur BN-PAGE geringere Auflösungsvermögen der Dichtegradientenzentrifugation zurückzuführen ist. Auch die Molekulargewichtschromatographie des BN-Tic-Eluats liefert Ergebnisse, die den beiden vorigen Experimenten entsprechen. Tic110 und Tic55 werden gemeinsam mit dem 64kDa-Protein in einem distinkten Proteinkomplex aufgereinigt. Die aufgeführten Daten zeigen, daß es sich bei dem 64kDa-Protein um eine neue Komponente des Tic-Komplexes handelt. Um das Protein und seine Einbindung in den Tic-Komplex weiter untersuchen zu können, wird ein Antiserum gegen dieses 64kDa-Protein generiert.

Tic40, Tic22 und Tic20 sind über den Einsatz chemischer Quervernetzer identifiziert (Ma et al., 1996; Kouranov and Schnell, 1996; Stahl et al., 1999) worden. Daher sollte die Anordnung der Komponenten des zentralen Tic-Komplexes auf diese Art untersucht werden. Der Einsatz von CuCl_2 und Natriumtetrathionat ergeben keinerlei detektierbare Quervernetzungsprodukte des 64kDa-Proteins. Beide Substanzen verknüpfen nur eng benachbarte Proteine über kovalente Brücken miteinander. Die Quervernetzungsversuche mit Bis[sulfosuccinimidyl]Suberat (BS^3) und Dithiobis[Succinimidyl]Propionat (DSP) an inneren Hüllmembranen zeigen in beiden Fällen bei Detektion mit dem Antiserum gegen das 64kDa-Protein zwar die Isolierung eines Produkts auf Höhe von 115-120 kDa (Abb. 21), aber die Identifikation eines Partners des 64kDa-Proteins in diesem Produkt ist nicht möglich. Rein rechnerisch könnte die 120 kDa-Bande ein Produkt der Vernetzung des 64kDa-Proteins und

Tic55 darstellen, die Detektion der entsprechenden Bande mit Antiserum gegen Tic55 ist jedoch nicht eindeutig zu zeigen. Die geringe Effizienz der Quervernetzung und der niedrige Anteil von Tic-Proteinen in der inneren Hüllmembran erschwert die Identifikation von Komponenten eines Proteinkomplexes durch Quervernetzungsversuche. Außerdem müssen die möglichen Falschresultate aufgrund des Abstandes der reaktiven Gruppen der Quervernetzungsreagenzien beachtet werden, wodurch auch Vernetzungsprodukte zwischen Proteinen auftreten können, die *in vivo* nicht in engem Kontakt miteinander sind.

Die Co-Immunpräzipitation ist eine weitere Methode, um die Interaktion von Komponenten eines Proteinkomplexes zu zeigen. Die Immunpräzipitation von Tic-Proteinen nach der Solubilisierung von inneren Hüllmembranen mit nicht-ionischen Detergentien ergibt mit Antiserum gegen das 64kDa-Protein keine verwertbaren Ergebnisse. Ein Grund dafür könnte ebenfalls der geringe Anteil von Tic-Proteinen am Gesamtprotein der inneren Hüllmembran sein. Nach der Aufreinigung und Elektroelution des Tic-Komplexes aus BN-PAGE gelingt die Immunpräzipitation des zentralen Tic-Komplexes sowohl mit Antiserum gegen Tic110, Tic55 als auch das 64kDa-Protein (Abb. 22) und dokumentiert die Bildung einer zentralen Translokationseinheit durch diese drei Proteine. Im einzelnen sei die Immunpräzipitation mit Antiserum gegen Tic55 angesprochen, die mit der Co-Immunpräzipitation sowohl von Tic110 als auch des 64kDa-Proteins die direkte Interaktion aller drei Komponenten beweist. Die direkte Interaktion von Tic55 und Tic110 wurde schon von Caliebe und Mitarbeitern (1997) durch Immunpräzipitationsversuche gezeigt.

Bereits die abweichenden Daten aus verschiedenen Laboratorien in Bezug auf die Komposition des Tic-Komplexes deuten auf eine mögliche Existenz verschiedener Tic-Subkomplexe hin, die über unterschiedliche Methoden aufgereinigt werden können (Caliebe et al., 1997; Kouranov et al., 1998). Die bisher vorgestellten Ergebnisse zeigen ebenfalls in verschiedenen Experimenten eine abweichende Zusammensetzung des Tic-Komplexes, wobei eine zentrale Einheit aus drei Komponenten stets in stabiler Assoziation auch in Abwesenheit von Vorstufenprotein aufgereinigt wird. Ähnlich wie für den Toc-Komplex scheint zumindest eine zentrale Einheit des Tic-Komplexes permanent assembliert vorzuliegen. Die Toc159-verwandten Rezeptoren atToc120 und atToc132 aus *Arabidopsis thaliana* werden auch als Komponenten von Toc-Subkomplexen diskutiert, die selektiv den Import photosynthetischer und nicht-photosynthetischer Proteine vermitteln (Bauer et al., 2000). Auch atToc33 und atToc34 könnten Komponenten entwicklungsabhängig regulierter Toc-Komplexe sein (Jarvis et al., 1998; Gutensohn et al., 2000).

Für Tic40 und Tic22 werden Funktionen als Chaperone innerhalb des Tic-Komplexes postuliert (Stahl et al., 1999; Kouranov et al. 1998), was eine lose Assoziation an eine zentrale Einheit des Tic-Komplexes erklären könnte. Auch bei Mitochondrien sind lösliche Importkomponenten für den Transport des Vorstufenproteins im Intermembranraum verantwortlich, die sowohl an die äußere als auch die innere Mitochondrienmembran binden können (Koehler, 2000). Eine dynamische Assemblierung von Tic40 und Tic22 an den Tic-Komplex könnte mit der Bindung von Vorstufenprotein initiiert oder stabilisiert werden.

Für die innere Chloroplastenhüllmembran ist auch die Existenz von Tic-Subkomplexen entsprechend dem Prinzip in Mitochondrien möglich, wo sich über Tim17/23 und Tim22 der Importweg von Matrix- und Membranproteinen an der inneren Membran teilt (Koehler, 2000). Auffallend ist auch, daß der Anteil von Tic110 in der inneren Chloroplastenhüllmembran die Anteile an psTic62 und Tic55 um ein Vielfaches übersteigt. Die Stöchiometrie in dem aufgereinigten Tic-Komplex liegt jedoch bei 1:1:1 (Abb. 6). Eine unterschiedliche Spezifität könnte auch hier auf prinzipiell unterschiedlich aufgebauten Tic-Subkomplexen beruhen, die mit einer unterschiedlichen Komposition über verschiedene Mechanismen spezifisch auf wechselnde Bedingungen hin reguliert werden könnten. Tic110 könnte somit den Kern unterschiedlicher Tic-Subkomplexe mit einem variablen Set an Importkomponenten darstellen.

Zu allen in Erbse (*Pisum sativum*) beschriebenen Komponenten des plastidären Proteinimports existieren homologe Proteine in *Arabidopsis thaliana*. Für sieben der elf Proteine können mehrere Isoformen identifiziert werden (Jackson-Constan and Keegstra, 2001). Resultierend aus einer variablen Komposition verschiedener Importkomplexe könnten deren Affinitäten für verschiedene plastidäre Vorstufenproteine reguliert sein.

5.2 Tic62 ist eine neue Komponente des Tic-Komplexes

Gemeinsam mit Tic110 und Tic55 ist eine neue Tic-Komponente mit einem apparenten Molekulargewicht von ~64 kDa isoliert worden. Dieses Protein wird im weiteren Verlauf der Arbeit charakterisiert. Ein cDNA-Klon von 1149 bp wird isoliert, dessen längster offener Leserahmen die beiden Peptide enthält, die nach proteolytischer Spaltung des 64kDa-Proteins erhalten werden. Dieser cDNA-Klon stellt einen N-terminal deletierten Teillängenklon dar. Die Suche in Datenbanken ergibt homologe cDNA-Klone aus *Arabidopsis thaliana* (AAC26697) und *Synechocystis* sp. PCC6803 (slr1218) (Abb. 12). Das konzeptionell translatierte Protein aus *Arabidopsis thaliana* zeigt über die gesamte Aminosäuresequenz

hinweg Homologie zu dem 64kDa-Protein, für das der cDNA-Klon kodiert. Das *Arabidopsis thaliana*-Protein besitzt nach der computergestützten Vorhersage (3.10) ein chloroplastidäres Transitpeptid aus 63 Aminosäuren (Abb. 13C).

