

**Elektrophysiologische und biochemische
Charakterisierung von rekombinanten und nativen
Kanalproteinen aus der inneren Chloroplasten-
Hüllmembran und dem Cyanobakterium *Synechocystis***

von Alexander Mehrle, Dipl. Biol.

Dem Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Osnabrück
zur Verleihung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
vorgelegte Dissertation

Osnabrück, im März 2001

1	Einleitung	1
1.1	Metabolittransport in und aus dem Chloroplasten	2
1.1.1	Transport über die äußere Chloroplasten-Hüllmembran	2
1.1.2	Transport über die innere Chloroplasten-Hüllmembran	3
1.2	Proteinimport in Chloroplasten	4
1.2.1	Proteinimportapparat der äußeren Chloroplasten-Hüllmembran	5
1.2.2	Proteinimportapparat der inneren Chloroplasten-Hüllmembran	5
1.2.3	Transitsequenz und deren Erkennung	6
1.3	Kaliumkanäle	7
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit	8
2	Material und Methoden	9
2.1	Materialnachweis	9
2.2	Zellkultur	11
2.2.1	Kultur von Sf21 Insektenzellen	11
2.2.2	Kryokonservierung von Insektenzellen	11
2.3	Molekularbiologische und biochemische Methoden	11
2.3.1	Medien zur Anzucht von Bakterien	11
2.3.2	Bakterienanzucht und Konservierung	12
2.3.3	Herstellung kompetenter Zellen	12
2.3.4	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA	12
2.3.5	Minipräparation von Plasmid-DNA	13
2.3.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	13
2.3.7	DNA-Präzipitation	13
2.3.8	Agarose Gelelektrophorese	14
2.3.9	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	14
2.3.10	Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen	14
2.3.11	Klonierungen	14
2.3.11.1	Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	14
2.3.11.2	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA	15
2.3.11.3	Phosphorylierung von DNA-Fragmenten	15
2.3.11.4	Auffüllen von überhängenden 5' Enden	15
2.3.11.5	Ligation von DNA-Fragmenten	15
2.3.11.6	Insertion von Oligonukleotidkassetten	16
2.3.11.7	Klonierung von PCR-Produkten	16
2.3.12	Sequenzierungen	16
2.3.13	Heterologe Expression von Proteinen	17
2.3.13.1	Heterologe Expression in E. coli mittels des pET-Systems	17
2.3.13.2	Heterologe Expression von Proteinen in Insektenzellen	17
2.3.14	Solubilisierung von Membranproteinen aus Insektenzellen	19

2.3.15	Reinigung von Membranproteinen mittels Nickel-chelatierender Agarose....	19
2.3.16	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	19
2.3.17	Konzentrationsbestimmung von Protein-Lösungen	20
2.3.18	Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	20
2.3.19	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen....	21
2.3.20	Reinigung von Lipid und Herstellung von Liposomen	21
2.3.21	Rekonstitutionen von Membranproteinen	22
2.3.21.1	Rekonstitutionen mit TritonX-100.....	22
2.3.21.2	Rekonstitution mit Mega-9	22
2.3.22	Fusion von nativen Membranen mit Lipid	23
2.4	Elektrophysiologie	23
2.4.1	Elektrophysiologische Grundlagen	23
2.4.1.1	Datenerfassung	24
2.4.2	Planare Bilayer	24
2.4.2.1	Aufbau des Messstandes	24
2.4.2.2	Lösungen und Puffer	26
2.4.2.3	Experimentelle Durchführung.....	26
2.4.3	Patch-Clamp-Technik.....	27
2.4.3.1	Messaufbau	27
2.4.3.2	Messpuffer.....	28
2.4.4	Datenauswertung und mathematische Berechnungen	27
2.4.4.1	Vorzeichenkonventionen.....	27
2.4.4.2	Leitwerte	28
2.4.4.3	Selektivität.....	28
2.4.4.4	Offenwahrscheinlichkeit	29
2.4.4.5	Bestimmung der Porengröße.....	30
2.4.4.6	Spannungsrampen	31
2.4.4.7	Spannungssprung-Protokolle	31
2.4.5	Peptide	32
2.4.5.1	Troe33	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Charakterisierung eines putativen Chloroplasten-Kaliumkanals.....	33
3.1.1	Primärstruktur und Sekundärstrukturvorhersage.....	33
3.1.2	Expression in Sf21-Insektenzellen	35
3.1.2.1	Patch-Clamp-Messungen	35
3.1.2.2	Solubilisierung und Reinigung.....	36
3.2	Charakterisierung eines putativen Synechocystis-Kaliumkanals	37
3.2.1	Primärstruktur und Sekundärstrukturvorhersage.....	37
3.2.2	Klonierung von sll0993	38
3.2.2.1	Klonierung in den pET-Vektor und Expression in E. coli	38
3.2.2.2	Klonierung in pFastbac und Expression in Insektenzellen	39