Das mature Protein hat ein kalkuliertes Molekulargewicht von 62,1 kDa. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird für das Protein aus *Arabidopsis thaliana* (at) der Name atTic62 verwendet, während dem Protein aus Erbse das Präfix ps (*Pisum sativum*, ps) vorangestellt wird. Aufgrund der Sequenzhomologie beider Proteine ist anzunehmen, daß auch das 64kDa-Protein aus Erbse ein N-terminales Transitpeptid trägt. Für atTic62 sind mit nur einem genomischen Klon (Accession-Nummer.: AP002039) keine Isoformen in *Arabidopsis thaliana* vorhanden (3.10). Für andere Komponenten wie Tic110, Tic55 und Tic40 ist ebenfalls jeweils nur ein Homolog zu den entsprechenden Proteinen aus *Pisum sativum* gefunden worden (Jackson-Constan and Keegstra, 2001).

Neben der Aminosäurekomposition und der Position der Membrandomänen zeigen sowohl psTic62 und atTic62 eine strukturelle Zweiteilung. Der cDNA-Klon slr1218 aus *Synechocystis* sp. PCC6803 ist ein weiteres Ergebnis der Sequenzvergleiche. Der Klon slr1218 kodiert für ein Protein von nur 23,5kDa, seine Sequenzhomologie zu psTic62 und atTic62 beschränkt sich jedoch auf den N-terminalen Abschnitt beider Proteine. Der N-Terminus zeigt für alle drei Proteine Ähnlichkeiten zu Dehydrogenasen (Ermakova-Gerdes and Vermaas, 1999), die Aminosäuresequenzen von atTic62 und slr1218 enthalten auch die entsprechende NAD(P)-Bindungsstelle, die für psTic62 nicht vorhergesagt werden kann (Abb. 23). Ausgehend von einer Lokalisierung der vorhergesagten NAD(P)-Bindungsstelle im Stroma oder im Intermembranraum sind unterschiedliche Funktionen für Tic62 vorstellbar. Einerseits könnten Redoxsignale aus dem Inneren des Chloroplasten, andererseits aus dem cytosolischen Kompartiment an den Chloroplasten oder den Tic-Komplex vermittelt werden. Von einer gerichteten Funktion dieser NAD(P)-Bindungsstelle ist auszugehen, da ein NADP-Transportsystem in der inneren Chloroplastenhüllmembran offenbar nicht existiert (Heineke et al. 1991).

Durch Anbindung von ^{32}P -NAD(P) an Vesikel der inneren Chloroplastenhüllmembran aus Erbse wird zum einen demonstriert, daß auch psTic62 aus Erbse NAD/NADP zu binden vermag (Abb. 24). Darüberhinaus muß auch in psTic62 die NAD(P)-Bindungsstelle im N-terminalen Abschnitt des Proteins liegen, welcher nicht von dem isolierten cDNA-Klon abgedeckt wird. Außerdem kann demonstriert werden, daß eine native Konformation von psTic62 für die Anbindung von NAD(P) nötig ist, da SDS-denaturiertes Protein NAD(P) nicht bindet (Abb. 24). Aussagen über eine Präferenz von psTic62 für NAD oder NADP sind

auf Basis der gewählten Methode nicht möglich. Ob über die Bindung von NAD oder NADP eventuell ein Redoxsignal aus dem Cytosol oder dem Chloroplasteninneren von Tic62 empfangen oder weitergeleitet wird, kann somit nicht beantwortet werden.

Daß einzelne Komponenten des Tic-Komplexes redoxreguliert sein könnten, zeigt auch die Anbindung von radioaktiv markiertem NAD/NADP an den Tic-Komplex. Die Auftrennung von inneren Hüllmembranen nach Anbindung von NAD/NADP über BN-PAGE ergibt eine radioaktiv markierte Bande auf Höhe des Tic-Komplexes (Abb. 24). Um die Spezifität dieses Anbindungsexperimentes zu erhöhen, ließe sich eventuell an die NAD(P)-Anbindung eine Co-Immunpräzipitation anschließen. Auch die Auftrennung des radioaktiven Tic-Komplexes nach Aufreinigung über BN-PAGE in einer denaturierenden PAGE ließe die Identifikation der NAD(P)-bindenden Komponente des Tic-Komplexes zu. Der Hauptkandidat für eine solche Komponente ist aufgrund der oben ausgeführten Ergebnisse Tic62.

Die Zugehörigkeit NAD(P)-bindender Proteine oder Komponenten mit redoxabhängigen Eigenschaften zum Tic-Komplex wird zusätzlich gestützt, da mit IEP32 ein weiteres integrales Protein der inneren Chloroplastenhüllmembran mit Homologien zu Dehydrogenasen gemeinsam mit Tic110 aufgereinigt werden kann (Sveshnikov, Dissertation 2000). Auch IEP32 trägt eine putative NAD(P)-Bindungsstelle, die Funktion des Proteins bzw. seine Einbindung in den Proteinimport über Tic110 ist noch nicht untersucht.

Die Lokalisierung zeigt psTic62 als Komponente der inneren Chloroplastenhüllmembran, wie dies für eine weitere Komponente des Tic-Komplexes auch zu erwarten ist (Abb. 17A). Dem Ergebnis nach Extraktion innerer Chloroplastenhüllmembranen entsprechend wird psTic62 als integrales Membranprotein charakterisiert (Abb. 17B). Hier bestätigt sich die computergestützte Vorhersage, daß psTic62 über mindestens eine Transmembrandomäne in der Membran verankert ist. Immunogoldmarkierungen von Ultradünnschnitten ganzer Blätter von Erbse (Abb. 19) und die proteolytische Behandlung innerer Hüllmembranen (Abb. 18) weisen darauf hin, daß psTic62 mit einer großen C-terminalen Domäne in das Stroma zeigt. Diese C-terminale Domäne trägt das angesprochene repetitive Sequenzmotiv.

Auffällig bleibt, daß alle Sequenzvergleiche mit dem C-terminalen Abschnitt von psTic62 oder atTic62 nur pflanzliche Klone als Ergebnis liefern. Tic62 stellt also wahrscheinlich ein auf das Pflanzenreich beschränktes Protein dar. Nach der Primärsequenzanalyse von psTic62 und atTic62 fallen besonders repetitive Motive bestehend aus etwa 20 hydrophoben, konservierten Aminosäuren im C-terminalen Abschnitt auf (Abb. 13). Eine Reihe repetitiver Sequenzmotive ist involviert in Protein-Protein-Wechselwirkungen. TPR-Motive vermitteln

spezifische Interaktionen zwischen Proteinen, die für die Funktionen von Chaperonen, in der Transkription und in Proteintransportkomplexen wichtig sind (Blatch and Lasse, 1999). Andere repetitive Sequenzen wie (HX)_n-Motive (Janknecht et al., 1991), LIM-Domänen (Bach, 2000) oder Zink-Finger- und Leucin-Zipper-Motive vermitteln die Interaktion zwischen Transkriptionsfaktoren und eine Vielzahl anderer biologischer Prozesse.

5.3 psTic62 rekrutiert die Ferredoxin-NADP⁺ Oxidoreduktase an der inneren Chloroplastenhüllmembran

Die Funktion des repetitiven Sequenzmotivs im C-terminalen Abschnitt von Tic62 als Domäne für Protein-Protein-Wechselwirkungen wird sowohl im Hefe-Zwei-Komponenten-System als auch in biochemischen Bindungsexperimenten untersucht. Im Hefe-Zwei-Komponenten-System ist mit der Ferredoxin-NADP⁺ Oxidoreduktase (FNR) nur ein einziges Protein als möglicher Partner von psTic62 identifiziert worden (Tab. 1). Insgesamt entfallen von den vier positiven Klonen drei auf das psTic62-Konstrukt TH3 und nur ein Klon ist mit dem Konstrukt TH2 isoliert worden. Das Konstrukt TH1 enthält keines der repetitiven Sequenzmotive und ergibt bei der Sichtung auch keine positiven Klone, was indirekt die Sequenzmotive als die interagierende Domäne ausweist. Zusätzlich reflektiert das Sichtungsergebnis, daß mit steigender Anzahl an repetitiven Motiven auch die Wahrscheinlichkeit ansteigt, daß die FNR interagiert bzw. gebunden wird. Dies könnte gleichermaßen auch für die *in vivo*-Wechselwirkung beider Proteine gelten und begründen, warum mehr als nur ein Sequenzmotiv in der C-terminalen Domäne enthalten ist. Das Hefe-Zwei-Komponenten-System gilt allgemein als eine Sichtungsmethode, die sowohl einer Reihe interner Positiv- als auch Negativkontrollen bedarf und deren Ergebnis in Bezug auf die interagierenden Proteine über biochemische Methoden verifiziert werden muß.