3.2.3	Patch-Clamp-Messungen	41
3.2.4	Reinigung.....	41
3.2.5	Rekonstitution und Bilayer-Messungen.....	42
3.3	Charakterisierung von Tic110	43
3.3.1	Angenommene Sekundärstruktur.....	43
3.3.2	Expression und Reinigung	44
3.3.3	Elektrophysiologische Charakterisierung des rekombinanten Tic110	44
3.3.3.1	Leitwert und Selektivität.....	45
3.3.3.2	Offenwahrscheinlichkeit.....	46
3.3.3.3	Porendurchmesser	47
3.3.3.4	Einfluss von Troe33 auf Tic110	47
3.4	Elektrophysiologische Charakterisierung der inneren Chloroplasten-Hüllmembran	48
3.4.1	Charakterisierung CIMCC1	50
3.4.1.1	Leitwerte und Selektivität.....	52
3.4.1.2	Offenwahrscheinlichkeit.....	53
3.4.1.3	Effekt von Troe33.....	53
3.4.2	Charakterisierung von CIMCC2	53
3.4.2.1	Selektivität und Leitwert.....	53
3.4.2.2	Einfluss von Troe33 auf den Kanal	54
4	Diskussion.....	57
4.1	Putative Kaliumkanäle in Chloroplasten und Cyanobakterien.....	57
4.1.1	Expression der Proteine	58
4.1.2	Patch-Clamp-Messungen	59
4.1.3	Reinigung.....	60
4.1.4	Bilayer-Messungen	61
4.2	Tic110.....	62
4.2.1	Grundlegende Eigenschaften und Sekundärstruktur.....	62
4.2.2	Leitwert und Porengröße.....	63
4.2.3	Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit.....	64
4.2.4	Selektivität	65
4.2.5	Einfluss von Troe33 auf Tic110	66
4.2.6	Mögliche Funktion von Tic110 in vivo	68
4.3	Kanäle in der inneren Chloroplasten-Hüllmembran	71
4.3.1	Charakterisierung von CIMCC1	72
4.3.1.1	Grundlegende Eigenschaften	72
4.3.1.2	Effekt von Präpeptiden auf CIMCC1	73
4.3.1.3	Mögliche Rolle des Kanals in vivo.....	73
4.3.2	Charakterisierung von CIMCC2	74
4.3.2.1	Grundlegende Eigenschaften.....	74
4.3.2.2	Effekt von Präpeptiden auf CIMCC2.....	75

4.3.2.3	Mögliche Bedeutung des Kanals in vivo	75
5	Zusammenfassung	77
6	Anhang	79
6.1	Literaturverzeichnis	79
6.2	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	89
6.3	Abkürzungsverzeichnis	91
6.4	Publikationsliste.....	93

1 Einleitung

Chloroplasten erfüllen zahlreiche biosynthetische Funktionen wie zum Beispiel CO₂-Reduktion und Assimilation und die Reduktion von Nitrit und Sulfat und deren Umwandlung in organische Substanzen. Um diese Funktionen zu erfüllen, müssen Chloroplasten einerseits anorganische Anionen und Kationen sowie Stoffwechsel-Zwischenprodukte aufnehmen, andererseits aber auch die Syntheseprodukte wieder exportieren. Deshalb existieren in den Hüllmembranen sowohl spezifische Translokatoren als auch Kanäle und andere porenbildende Proteine (Abb. 1.1).

Der Endosymbiontenhypothese zufolge stammen Chloroplasten von einem Vorgänger der Cyanobakterien ab, der endocytotisch von einer eukaryontischen Wirtszelle aufgenommen wurde (Gray, 1992). Im Laufe der Plastid-Evolution, bei der das autonome, gram-negative Bakterium in ein semi-autonomes Zellorganell umgewandelt wurde, erfolgte auch eine Verlagerung vieler Gene des Bakteriums in den Zellkern des Wirts. Deshalb wurde die Etablierung einer Proteinimportmaschinerie notwendig, um die Proteine post-translational wieder in den Chloroplasten zu importieren.