Um die im Zwei-Komponenten-System detektierte Interaktion zwischen psTic62 und der FNR zu bestätigen und darüberhinaus qualitativ genauer zu untersuchen, sind die entsprechenden Peptide rekombinant überexprimiert und die aufgereinigten psTic62-Peptide für biochemische Bindungsexperimente eingesetzt worden. Das verwendete grobe Thylakoidextrakt enthält u.a. auch die FNR. Die Bindungsexperimente mit den drei psTic62-Peptiden bestätigen alle Beobachtungen aus der Sichtung der HybriZAP™ cDNA Bank. Das psTic62-Konstrukt IA1 enthält keines der repetitiven Sequenzmotive und bindet auch in dem biochemischen Bindungsexperiment keine FNR, während die beiden Konstrukte IA2 und IA3 jeweils die FNR aus dem groben Thylakoidextrakt binden und mit ihr gemeinsam

aufzureinigen sind. NADP ist nicht entscheidend für eine Bindung der FNR, denn durch Vorinkubation des Thylakoidextrakts mit NADP läßt sich keine Steigerung der Bindungseffizienz erreichen. Außerdem ist eine unspezifische Bindung des psTic62-Peptids an die NAD(P)-Bindungsdomäne der FNR auszuschließen, da sowohl NADP als auch NADPH nicht mit den psTic62-Peptiden um die Bindung der FNR konkurrieren (Abb. 29). Die Spezifität und Bindungsstärke zeigt sich weiterhin in den Bindungsexperimenten deutlich, da bis zu der getesteten Natriumchloridkonzentration von 1 mol/l die Interaktion nicht gestört wird. Dieses Ergebnis läßt den Schluß zu, daß die Interaktion zwischen den beiden Proteinen wahrscheinlich auf hydrophoben Wechselwirkungen basiert. Das Konstrukt IA2 enthält nur eines der repetitiven Sequenzmotive und bindet die FNR. Da folglich ein Sequenzmotiv zur Bindung der FNR ausreicht, bieten mehrere Motive nur die Möglichkeit, die FNR mehrfach an den Tic-Komplex zu binden. Die variable Zahl an Motiven in den homologen Tic62-Proteinen verschiedener Spezies reflektiert somit nur eine unterschiedliche Zahl an Andockstellen für die FNR, nicht eine abweichende Funktion. In vorläufigen Analysen zur Sekundärstruktur der C-terminalen Domäne von psTic62 zeigen sich die hydrophoben Sequenzmotive als „fingerartige“

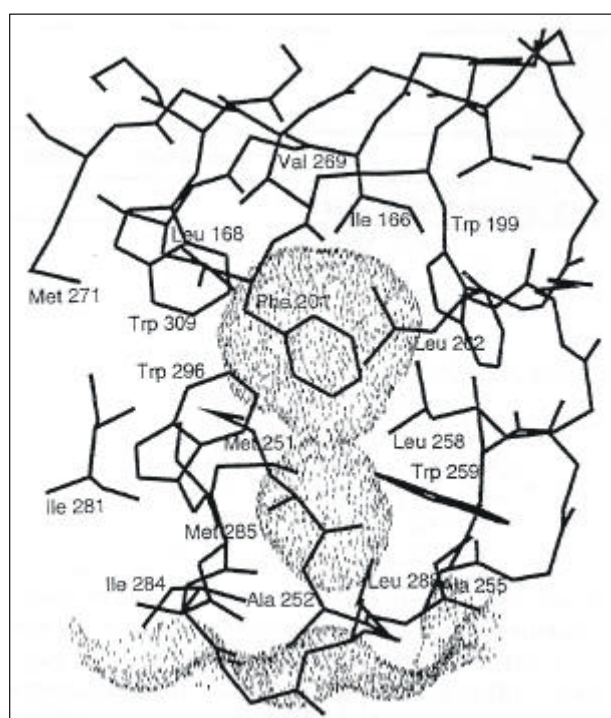


Abb. 30 Schematische Darstellung der hydrophoben Bindungstasche Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase (FNR) von *Zea mays*

Die gestrichelten Bereiche zeigen die Region in der FNR an, die bei Faltung des Enzyms eine Bindungstasche aus hydrophoben Aminosäuren formen. Die Abbildung ist entnommen aus Bruns und Karplus (1995).

Sequenzmotive als „fingerartige“ Domänen, die aus einer globulären Domäne herausragen könnten (Daten nicht gezeigt).

Nach Faltung der FNR ergibt sich eine Tasche aus konservierten, hydrophoben Aminosäuren (Abb. 30) (Bruns and Karplus, 1995). Die Position entgegengesetzt des aktiven Zentrums und nahe der Proteinoberfläche scheint ideal für eine mögliche Funktion als Bindungsstelle für ein Kopplungsprotein in der Membran (Bruns and Karplus, 1995). Die Vermutung liegt nahe, daß sich das „fingerartige“, repetitive Aminosäuremotiv aus psTic62 und die beschriebene hydrophobe Tasche der FNR wie Schlüssel und Schloß zueinander verhalten könnten.

In weiterführenden Experimenten, um die Art der Bindung zwischen Tic62 und der FNR näher zu untersuchen, würde sich die PDR (Phthalat-Dioxygenase Reduktase) als Kontrolle anbieten, da sie der FNR strukturell sehr ähnlich ist, aber keine hydrophobe Tasche ausbildet (Correll et al, 1992; Correll et al., 1993; Bruns and Karplus, 1995). Auf Basis der präsentierten Daten kann somit ein vorläufiges Modell einer zentralen Einheit des Tic-Komplexes als Arbeitshypothese entworfen werden (Abb. 31).

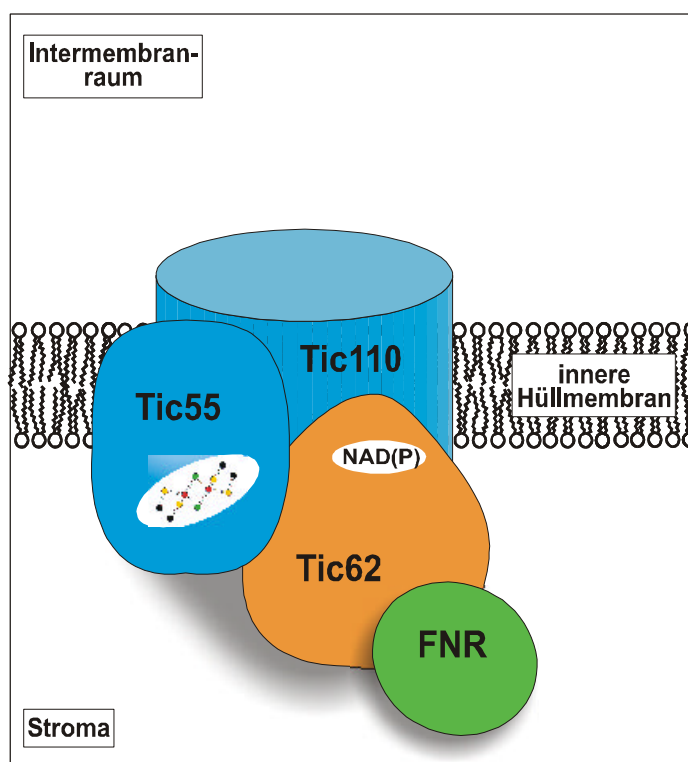


Abb. 31 Schematisches Modell einer zentralen Translokationseinheit der inneren Chloroplastenhüllmembran

Über BN-PAGE und Dichtegradientenzentrifugation wird eine zentrale Einheit des Tic-Komplexes aus Tic110, Tic55 und Tic62 aufgereinigt. Tic55 trägt ein Eisen-Schwefel-Zentrum und eine mononukleäre Eisenbindungsstelle, Tic62 verfügt über eine aktive NAD(P)-Bindungsstelle am extremen N-Terminus, der Sequenzverwandschaft zu Dehydrogenasen aufweist. Außerdem trägt Tic62 in seinem C-terminalen Abschnitt repetitive Sequenzmotive, über die die Ferredoxin-NADP Oxidoreduktase an Tic62 und so an den Tic-Komplex gebunden werden kann.