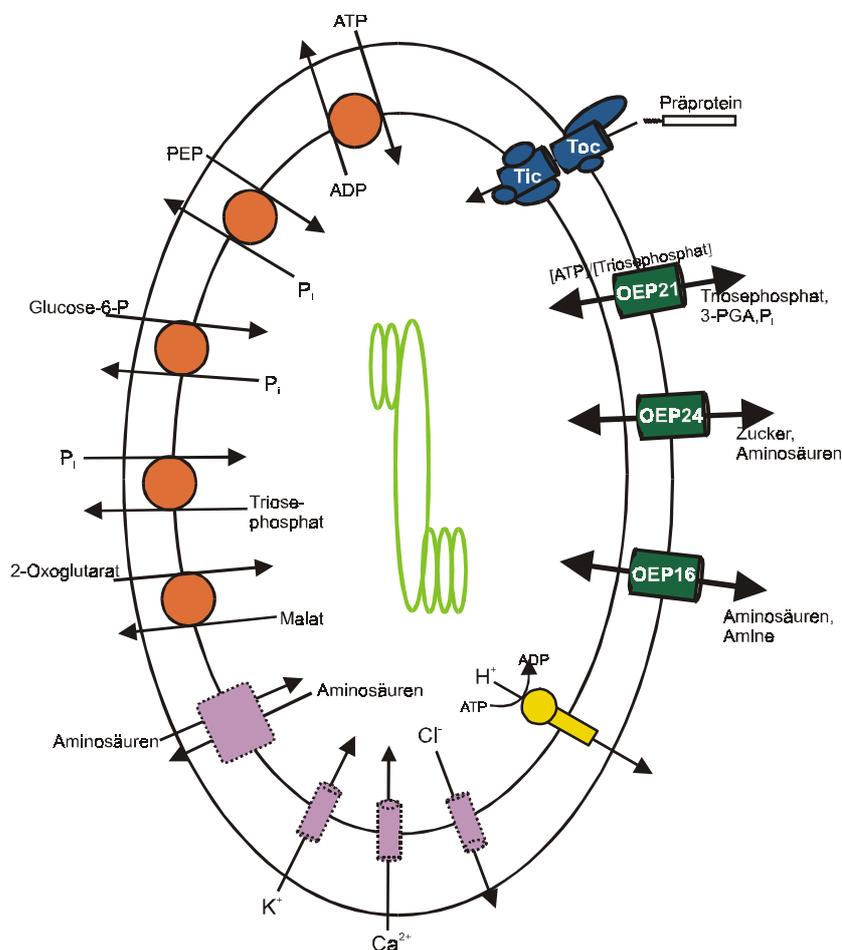


Abb. 1.1 Übersicht über die Transportsysteme der Chloroplasten-Hüllmembranen.
Orange Kreise: Translokatoren der inneren Hüllmembran
Violette Quadrate: Aminosäuretransportsysteme der inneren Membran
Violette Zylinder: Ionenkanäle der inneren Membran
Gelb: ATP-abhängige Protonenpumpe der inneren Membran
Grüne Zylinder: Porin-ähnliche Substratkanäle der äußeren Membran
Tic, Toc: Proteintranslokationsapparat

(Aus Steinkamp, 2000)

Es bestehen vielerlei Übereinstimmungen zwischen Transportproteinen bzw. Poren in den Chloroplasten-Hüllmembranen und denen in Membranen von Prokaryonten. Beispielsweise ähneln die porenbildenden Proteine der äußeren Chloroplasten-Hüllmembran strukturell denen bakterieller Porine (Neuhaus und Wagner, 2000).

Im Genom von *Synechocystis* sp. PCC 6803 finden sich mehrere Gene, deren abgeleitete Aminosäuresequenz Ähnlichkeiten zu den Proteinimportporen der Chloroplasten besitzt (Reumann und Keegstra, 1999). Im *Synechocystis*-Genom und in anderen gram-negativen Bakterien konnten putative Kaliumkanäle identifiziert werden, im Genom von *Arabidopsis thaliana* wurde ein potentieller Kaliumkanal mit chloroplastidärer Lokalisation gefunden. Darüber hinaus besitzt der ADP/ATP-Antiporter der inneren Chloroplasten-Hüllmembran Aminosäure-Sequenzähnlichkeit zu einem Protein aus *Rickettsia powazekii* (Neuhaus und Wagner, 2000).

1.1 Metabolittransport in und aus dem Chloroplasten

1.1.1 Transport über die äußere Chloroplasten-Hüllmembran

Es wurde lange Zeit angenommen, dass die äußere Hüllmembran des Chloroplasten für Moleküle mit einem Molekulargewicht von bis zu 10 kDa frei permeabel ist und diese Permeabilität durch eine sehr große Pore vermittelt wird (Flügge und Benz, 1984). Mittlerweile konnten aber drei teilweise spezifische Transportproteine in dieser Membran nachgewiesen werden.