Die Ferredoxin-NADP⁺ Oxidoreduktase ist üblicherweise mit der stromalen Seite der Thylakoidmembran assoziiert und katalysiert den reversiblen Elektronentransfer zwischen NADP(H) und anderen Elektronenüberträgern wie Ferredoxin oder Flavodoxin (Arakaki et al., 1997; Martinez-Julvez et al., 1999). Mit dem sog. FNR-bindenden Protein (*Zea mays*, Accession-Nummer Z26824, CAA81421) ist bereits eine Komponente beschrieben, welche für die Kopplung der FNR an die Thylakoidmembran verantwortlich ist. Dieses FNR-bindende Protein trägt jedoch kein Aminosäuremotiv, welches einem Sequenzabschnitt aus

Tic62 entspräche. Da in beiden Fällen keine identische Funktion anzunehmen ist, könnte auch die Art der Kopplung der FNR an die Thylakoidmembran und an Tic62 verschieden sein. Es werden bis zu sechs Isoformen der FNR in *Zea mays* beschrieben (Onda et al., 2000), deren Unterschiedlichkeit nicht weiter untersucht ist, aber in sehr verschiedenen Funktionen zu suchen sein könnte. Palatnik und Mitarbeiter (1999) und Krapp und Mitarbeiter (1997) zeigten, daß sich die FNR unter oxidativem Streß von der Thylakoidmembran löst und von einem membrangebundenen NADPH-Produzenten zu einem NADPH-Konsumenten als ein Glied in der zellularen Abwehr oxidativer Schäden konvertiert (siehe Übersicht in Abb. 32). Die Existenz von FNR-Pools mit unterschiedlicher Affinität zur Thylakoidmembran konnte von Vallejos und Mitarbeitern (1984) demonstriert werden. Die FNR und Ferredoxin sind auch in nicht-photosynthetisch aktiven Geweben vorhanden und hier funktionell nicht an die Photosynthese gekoppelt (Green et al., 1991; Morigasaki et al., 1990). Guedeney und Mitarbeiter (1996) haben eine Kopplung der FNR an einen NAD(P)H-Dehydrogenase-Komplex gezeigt, wobei die FNR wiederum nicht in die Photosynthesereaktion eingebunden ist.

Die Bindung von NAD(P), Homologien zu Dehydrogenasen und ein Sequenzmotiv zur Interaktion mit der FNR legen eine redoxregulierte Funktion dieser Tic-Komponente nahe. Die Photosynthese ist der dominierende Prozeß in Chloroplasten und basiert auf einer Kette von Elektronentransfer- und Redoxreaktionen (Allen et al., 1995). Der Redoxstatus des Plastoquinonpools beeinflusst die Transkription spezifischer Photosynthesepoteine (psbA, psaB, psaAB) (Pfannschmidt et al., 1999a; Tullberg et al., 2000) und bietet so die direkte Möglichkeit, das Verhältnis der beiden Photosysteme schnell an sich ändernde Lichtbedingungen anzupassen (Pfannschmidt et al., 1999b; Allen and Pfannschmidt, 2000) (Übersicht in Abb. 32). Außerdem wird in Plastiden die RNA-Degradation (Salvador and Klein, 1999) und -Prozessierung (Deshpande et al., 1997; Liere and Link, 1997), die Translation (Danon and Mayfield, 1994) als auch die Proteindegradierung (Garcia-Ferris and Moreno, 1994) vom Redoxstatus im Chloroplasten beeinflusst. Darüberhinaus reguliert der Redoxstatus des Plastiden sogar die Transkription von kernkodierten Proteinen (Kusnetzov et al., 1996; Oswald et al., 2001). Die Expression der kernkodierten *cab*-Gene (Untereinheiten des Lichtsammelkomplexes, LHC II) wird dementsprechend über den Redoxstatus des Plastoquinonpools im Chloroplasten kontrolliert (Escoubas et al., 1995) (Übersicht in Abb. 32). Die Frage, inwieweit der Proteinimport des Plastiden in dieses zelluläre Wechselspiel zwischen Chloroplast und Kern einbezogen ist, ist noch ungeklärt. Tic62 könnte gemeinsam

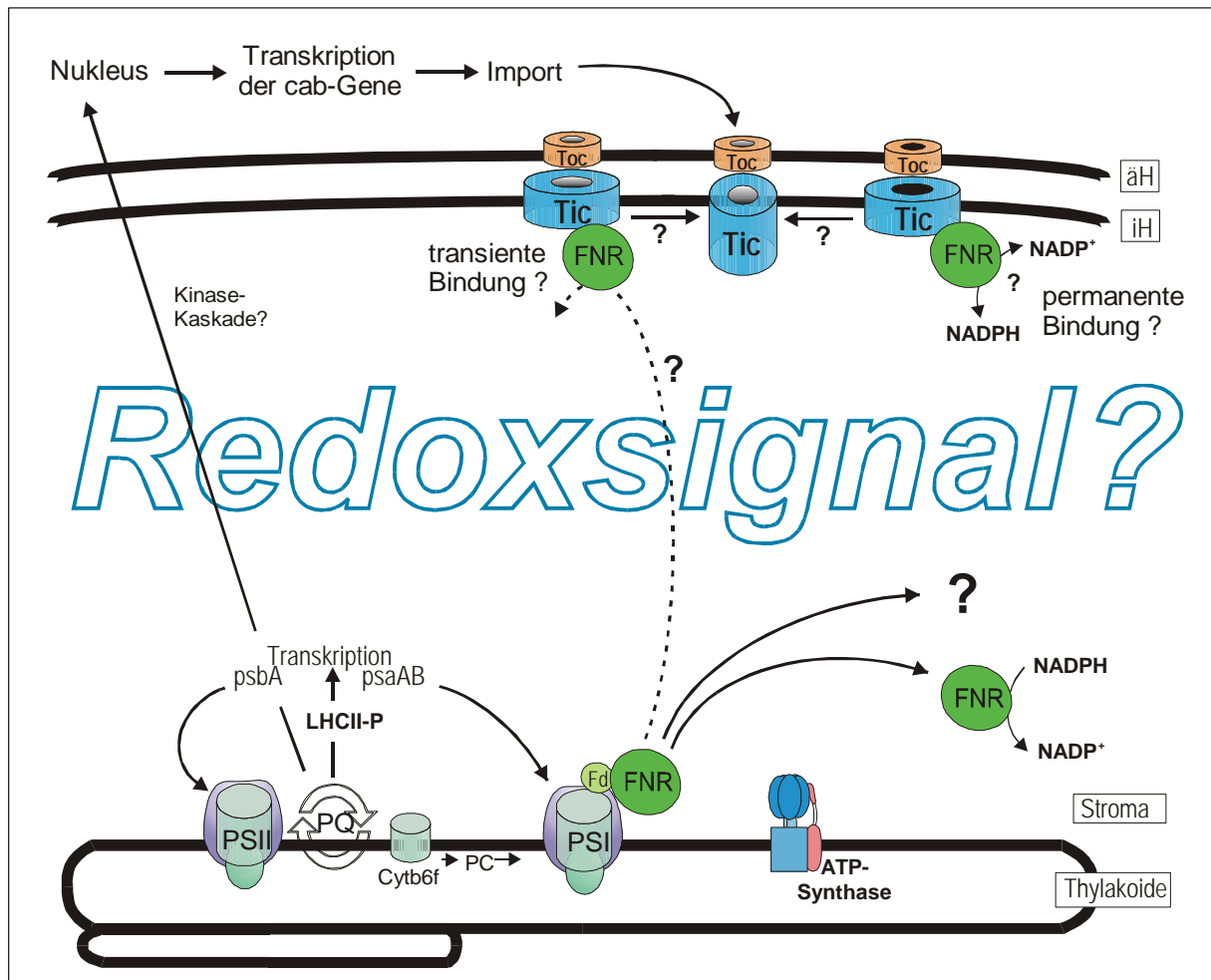


Abb. 32 Arbeitshypothese zur Regulation des Tic-Komplexes

Alle Ebenen der chloroplastidären Genexpression sind vom Redoxstatus des Organells beeinflusst. Das Verhältnis der beiden Photosysteme ist mit dem Elektronentransfer gekoppelt und sogar die Genexpression kernkodierter Gene (*cab*-Gene) wird über ein Signal, basierend auf dem Redoxstatus des Plastiden, reguliert. Weiterhin ist bekannt, daß die FNR als Antwort auf oxidativen Streß von einem membranassoziierten NADPH-Produzenten zu einem löslich im Stroma vorliegenden NADPH-Konsumenten konvertiert. Außerdem kann die Kopplung der FNR an Komponenten des Importapparates der inneren Chloroplastenhüllmembran gezeigt werden. PS I/ II: Photosystem I und II; PQ: Plastoquinon-Pool; Fd: Ferredoxin; LHCII: Lichtsammelkomplex; *psbA/psaAB*: Gene von Proteinen der Reaktionszentren von Photosystem I und II; äH: äußere Hüllmembran; iH: innere Hüllmembran.

mit Tic55 das fehlende Bindeglied sein, welches den Importapparat des Plastiden je nach Redoxstatus präferentiell für bestimmte Proteine modulieren ließe. Für die Translokation über die innere Chloroplastenhüllmembran sind bisher keine Modelle zur Regulation vorgeschlagen. Im Gegensatz zu Mitochondrien (Herrmann and Neupert, 2000) ist eine Abhängigkeit des Imports von einem elektrischen Potential über die inneren Chloroplastenhüllmembran nicht zu beobachten (Theg et al., 1989). Tic55 zeigt enge Verwandtschaft zu dem LLS1-Protein von *Zea mays*, welches ebenfalls ein Rieske-Eisen-Schwefel-Zentrum als prosthetische Gruppe und eine mononukleäre Eisenbindestelle trägt und eventuell als Biosensor an Redoxreaktionen beteiligt ist (Gray et al., 1997). Die Funktion

von SoxR wurde schon als Beispiel für Tic55 diskutiert, denn der Transkriptionsfaktor fungiert über sein Eisen-Schwefel-Zentrum als Redoxsensor (Hidalgo et al., 1997). So wie die genannten Proteine könnte auch Tic55 als Komponente einer Signaltransduktionskette wirken, die durch Redoxsignale reguliert wird. Weitere Beispiele für die Regulation über Redoxzustände sind die Transkriptionsfaktoren OxyR aus *E. coli* (Zheng et al., 1998) und NtcA aus *Synechocystis* (Alfonso et al., 2001). Über die Formierung von Disulfidbrücken oder den Oxidationsstatus von Thiolgruppen wird die Bindung an die DNA reguliert.