Elektrophysiologische Studien mit Chloroplasten oder isolierten Hüllmembranen zeigten bereits das Vorhandensein verschiedener spannungsabhängiger Poren mit großem Leitwert in den Chloroplasten-Hüllmembranen (Pottosin, 1992; Flügge und Benz, 1984; Heiber *et al.*, 1995). Auf molekularer Ebene konnten, neben dem Proteinimportkanal Toc75, drei Kanalproteine (OEPs, outer envelope proteins) charakterisiert werden. Es sind dies OEP16, OEP21 und OEP24.

OEP16 bildet einen Kationen-selektiven Kanal mit einer Spezifität für Aminosäuren und Amine (Pohlmeyer *et al.*, 1997); OEP24 repräsentiert einen eher unselektiven Kanal, der den Durchtritt von geladenen Aminosäuren, ATP, Phosphaten und Triosen ermöglicht (Pohlmeyer *et al.*, 1998) und OEP21 bildet einen Anionen-selektiven Kanal, der wahrscheinlich der Translokation von Phosphat, Triosephosphaten und 3-Phosphoglycerat dient und durch ATP regulierbar ist (Bölter *et al.*, 1999).

1.1.2 Transport über die innere Chloroplasten-Hüllmembran

In der inneren Chloroplasten-Hüllmembran konnte bis jetzt eine große Zahl von Transportproteinen entdeckt werden. Dazu zählt beispielsweise eine Familie von Phosphat-Translokatoren, die für einen kontrollierten Austausch von Phosphat gegen phosphorylierte Metabolite sorgt. Weiterhin existieren ein ATP/ADP-Antiporter, zwei kaskadierte Dicarboxylsäure-Transporter (ebenfalls Antiporter) und ein bisher nicht näher charakterisierter Glucose-Transporter (Neuhaus und Wagner, 2000).

Elektrophysiologische Messungen an intakten Chloroplasten oder an Proteoliposomen zeigten das Vorhandensein eines Kaliumkanals in der inneren Chloroplasten-Hüllmembran (Heiber *et al.*, 1995; Mi *et al.*, 1994), der durch ATP blockierbar ist. Ein ATP-regulierter Kaliumkanal konnte auch durch Flussmessungen an intakten Chloroplasten nachgewiesen werden (Shingles und McCarty, 1994).

Bisher konnte aber das den Kanal codierende Gen noch nicht gefunden werden. In der EMBL-Datenbank befindet sich zwar eine cDNA, die wahrscheinlich für einen chloroplastidären Kaliumkanal codiert, deren Funktion aber noch nicht nachgewiesen werden konnte.

Ferner konnte gezeigt werden, dass die innere Chloroplasten-Hüllmembran permeabel für Chloridionen ist (Wu und Berkowitz, 1991). Mittels der Patch-Clamp-Technik konnte die Existenz eines Chloridkanals, der wahrscheinlich in der inneren Membran lokalisiert ist, nachgewiesen werden (Pottosin, 1992).

Ionenkanäle in der inneren Chloroplasten-Hüllmembran dienen wahrscheinlich der Regulation des Membranpotentials und partizipieren an der Aufrechterhaltung des Protonengradienten über dieser Membran (Neuhaus und Wagner, 2000). Der pH des Chloroplasten-Stromas liegt in etwa bei acht, was dem optimalen pH der Schlüsselenzyme der lichtinduzierten CO₂-Fixierung entspricht. Zur Aufrechterhaltung dieses pH-Wertes dient eine ATPase, die Protonen über über die innere Membran aus dem Stroma pumpt. Dieser Protonenfluss ist wahrscheinlich indirekt mit einem Kaliumfluss aus dem Cytosol in das Stroma verbunden (Berkowitz und Peters, 1993; Huber und Maury, 1980; Maury *et al.* 1981; Wu und Berkowitz, 1991; Wu und Berkowitz, 1992). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Protonengradient über die innere Membran einen Calcium-Protonen-Uniporter antreibt (Kreimer *et al.*, 1985; Roh *et al.*, 1998).

Zusätzlich zu den bisher beschriebenen Kanälen, die einen relativ kleinen Leitwert aufweisen, konnte mittels elektrophysiologischer Messungen in der inneren Hüllmembran ein Porin-ähnlicher Kanal entdeckt werden. Dieser hat einen relativ großen (>500 pS) Leitwert und ist leicht Anionen-selektiv (Fuks und Homble, 1995). Bei Chloroplasten von *Nitellopsis* sp. konnten zwei

Kationen-selektive Kanäle mit großem Leitwert gefunden werden (Pottosin, 1992). Die genaue Zuordnung zu den Hüllmembranen sowie die molekulare Identität dieser Poren ist aber noch unklar.