In diesem Zusammenhang läßt sich mit Tic62 als NAD(P)-bindende Tic-Komponente eine Arbeitshypothese zur Regulation der Translokation über die innere Hüllmembran formulieren (Abb. 32). Tic62 zeigt Homologien zu Dehydrogenasen, die ebenfalls als putative, an den Redoxstatus des Plastoquinonpools gekoppelte Redoxsensoren beschrieben sind (Howitt et al., 1999). Weiterhin bietet Tic62 Bindungsstellen für die FNR an. Die FNR könnte ein mögliches Element innerhalb einer Signalkette zum Importapparat sein, dessen Information von dem Redoxpaar Tic55/Tic62 weitergeleitet oder übersetzt wird.

Die aufgereinigte zentrale Translokationseinheit aus Tic110, Tic55 und der neuen Komponente Tic62 könnte folglich eine Form eines solchen Tic-Subkomplexes mit der Möglichkeit zur redoxabhängigen Regulation des Importapparates darstellen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In Rahmen dieser Arbeit wird die Aufreinigung einer zentralen Translokationseinheit der Präprotein-Translokase der inneren Chloroplastenhüllmembran (Tic-Komplex) gezeigt. Diese zentrale Translokationseinheit setzt sich aus Tic110, Tic55 und einem Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von ~64 kDa zusammen. Sowohl nach Aufreinigung des Tic-Komplexes über die Blau-Native-PAGE als auch über die Dichtegradientenzentrifugation tritt das 64kDa-Protein in distinkten Fraktionen gemeinsam mit den bereits charakterisierten Tic-Komponenten Tic110 und Tic55 auf. Durch Co-Immunpräzipitationsexperimente wird die direkte Interaktion dieser drei Tic-Komponenten demonstriert.

Für das 64kDa-Protein aus Erbse wird ein 5'-deletierter cDNA-Klon isoliert, der für ~41 kDa des 64kDa-Proteins kodiert. Über Datenbanksuchläufe wird ein Vollängenklon (Accession-Nummer AAC26697) aus *Arabidopsis thaliana* identifiziert, dessen konzeptionell translatiertes Protein ein Homolog zu dem 64kDa-Protein aus Erbse darstellt. Das kalkulierte Molekulargewicht des *Arabidopsis*-Proteins liegt bei 62,1 kDa. Die neue Tic-Komponente wird daher als Tic62 eingeführt. Der N-Terminus von Tic62 weist Ähnlichkeit zu Dehydrogenasen auf. Diese Homologie schließt für atTic62 eine putative NAD(P)-Bindungsstelle am extremen N-Terminus ein.

psTic62 ist ein integrales Protein der inneren Chloroplastenhüllmembran. In Quervernetzungsexperimenten wird für psTic62 aus Erbse die Anbindung von NAD/NADP experimentell belegt. Nach Proteolyse und Immunogoldmarkierungen von Ultradünnschnitten der Vesikel der inneren Hüllmembran und ganzer Blätter mit Antiserum gegen psTic62 ergibt sich, daß eine lösliche Domäne am C-Terminus zum Stroma hin exponiert ist.

Der C-terminale Abschnitt von Tic62 trägt ein repetitives Sequenzmotiv aus etwa 20 hydrophoben Aminosäuren, welches auf das Pflanzenreich beschränkt ist. Für das repetitive Sequenzmotiv aus psTic62 wird durch Sichtung einer HybriZAP™ Two-Hybrid cDNA-Bank die Ferredoxin-NADP⁺ Oxidoreduktase (FNR) als Interaktionspartner identifiziert. In biochemischen Bindungsversuchen wird die Spezifität der Interaktion von psTic62 und FNR bestätigt.

Tic62 stellt eine neue Komponente des Tic-Komplexes dar, deren Eigenschaften mit der Bindung von NAD(P) und der Interaktion mit FNR auf eine Funktion als Komponente eines Elektronentransport- oder Redoxsystems hindeuten. Tic62 könnte gemeinsam mit Tic55, das ein Rieske-Eisen-Schwefel-Zentrum und eine mononukleäre Eisenbindungsstelle enthält, an einem redoxgesteuerten Regulationsmechanismus des Tic-Komplexes beteiligt sein.

7 LITERATUR

- ‘The Arabidopsis Genome Initiative’ (2000), Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796-815
- Akita, M., Nielsen, E., Keegstra, K. (1997) Identification of protein transport complexes in the chloroplastic envelope membranes via chemical cross-linking. *J. Cell Biol.* 136, 983-994
- Alefsen, H. Waegemann, K., Soll, J. (1994) Analysis of the chloroplast protein import machinery. *J. Plant Physiol.* 144, 339-345
- Alfonso, M., Perewoska, I., Kirilosky, D. (2001) Redox control of *ntcA* gene Expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Nitrogen availability and electron transport regulate the level of the NtcA Protein. *Plant Physiol.* 125, 969-981
- Allen, A.F., Pfannschmidt, T. (2000) balancing the two photosystems: photosynthetic electron transfer governs transcription of reaction centre genes in chloroplasts. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 255, 1351-1359
- Allen, J.F., Alexciev, K., Håkansson, G. (1995) Regulation by redox signalling. *Curr. Biol.* 5, 1822-1872
- Ansorge, W. (1985) Fast and sensitive detection of protein and DNA bands by treatment with potassium permanganate. *Biophys. Methods* 11, 13-20
- Arakaki, A.K., Ceccarelli, E.A., Carillo, N. (1997) Plant-type ferredoxin-NADP⁺ reductases: a basal structural framework and a multiplicity of functions. *FASEB* 11, 133-140
- Arnon, D.J. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24, 42-45
- Bach, I. (2000) The LIM domain: regulation by association. *Mech. Dev* 91, 5-17
- Bauer, J., Chen, K., Hiltbunner, A., Wehrli, E., Eugster, M., Schnell, D., Kessler, F. (2000) The major protein import receptor of plastids is essential for chloroplast biogenesis. *Nature* 403, 203-207
- Benton, W.D., Davies, R.W. (1977) Screening λ gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. *Science* 196, 180-182
- Birnboim, H.C., Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7, 1513-1524
- Blatch, G.L., Lassel, M. (1999) The e-traticopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* 11, 932-939
- Blobel, G., Dobberstein, B. (1975) Transfer of proteins across membranes . PartI and II. *J. Cell Biol.* 67, 835-862

- Blobel, G., Walter, P., Chang, C.N., Goldman, B.M., Erickson, A.H., Lingappa, V.R. (1979) Translocation of proteins across membranes: the signal hypothesis and beyond. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 33, 9-36
- Blum, H., Beier, H., Gross, H.J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Eur. J. Biochem.* 46, 84-88
- Bölter, B., May, T., Soll, J. (1998) A protein import receptor in pea chloroplasts, Toc86, is only a proteolytical fragment of a larger polypeptide. *FEBS Lett.* 441, 59-62
- Bonner, W.M., Lasky, R.A. (1974) A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamidgels. *Eur. J. Biochem.* 46, 83-88
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
- Bruce, B.D. (1998) The role of lipids in plastid protein transport. *Plant Mol. Biol.* 38, 223-246
- Bruns, C.M., Karplus, P.A. (1995) Refined crystal structure of spinach ferredoxin reductase at 1.7Å resolution: oxidized, reduced and 2'-phospho-5'-AMP states. *J. Mol. Biol.* 247, 125-145
- Bruns, C.M., Karplus, P.A. (1995) Refined crystal structure of spinach ferredoxin reductase at 1.7? resolution: oxidized, reduced and 2'-Phospho-AMP bound states. *J. Mol. Biol.* 247, 125-145
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M., Short, J.M. (1977) XLI-blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5, 376-379
- Caliebe, A., Grimm, R., Kaiser, G., Lübeck, J., Soll, J., Heins, L. (1997) The chloroplastic protein import machinery contains a Rieske-type iron-sulfur cluster and a mononuclear iron-binding protein. *EMBO J.* 16, 7342-7350
- Chen, K., Chen, X., Schnell, D.J. (2000) Initial binding involving the Toc159 receptor can be bypassed during protein import into chloroplasts. *Plant Physiol.* 122, 813-822
- Chua, N.H., Schmidt, G.W. (1978) In vitro synthesis, transport, and assembly of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase subunits. *Basic Life Sci.* 11, 325-347
- Chua, N.H., Schmidt, G.W. (1979) Transport of proteins into mitochondria and chloroplasts. *J. Cell Biol.* 81, 461-483
- Correll, C.C., Batié, C.J., Ballou, D.P., Ludwig, M.L. (1992) Phthalate dioxygenase reductase: a modular structure for electron transfer from pyridine nucleotides to [2Fe-2S]. *Science* 258, 1604-1610
- Correll, C.C., Ludwig, M.L., Bruns, C.M., Karplus, P.A. (1993) Structural prototypes for an extended family of flavoprotein reductases: comparison of phthalate dioxygenase reductase with ferredoxin reductase and ferredoxin. *Protein Sci.* 2, 2112-2133