1.2 Proteinimport in Chloroplasten

Die prinzipiellen funktionellen Eigenschaften des chloroplastidären Proteinimports gleichen denen anderer Proteintransportsysteme (Proteinexport über die Bakterienmembran(en), Proteinimport in Mitochondrien oder das Endoplasmatische Retikulum (Schatz und Dobberstein, 1996)).

Die zu transportierenden Proteine werden mit N-terminalen Signalsequenzen (Transitsequenzen) synthetisiert, die ihren Zielort festlegen. Diese werden von cytosolischen Faktoren erkannt und zu dem entsprechenden Proteinimportapparat dirigiert, während das Protein in einer transportkompetenten Form gehalten wird. Nach Interaktion mit Rezeptorkomponenten des Importapparates wird das Protein durch eine hydrophile Pore über die Membran transportiert, die Signalsequenz abgespalten und das Protein anschließend in seine endgültige Konformation gefaltet

Der Haupt-Importweg für Proteine in den Chloroplasten ist der ‚general import pathway‘ (GIP). Dieser setzt sich aus zwei heteromeren Proteinkomplexen zusammen: dem Toc- (translocon of the outer envelope of chloroplasts) und dem Tic- (translocon of the inner envelope of chloroplasts) Komplex (Schnell *et al.*, 1997). Die Translokation über diesen Weg benötigt sowohl ATP als auch GTP (Olsen *et al.*, 1989; Kouranov und Schnell, 1997; Young *et al.*, 1999). Geringe ATP-Konzentrationen ($< 50 \mu\text{M}$) bewirken die Bindung des Präproteins an den Komplex, während höhere ATP-Konzentrationen ($> 100 \mu\text{M}$) notwendig für die Translokation der Proteine ins Stroma sind (Flügge und Hinz, 1986; Schindler *et al.*, 1987; Olsen *et al.* 1989; Theg *et al.*, 1989; Waegemann und Soll, 1991). Stromales ATP ist die Energiequelle für den Translokationsprozess, GTP ist wichtig für dessen Regulation.

Eine weitere Regulation des Proteinimports stellt die Phosphorylierung/Dephosphorylierung der Transitsequenz dar. Phosphorylierung erhöht die Bindungsaffinität an den Importkomplex, während die Dephosphorylierung wichtig für die weitere Translokation ist (Waegemann und Soll, 1996; Sveshnikowa *et al.*, 2000).

Der Proteinimport erfolgt höchstwahrscheinlich simultan über beide Hüllmembranen. Im Stroma erfolgen dann, wie schon erwähnt, die Abspaltung des Transitpeptids und die Faltung des reifen Proteins unter Beteiligung von Chaperonen bzw. der Weitertransport von

Thylakoidproteinen über die Thylakoidmembran (Heins *et al.*, 1998).

1.2.1 Proteinimportapparat der äußeren Chloroplasten-Hüllmembran

Die Translokation von Proteinen über die äußere Hüllmembran des Chloroplasten wird vom Toc-Komplex vermittelt. Bis jetzt konnten vier integrale Membranproteine (Toc34, Toc75, Toc160 und Toc64) als funktionelle Komponenten identifiziert werden. Weiterhin konnten noch zwei Hsp70-ähnliche Proteine mit Chaperon-Funktion nachgewiesen werden, die jeweils an der Außen- bzw der Innenseite der Membran mit dem Komplex assoziiert sind (Vothknecht und Soll, 2000).

Toc160 gilt als Rezeptorkomponente des Komplexes. Die N-terminalen 700 AS sind cytosolisch lokalisiert und weisen einen hohen Anteil negativ geladener Reste auf, die an der Bindung der positiv geladenen Präproteine beteiligt sein könnten (Waegemann *et al.*, 1992; Hirsch *et al.*, 1994; Bauer *et al.*, 2000). Das Protein kann phosphoryliert werden (Soll, 1985) und weist ATP- und GTP-Bindestellen in der cytosolischen Domäne auf. Deshalb wird ihm auch eine regulatorische Funktion zugeschrieben.

Toc75 besitzt eine Sekundärstruktur, die vermutlich aus β -Faltblättern und einem geringen Anteil an α -Helices besteht (Tranel *et al.*, 1995). Es wird angenommen, dass es die Pore des Proteintranslokationsapparates darstellt (Hinnah *et al.*, 1997; Hinnah, 1999).

Toc34 liegt eng assoziiert mit Toc75 vor (Seedorf *et al.*, 1995). Es ist mit seinem hydrophoben C-Terminus in der Membran verankert, die N-terminale Domäne liegt im Cytosol (Kessler *et al.*, 1994; Seedorf *et al.*, 1995). Es besitzt eine Phosphorylierungsstelle (Lubeck *et al.*, 1997) und bindet GTP (Kessler *et al.*, 1994), weshalb eine regulatorische Funktion vermutet wird.

Toc 64 besitzt einen längeren C-Terminus, der im Cytosol lokalisiert ist. Dieser cytosolische Bereich besitzt ein TPR-Motiv, welches potentiell in Protein-Protein-Wechselwirkungen involviert ist (Sohrt und Soll, 2000).

1.2.2 Proteinimportapparat der inneren Chloroplasten-Hüllmembran

Im Gegensatz zum Toc-Komplex ist über die Topologie und Funktion des Proteinimportkomplexes der inneren Chloroplasten-Hüllmembran wesentlich weniger bekannt. Bisher wurden fünf Komponenten entdeckt: Tic110, Tic55, Tic22, Tic40 und Tic20 (Vothknecht und Soll, 2000).

Tic110 wird eine Rolle bei der Interaktion mit dem Toc-Komplex zugeschrieben, außerdem

interagiert es auf der Stromseite der Membran mit den Chaperonen Hsp100 und Cpn60 (Kessler *et al.*, 1994; Lübeck *et al.*, 1996; Akita *et al.*, 1997; Nielsen *et al.*, 1997). Weiterhin wurde ein kleiner Anionen-Kanal gefunden, der mit Tic110 assoziiert ist. Die Funktion dieses Kanals wird durch Präproteine moduliert und spielt deshalb wahrscheinlich eine Rolle beim Proteinimport (Van den Wijngaard und Vredenberg, 1997; Van den Wijngaard und Vredenberg, 1999). Tic55 wurde bei Immunopräzipitationsexperimenten zusammen mit Tic110 gefunden. Es besitzt ein Rieske-Typ Eisen-Schwefel-Zentrum und eine mononukleare Eisen-Bindestelle. Eine Modifikation dieser Eisen-Bindestelle bewirkt ein Verbleiben des Präproteins im Tic-Komplex, was einen Stopp des Proteinimports zur Folge hat (Caliebe *et al.*, 1997). Tic40 ist ein integrales Membranprotein und konnte mit den anderen Proteinen des Tic-Komplexes quervernetzt werden (Stahl *et al.*, 1999). Tic22 und Tic20 wurden in der inneren Chloroplasten-Hüllmembran gefunden und konnten in Crosslink-Experimenten mit Präproteinen verbunden werden (Kouranov und Schnell, 1997; Kouranov *et al.*, 1998). Die Funktionen von Tic22, Tic20 und Tic40 sind allerdings noch ungeklärt.

1.2.3 Transitsequenz und deren Erkennung

Im Gegensatz zu mitochondrialen Transitsequenzen wurde bezüglich des chloroplastidären Proteinimports noch keine Konsensus-Transitsequenz entdeckt. Die Präsequenzen der bisher bekannten importierten Chloroplastenproteine unterscheiden sich sowohl in Länge (20-150 AS) als auch in Primärsequenz (van Heijne *et al.* 1989), sie weisen aber gemeinsame Eigenschaften auf.

Chloroplastidäre Präpeptide besitzen eine positive Nettoladung (Von Heijne, 1991) und sind phosphorylierbar; außerdem können die Präsequenzen in drei funktionell und strukturell unterschiedliche Abschnitte eingeteilt werden (Pilon *et al.* 1995, Rensink *et al.* 1998, 2000):

Am N-Terminus befinden sich viele ungeladene Aminosäuren, dieser Bereich ist wichtig für die Bindung an den Rezeptor der äußeren Hüllmembran. Der mittlere Abschnitt enthält viele geladene oder hydroxilierte Aminosäuren, er ist notwendig für die eigentliche Translokation. Der C-terminale Abschnitt der Präsequenz bildet voraussichtlich eine β -Faltblatt-Struktur aus, ohne diesen Bereich der Transitsequenz kann das Präpeptid nicht abgespalten werden.