- Dabney-Smith, C., van Den Wijngaard, P.W., Treece, Y., Vredenberg, W.J., Bruce, B.D. (1999) The C terminus of a chloroplast precursor modulates its interaction with the translocation apparatus and PIRAC. *J. Biol. Chem.* 274, 32351-32359
- Danon, A., Mayfield, S.P. (1994) Light-regulated translation of chloroplast messenger RNAs through redox potential. *Science* 266, 1717-1719
- Dekker, P.J., Martin, F., Maarse, A.C., Bomer, U., Muller, H., Guiard, B., Meijer, M., Rassow, J., Pfanner, N. (1997) The Tim core complex defines the number of mitochondrial translocation contact sites and can hold arrested preproteins in the absence of the matrix Hsp70-Tim44. *EMBO J.* 16, 5408-5419
- Dekker, P.J., Muller, H., Rassow, J., Pfanner, N. (1996) Characterization of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane by blue-native electrophoresis. *Biol. Chem.* 377, 535-538
- Deshpande, N.N., Bao, Y., Herrin, D.L. (1997) Evidence for light / redox-regulated splicing of psbA pre-RNAs in *Chlamydomonas* chloroplasts. *RNA* 3, 37-48
- Douglas, M.G., McCammon, M.T., Vassarotti, A. (1986) Targeting proteins into mitochondria. *Microbiol. Rev.* 50, 166-178
- Edman, P., Begg, G. (1967) A protein sequenator. *Eur. J. Biochem.* 1, 80-91
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., von Heijne, G. (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptide and their cleavage sites. *Protein Science* 8, 978-984
- Ermakova-Gerdes, S., Vermaas, W. (1999) Inactivation of the open reading frame slr0399 in *Synechocystis* sp. PCC 6803 functionally complements mutations near Q_a niche of photosystem II. *J. Biol. Chem.* 274, 30540-30549
- Escoubas, J.M., Lomas, M., LaRoche, J., Falkowski, P.G. (1995) Light intensity regulation of cab gene transcription is signaled by the redox state of the plastoquinone pool. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10237-10241
- Fields, S., Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246
- Garcia-Ferres, C., Moreno, J. (1994) Oxidative modification and breakdown of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase induced in *Euglena gracilis* by nitrogen starvation. *Planta* 193, 208-215
- Gray, J., Close, P.S., Briggs, S.P., Johal, G.S. (1997) A novel suppressor of cell death in plants encoded by the Lls1 gene of maize. *Cell* 89, 25-31
- Green, L.S., Yee, B.C., Buchanan, B.B., Kamide, K., Sanada, Y., Wada, K. (1991) Ferredoxin and Ferredoxin-NADP reductase from photosynthetic and nonphotosynthetic tissues of tomato. *Plant Physiol.* 96, 1207-1213
- Grossmann, A., Bartlett, S., Chua, N.H. (1980) Energy dependent uptake of cytoplasmically synthesized polypeptides by chloroplasts. *Nature* 285, 625-628

- Guedeney, G., Corneille, S., Cuine, S., Peltier, G. (1996) Evidence for an association of ndh B, ndh J gene products and ferredoxin-NADP-reductase as components of a chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase complex. *FEBS Lett.* 378, 277-280
- Gutensohn, M., Schulz, B., Nicolay, P., Flügge, U.-I. (2000) Functional analysis of the two Arabidopsis homologues of toc34, a component of the chloroplast protein import apparatus. *Plant J.* 23, 771-783
- Hanahan, D. (1985) Techniques for transformation of *E.coli* In: DNA Cloning I, A Practical Approach, Glover, D.M., ed., IRL Press Ltd, Oxford, 109-135
- Hartl, F.U., Pfanner N., Nicholson, D.W., Neupert, W. (1989) Mitochondrial protein import. *Biochem. Biophys. Acta* 988, 1-45
- Heineke, D., Riens, B., Grosse, H., Hoferichter, P., Peter, U., Flügge, U.I., Heldt, H.W. (1991) Redox transfer across the inner chloroplast envelope membrane. *Plant Physiol.* 95, 1131-1137
- Herrmann, J.M., Neupert, W. (2000) What fuels polypeptide translocation? An energetical view on mitochondrial protein sorting. *Biochim. Biophys. Acta* 1459, 331-338
- Higushi, R. (1990) Recombinant PCR. In: PCR Protocols: A guide to methods and applications, pp. 177-183, Innis, M.A., Gelfand, D.A., Snisky, J.J., White, T.J., eds., Academic Press, Inc., San Diego.
- Hildago, E., Ding, H., Demple, B. (1997) Redox signal transduction via iron-sulfur clusters in the SoxR transcription activator. *Trends Biochem. Sci.* 21, 207-210
- Hinnah, S.C., Hill, K., Wagner, R., Schlicher, T., Soll, J. (1997) Reconstitution of a chloroplast protein import channel. *EMBO J.* 16, 7351-7360
- Hirsch, S., Muckel, E., Heemeyer, F., von Heijne, G., Soll, J. (1994) A receptor component of the chloroplast protein translocation machinery. *Science* 266, 1989-1992
- Holmes, D.S., Quigly, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem. Biophys.* 238, 193-197
- Howitt, C.A., Udall, P.K., Vermaas, W.F.J. (1999) Type 2 NADH Dehydrogenases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 are involved in regulation rather than respiration. *J. Bacteriol.* 181, 3994-4003
- Jackson, D.T., Froehlich, J.E., Keegstra, K. (1998) The hydrophilic domain of Tic110, an inner envelope membrane component of the chloroplastic protein translocation apparatus, faces the stromal compartment. *J. Biol. Chem.* 273, 16583-16588
- Jackson-Constan, D., Keegstra, K. (2001) Arabidopsis genes encoding components of the chloroplastic protein import apparatus. *Plant Physiol.* 125, 1567-1576
- Janknecht, R., Sander, C., Pongs, O. (1991) (HX)_n repeats: a pH-controlled protein-protein interaction motif of eukaryotic transcription factors ? *FEBS Lett.* 295, 1-2

- Jänsch, L., Krufft, V., Schmitz, U.K., Braun, H.P. (1998) Unique composition of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane from plants. *J. Biol. Chem.* 273, 17251-17257
- Jarvis, P., Chen, L.J., Li, H., Peto, C.A., Fankhauser, C., Chory, J. (1998) An Arabidopsis mutant defective in the plastid general protein import apparatus. *Science* 282, 100-103
- Keegstra, K., Cline, K. (1999) Protein import and routing systems of chloroplasts. *Plant Cell* 11, 557-570
- Keegstra, K., Olsen, L.J., Theg, S.M. (1989) Chloroplastic precursors and their transport across the envelope membranes. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40, 471-501
- Keegstra, K., Youssif, A.E. (1986) Isolation and characterization of chloroplast envelope membranes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40, 471-501
- Kessler, F., Blobel, G. (1996) Interaction of the protein import and folding machineries of the chloroplast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 7684-7689
- Kessler, F., Blobel, G., Patel, H.A., Schnell, D.J. (1994) Identification of two GTP-binding proteins in the chloroplast protein import machinery. *Science* 266, 1035-1039
- Kiebler, M., Pfaller, R., Söllner, T., Griffiths, G., Horstmann, Pfanner, N., Neupert, W. (1990) Identification of a mitochondrial receptor complex required for recognition and membrane insertion of precursor proteins. *Nature* 348, 610-616
- Ko, K., Budd, D., Wu, C., Seibert, F., Kourtz, L., Ko, Z.W. (1995) Isolation and characterization of a cDNA clone encoding a member of the Com44/Cim44 envelope components of the chloroplast protein import apparatus. *J. Biol. Chem.* 270, 28601-28608
- Koehler, C.M. (2000) Protein translocation pathways of the mitochondrion. *FEBS Lett.* 476, 27-31
- Kouranov, A., Chen, X., Fuks, B., Schnell, D.J. (1998) Tic20 and Tic22 are new components of the protein import apparatus at the chloroplast inner envelope membrane. *J. Cell Biol.* 143, 991-1002
- Kouranov, A., Schnell, D.J. (1997) Analysis of the interactions of preproteins with the import machinery over the course of protein import into chloroplasts. *J. Cell Biol.* 139, 1677-1685
- Kouranov, A., Wang, H., Schnell, D.J. (1999) Tic22 is targeted to the intermembrane space of chloroplasts by a novel pathway. *J. Biol. Chem.* 274, 25181-25186
- Kourtz, L., Ko, K. (1997) The early stage of chloroplast protein import involves Com70. *J. Biol. Chem.* 272, 2808-2813
- Krapp, A.R., Tognetti, V.B., Carillo, N., Acevedo, A. (1997) The role of ferredoxin-NADP+ reductase in the concerted cell defense against oxidative damage – studies using *Escherichia coli* mutants and cloned plant genes. *Eur. J. Biochem.* 249, 556-563