Die Erkennung des Präproteins durch den Proteinimportkomplex ist noch nicht ganz verstanden. Es wird angenommen, dass eine gemeinsame Sekundärstruktur des Transitpeptids, die wahrscheinlich durch Interaktion mit der Chloroplastenmembran induziert wird, hierbei eine wichtige Rolle spielt (Bruce, 1998). Dabei ist die Lipidzusammensetzung der äußeren Hüll-

membran wichtig. Weiterhin gibt es Hinweise auf die Involvierung des gesamten Proteins beim Import in den Chloroplasten (Ko und Ko, 1992; Dabney-Smith *et al.* 1999).

1.3 Kaliumkanäle

Kaliumkanäle kommen in fast allen pro- und eukaryontischen Zellen vor. Sie spielen eine wichtige Rolle in vielen physiologischen Prozessen wie zum Beispiel der Regulation von Membranpotentialen, der Osmoregulation und der Aufnahme von Mineralien und Nährstoffen (Hille, 1992).

Trotz ihrer großen Heterogenität weisen Kaliumkanäle bestimmte gemeinsame Strukturmerkmale auf. Sie zeichnen sich durch mindestens eine Porenregion (P), die den Ionendurchtritt und die Selektivität reguliert und zwei oder mehr flankierende transmembrane Segmente (TM) aus.

Kaliumkanäle lassen sich anhand ihrer (vorhergesagten) Sekundärstruktur und der Zahl der Transmembrandurchgänge in vier Gruppen einteilen: 2TM, 4TM, 6TM und 8TM. Vermutlich ist ein 2TM-Kanal der gemeinsame Voläufer, aus dem sich die anderen Kaliumkanäle entwickelt haben (Abb. 1.2).

Die 2TM- und 6TM-Kanäle weisen eine Porenregion pro Monomer auf, der funktionelle Kanal wird dabei aus vier Untereinheiten gebildet. Zu den 2TM-Kanälen zählen die einwärts-gleichrichtenden Kanäle der Kir-Familie und zu den 6TM-Kanälen gehören beispielsweise die Kanäle der Shaker-Familie (Jan und Jan, 1997).

Zu den 4TM-Kanälen gehören die Kanäle der TWIK-Familie und zu den 8TM-Kanälen die Kanäle der TOK-Familie. Die Kanäle beider Familien enthalten zwei Porenregionen pro Untereinheit und kommen wahrscheinlich als Untereinheiten-Dimer vor. Kanäle der TWIK-Familie konnten in pflanzlichen und tierischen Zellen gefunden werden, ein Vertreter der TOK-Familie

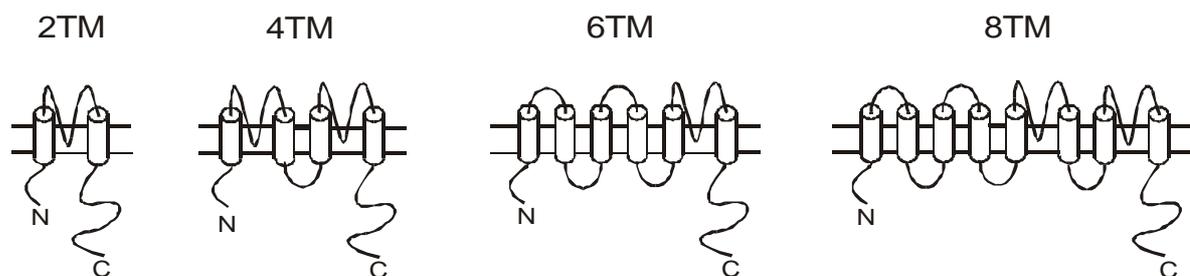


Abb. 1.2 Schematische Darstellung der verschiedenen Strukturklassen der Kaliumkanäle

konnte bisher nur in Hefe lokalisiert werden (Armstrong und Hille, 1998; Czempinski *et al.*, 1999).

Entsprechend ihrer großen Heterogenität weisen Kaliumkanäle vielfältige Regulationsmechanismen auf. Neben intrinsischen Faktoren, wie zum Beispiel die spannungsabhängige Aktivierung/Inaktivierung spielen hierbei auch die Bindung von regulatorischen Molekülen (zum Beispiel Calcium, Magnesium, Nukleotide) oder die kovalente Modifikation (z. B. durch Phosphorylierung) eine Rolle (Breitwieser, 1996)

Der bisher einzige, auf Einzelkanal-Ebene charakterisierte bakterielle Kaliumkanal ist das Protein KcsA aus *Streptomyces lividans* (Schrempf *et al.*, 1995), das zur 2TM-Familie gehört. In *E. coli* wurde ein potentieller Kaliumkanal (Kch) der 6TM-Familie entdeckt und biochemisch charakterisiert (Voges und Jap, 1998), ein Funktionsnachweis wurde aber noch nicht erbracht. In Pflanzen konnte eine ganze Reihe von Kaliumkanälen entdeckt und charakterisiert werden, die strukturelle Ähnlichkeiten zu den tierischen Kaliumkanälen, zum Beispiel des Shaker- und des TWIK-Typs, zeigen (Zimmermann und Sentenac, 1999). Ein putativer Kaliumkanal ist wahrscheinlich im Chloroplasten lokalisiert, dessen Funktion konnte aber noch nicht nachgewiesen werden (Neuhaus und Wagner, 2000).