- Kusnetzov, V., Bolle, C., Lubberstedt, T., Sopory, S., Herrmann, R.G., Oelmüller, R. (1996) Evidence that the plastid signal and light operate via the same cis-acting elements in the promoters of nuclear genes for plastid proteins. *Mol. Gen. Genet.* 252, 631-639
- Kyhse-Anderson, J. (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels—a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* 10, 203-209
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Lamb, J.R., Tugendreich, S., Hieter, P. (1995) Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *Trends Biochem. Sci.* 20, 257-259
- Liere, K., Link, G. (1997) Chloroplast endoribonuclease p54 involved in RNA 3'-end processing is regulated by phosphorylation and redox state. *Nucleic Acids Res.* 25, 2403-2408
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randell, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- Lübeck, J., Soll, J., Akita, M., Nielsen, E., Keegstra, K. (1996) Topology of IEP110, a component of the chloroplastic protein import machinery present in the inner envelope membrane. *EMBO J.* 15, 4230-4238
- Ma, Y., Kouranov, A., LaSala, S.E., Schnell, D.J. (1996) Two components of the chloroplast protein import apparatus, IAP86 and IAP75, interact with the transit sequence during the recognition and translocation of precursor proteins at the outer envelope. *J. Cell Biol.* 134, 315-27
- Martin, W., Herrmann, R.G. (1998) Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and why? *Plant Physiol.* 118, 9-17
- Martinez-Julvez, M., Medina, M., Gomez-Moreno, C. (1999) Ferredoxin-NADP(+) reductase uses the same site for the interaction with ferredoxin and flavodoxin. *J. Biol. Inorg. Chem.* 4, 568-578
- Mason, H.S., Guerro, D., Boyer, J.S., Mullet, J.E. (1988) Proteins homologous to leaf glycoproteins are abundant in stems of darkgrown seedlings. Analysis of proteins and cDNAs. *Plant Mol. Biol.* 11, 845-856
- Mason, J.R., Cammack, R. (1992) The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* 46, 277-305
- Matlack, K.E.S., Mothes, W., Rapoport, T.A. (1998) Protein translocation: tunnel vision. *Cell* 92, 381-390
- May, T., Soll, J. (2000) 14-3-3 proteins form a guidance complex with chloroplast precursor proteins in plants. *Plant Cell* 12, 53-64
- Miziorko, H.M., Lorimer, G.H. (1983) Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 507-535

- Morigasaki, S., Takata, K., Sanada, Y., Wada, K., Yee, B.C., Shin, S., Buchanan, B.B. (1990) Novel forms of ferredoxin and ferredoxin-NADP reductase from spinach roots. *Arch. Biochem. Biophys.* 283, 75-80
- Nielsen, E., Akita, M., Davila-Aponte, J., Keegstra, K. (1997) Stable association of chloroplastic precursors with protein translocation complexes that contain proteins from both envelope membranes and a stromal Hsp100 molecular chaperone. *EMBO J.* 16, 935-946
- Ohnishi, T., Meinhardt, S.W., von Jagow, W., Yugi, T., Hatefi, Y. (1994) Effect of ethoxy formic anhydride on Rieske iron-sulfur protein of bovine heart ubiquinol:cytochrome c oxidoreductase. *FEBS Lett.* 353, 103-107
- Olsen, L.J., Keegstra, K. (1992) The binding of precursor proteins to chloroplasts requires nucleoside triphosphates in the intermembrane space. *J. Biol. Chem.* 267, 433-439
- Onda, Y., Matsumura, T., Kimata-Arigo, Y., Sakakibara, H., Sugiyama, T., Hase, T. (2000) Differential interaction of maize root ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase with photosynthetic and non-photosynthetic ferredoxin isoproteins. *Plant Physiol.* 123, 1037-1045
- Oswald, O., Martin, T., Dominy, P.J., Graham, I.A. (2001) Plastid redox state and sugars: interactive regulators of nuclear-encoded photosynthetic gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 2047-2052
- Pain, D., Kanwar, Y.S., Blobel, G. (1988) Identification of a receptor for protein import into chloroplasts and its localization to envelope contact zones. *Nature* 331, 232-237
- Palatnik, J.F., Valle, E.M., Carillo, N. (1997) Oxidative stress causes ferredoxin-NADP⁺ reductase solubilization from the thylakoid membranes in methyl viologen-treated plants. *Plant Physiol.* 115, 1721-1727
- Pang, P., Meathrel, K., Ko, K. (1997) A component of the chloroplast protein import apparatus functions in bacteria. *J. Biol. Chem.* 272, 25623-25627
- Paulsen, H., Rümmler, U., Rüdiger, W. (1990) Reconstitution of pigment containing complexes from light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein overexpressed in *Escherichia coli*. *Planta* 181, 204-211
- Perry, S.E., Keegstra, K. (1994) Envelope membrane proteins that interact with chloroplastic precursor proteins. *Plant Cell* 6, 93-105
- Pfannschmidt, T., Nilsson, A., Allen, J.F. (1999a) Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature* 397, 625-628
- Pfannschmidt, T., Nilsson, A., Tullberg, A., Link, G., Allen, J.F. (1999b) Direct transcriptional control of the chloroplast genes psbA and psaAB adjusts photosynthesis to light energy distribution in plants. *IUBMB* 48, 271-276
- Richter, S., Lamppa, G.K. (1999) Stromal processing peptidase binds transit peptides and initiates their ATP-dependent turnover in chloroplasts. *J. Cell Biol.* 147, 33-44

- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, B., Scharf, S.J., Higushi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Ehrlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491
- Salvador, M.L., Klein, U. (1999) The redox state regulates RNA degradation in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 121, 1367-1374
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schägger, H., Cramer, W.A., von Jagow, G. (1994) Analysis of molecular mass and oligomeric state of protein complexes by the blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* 217, 220-230
- Schägger, H., von Jagow, G. (1987) Tricine-Sodium dodecyl-sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368-379
- Schägger, H., von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 199, 223-231
- Schindler, C., Hracky, R., Soll, J. (1987) Protein transport into chloroplasts: ATP is a prerequisite. *Z. Naturforsch.* 42c, 103-108
- Schleiff, E., Soll, J. (2000) Travelling of proteins through membranes: translocation into chloroplasts. *Planta* 211, 449-456
- Schnell, D.J., Blobel, G. (1993) Identification of intermediates in the pathway of protein import into chloroplasts and their localization to envelope contact sites. *J. Cell Biol.* 120, 103-115
- Schnell, D.J., Blobel, G., Keegstra, K., Kessler, F., Ko, K., Soll, J. (1997) A consensus nomenclature for the protein-import components of the chloroplast envelope. *Trends Cell Biol.* 7, 303-304
- Schwartz, R.M., Dayhoff, M.O. (1978) Origins of prokaryotes, eukaryotes, mitochondria, and chloroplasts. *Science* 199, 395-403
- Seedorf, M., Waagemann, K., Soll, J. (1995) A constituent of the chloroplast import complex represents a new type of GTP-binding protein. *Plant J.* 7, 401-411
- Short, J.M., Fernandez, J.M., Sorge, J.A., Huse, W.D. (1988) ?ZAP: a bacteriophage ? expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res.* 16, 7583-7600
- Smith, R.F., Wiese, B.A., Wojzynski, M.K., Davison, D.B., Worley, K.C. (1996) BCM Search Launcher – an integrated interface to molecular biology data base search and analysis services available on world wide web. *Genome Res.* 5, 454-462
- Sohrt, K., Soll, J. (2000) Toc64, a new component of the protein translocon of chloroplasts. *J. Cell Biol.* 148, 1213-1221

- Soll, J., Tien, R. (1998) Protein translocation into and across the chloroplastic envelope membranes. *Plant Mol. Biol.* 38, 191-207
- Stahl, T., Glockmann, C., Soll, J., Heins, L. (1999) Tic40, a new "old" subunit of the chloroplast protein import translocon. *J. Biol. Chem.* 274, 37467-37472
- Studier, F.W., Moffat, B. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113-130
- Sugiura, M. (1989) The chloroplast chromosomes in land plants. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5, 51-70
- Sveshnikov, D. (2000) Routing of Tic110 to the chloroplast inner envelope membrane, Dissertation, CAU Kiel
- Sveshnikova, N., Soll, J., Schleiff, E. (2000) Toc34 is a preprotein receptor regulated by GTP and phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 4973-4978
- Theg, S.M., Bauerle, C., Olsen, L.J., Selman, B.R., Keegstra, K. (1989) Internal ATP is the only energy requirement for the translocation of precursor proteins across chloroplastic membranes. *J. Biol. Chem.* 264, 6730-6736
- Towbin, H., Staehlin, T., Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354
- Tullberg, A., Alexciev, K., Pfannschmidt, T., Allen, J.F. (2000) Photosynthetic electron flow regulates transcription of the *psbA* gene in pea (*Pisum sativum* L.) chloroplasts through the redox state of the plastoquinon pool. *Plant Cell Physiol.* 41, 1045-1054
- Vallejos, R.H., Ceccarelli, E., Chan, R. (1984) Evidence for the existence of a thylakoid intrinsic protein that binds ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* 259, 8048-8051
- van den Wijngaard, P.W., Demmers, J.A., Thompson, S.J., Wienk, H.L., de Kruijff, B., Vredenberg, W.J. (2000) Further analysis of the involvement of the envelope anion channel PIRAC in chloroplast protein import. *Eur. J. Biochem.* 267, 3812-3817
- van den Wijngaard, P.W., Vredenberg, W.J. (1997) A 50-Picosiemens anion channel of the chloroplast envelope is involved in chloroplast protein import. *J. Biol. Chem.* 272, 29430-29433
- van den Wijngaard, P.W., Vredenberg, W.J. (1999) The envelope anion channel involved in chloroplast protein import is associated with Tic110. *J. Biol. Chem.* 274, 25201-25204
- van't Hof, R., van Klompenburg, W., Pilon, M., Ko, A., de Korte-Kool, G., Demel, R.A., Weisbeek, P.J., de Kruijff, B. (1993) The transit sequence mediates the specific interaction of the precursor of ferredoxin with chloroplast envelope membrane lipids. *J. Biol. Chem.* 268, 4037-4042
- Waegemann, K., Eichacker, L., Soll, J. (1992) Outer envelope membranes of chloroplasts are isolated as right-side-out vesicles. *Planta* 187, 89-94

- Waagemann, K., Soll, J. (1995) Characterization and isolation of the chloroplast protein import machinery. *Methods Cell Biol.* 50, 255-267
- Waagemann, K., Soll, J. (1996) Phosphorylation of the transit sequence of chloroplast precursor proteins. *J. Biol. Chem.* 271, 6545-6554
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z., Graham, M.W. (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance of cytosin methylation in plasmid and phage recombination. *Nucleic Acids Res.* 17, 3469-3478
- Worley, K.C., Culpepper, P., Wiese, B.A., Smith, R.F. (1998) Beaty X: enhanced BLAST searches for DNA queries. *Bioinformatics* 14, 890-891
- Worley, K.C., Wiese, B.A., Smith, R.F. (1995) BEAUTY: an enhanced BLAST-based search tool that integrates multiple biological information resources into sequence similarity search results. *Genome Res.* 5, 173-184
- Wu, C., Seibert, F.S., Ko, K. (1994) Identification of chloroplast envelope proteins in close proximity to a partially translocated chimeric precursor protein. *J. Biol. Chem.* 269, 32264-32271
- Zheng, M., Åslund, F., Storz, G. (1998) Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* 279, 1718-1721

8 ANHANG

8.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
at	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BBL	Medium zur Plattierung von Bakterien
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Idolylphosphat-p-Toluidinsalz
Bis-Tris	[Bis(2-hydroxyethyl)imino]tris(hydroxymethyl)methan
BN	Blau-Nativ (blue native)
BS ³	Bis(sulfosuccinimidyl)Suberat
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
cDNA	komplementäre (copy-) DNA
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DSP	Dithiobis(Succinimidyl)Propionat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und Mitarbeiter
Fab	Antigen bindendes Fragment (antigen binding fragment)
FNR	Ferredoxin-NADP ⁺ Oxidoreduktase
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure
Hip	durch Hitzeschockinduziertes Protein (heat shock induced protein)
Hsp	Hitzeschock-Protein (heat shock protein)
IEP	Protein der inneren Chloroplastenhüllmembran (inner envelope protein)
IgG	Immunglobulin G
LBM	Medium zur Anzucht von Bakterien
LRWhite	Kunststoff zur Einbettung von elektronenmikroskopischen Präparaten
LSU	große Untereinheit der RUBISCO (large subunit)
M	Molekulargewicht
M9ZB	Medium zur Anzucht von Bakterien (Überexpression)
MAMIPU	Magermilchpuffer
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
NAD	Nikotinsäureamid-adenin-dinukleotid
NADP	Nikotinsäureamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NBT	4-Nitrotetrazoliumchloridblau-Hydrat
Ni ²⁺ -NTA	Nickel-Nitrolotriessigsäure
N-Terminus	Amino-Terminus
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDR	Phthalat-Dioxygenase Reduktase
pfu	Plaque bildende Einheit (plaque forming unit)
PI	Preimmunserum
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

ps	<i>Pisum sativum</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R1/2/3/4	repetitives Motiv
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
RT	Reverse Transkriptase
RUBISCO	Ribulose-1-5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
s	stromal
SDS	Natriumdodecylsulfat
SM	Medium zur Transfektion von Bakterien
SPP	stromale Prozessierungspeptidase
SSU	kleine Untereinheit der RUBISCO (small subunit)
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
Tic	Translokon der inneren Chloroplastenhüllmembran
Tim	Translokon der inneren Mitochondrienmembran
Toc	Translokon der äußeren Chloroplastenhüllmembran
TP	Transitpeptid
TPR	34-Aminosäure-Wiederholung (tetratrico peptide repeat)
Tricin	N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid

8.2 Aminosäuren

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

8.3 Nucleoside und Nucleotide

A	Adenosin	N	A, C, G, T, U
C	Cytosin	dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
G	Guanin	NMP	Nucleosidmonophosphat
T	Thymidin	NDP	Nucleosiddiphosphat
U	Uracil	NTP	Nucleosidtriphosphat

8.4 Einheiten

A	Ampère	?	Wellenlänge
?	? ngström	m	Meter
bp	Basenpaare	M	Mol, mol/l
°C	Grad Celsius	min	Minute
Ci	Curie	sec	Sekunde
c	Konzentration	U	Unit, Einheit
d	Tag	V	Volt
Da	Dalton		
xg	x-faches der Erdbeschleunigung		
g	Gramm		
h	Stunde		
l	Liter		

8.5 Größenordnungen

k	kilo-	10^2
c	centi-	10^{-2}
m	milli-	10^{-3}
μ	mikro-	10^{-6}
n	nano-	10^{-9}
p	piko-	10^{-12}

Lebenslauf

Michael Küchler

Geburtsdatum: 04.05.1970
Geburtsort: Berlin
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulischer Werdegang

August 1976 – Juli 1982 Besuch der Hermann-Schulz-Grundschule
in Berlin-Reinickendorf
August 1982 – Juli 1989 Besuch der Walther-Rathenau-Oberschule
in Berlin-Wilmersdorf
Mai 1989 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

Berufsausbildung

September 1989 – Juli 1992 Besuch der Lise-Meitner-Schule / OSZ Chemie,
Physik und Biologie in Berlin-Neukölln
Juli 1992 Abschluß der Berufsausbildung zum
Biologisch-technischen Assistenten

Universitärer Werdegang

Oktober 1992 – Januar 1998 Studium der Biologie an der Freien Universität Berlin
Januar 1997 – Januar 1998 Anfertigung der externen Diplomarbeit in der
Arbeitsgruppe von Prof.Dr. U.K. Schmitz an der
Universität Hannover
Thema: „Vergleichende Analyse der Präprotein-
Translokase der äußeren Mitochondrienmembran aus
Saccharomyces cerevisiae und höheren Pflanzen“
seit Februar 1998 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in der
Arbeitsgruppe von Prof.Dr. J. Soll

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Ich habe keine früheren Promotionsversuche unternommen.

Kiel, den