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst eine elektrophysiologische Charakterisierung von Ionenkanälen der inneren Chloroplasten-Hüllmembran vorgenommen werden. Die bei diesen Messungen beobachteten Aktivitäten sollten durch Vergleich mit rekombinanten Proteinen zugeordnet werden, wofür Tic110 sowie ein putativer Chloroplasten-Kaliumkanal zur Verfügung standen.

Zunächst sollten der putative Chloroplasten-Kaliumkanal und vergleichend dazu ein vermuteter Kaliumkanal aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* kloniert und dann in einem geeigneten Expressionssystem (*E. coli*- bzw. Baculovirus-System) überexprimiert werden. Anschließend sollte eine elektrophysiologische und biochemische Charakterisierung Hinweise auf deren Funktion geben.

Es sollte außerdem untersucht werden, ob durch das rekombinant exprimierte Protein Tic110 eine hydrophile Pore konstituiert wird, und deren grundlegende Eigenschaften bestimmt werden. Abschließendes Ziel war zu prüfen, ob sich aus einem Vergleich der Eigenschaften von Tic110 und Kanalaktivitäten in der inneren Hüllmembran belegen läßt, welche Rolle Tic110 bei der Translokation von Proteinen über die innere Chloroplasten-Hüllmembran zukommt.

2 Material und Methoden

2.1 Materialnachweis

Bakterienstämme

Tabelle 2.1 Verwendete *E. coli*-Stämme

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp	Referenz
DH5 α	F ⁻ , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>phoA</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺), λ ⁻ <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169	Hanahan (1983)
BL21(DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	Studier <i>et al.</i> (1990)
BL21(DE3)c43	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	Miroux und Walker (1996)
DH10bac	F ⁻ , <i>mcrA</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) <i>endA1</i> , ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15, Δ <i>lacX74</i> , Δ (<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697, <i>araD139</i> , <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>nupG</i> , <i>rpsL</i> , λ - <i>/bMON14272/pMON7124</i>	Luckow <i>et al.</i> (1993)

DH5 α wurde für Klonierungen verwendet, die BL21-Stämme für heterologe Expression, wobei BL21(DE3)c43 speziell für die Expression von Membranproteinen geeignet ist. DH10bac diente der Herstellung rekombinanter Baculovirus-DNA.

Zelllinien

Sf21-Zellen stammen von der Firma Invitrogen und sind eine freundliche Gabe von Dr. Bernd Müller-Röber, MPI Golm.

DNA

Genomische *Synechocystis*-DNA und der Vektor pET 16b (Novagen) stammen aus der Labor-sammlung (Holger Lill) des Lehrstuhls für Biophysik, Universität Osnabrück. pFastbac und pFastbac Hta-c (Gibco-BRL) sind eine freundliche Spende von Dr. Bernd Müller-Röber, MPI

Golm.

Oligonukleotide

Die folgenden Oligonucleotide für PCR oder Sequenzierungen wurden von der Firma MWG-Biotech synthetisiert:

6x His-Tag Kasette

HL 326 (sense) TAT GAG AGG ATC GCA TCA TCA TCA TCA TCA TGG

HL 327 (antisense) TAC CAT GAT GAT GAT GAT GAT GCG ATC CTC TCA

PCR-Primer für sll0993

HL 375 CAT ATG GGA TTG GGA TCA TCA AGT CAG GAA AAC C

HL 376 GGA TCC TTA TAC TAA CGA TGG TTT TTT TTG GGC

Enzyme und Chemikalien wurden von den aufgeführten Firmen bezogen:

Vent DNA-Polymerase und Thermopol-puffer von NEB

Alkalische Phosphatase (CIAP), T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK), Desoxy-Ribonucleotide sowie Restriktionsenzyme und zugehörige Puffer von den Firmen MBI Fermentas, NEB, Boehringer-Mannheim bzw. Gibco-BRL

Low Melting Agarose für präparative Gele und peqGold Agarose von peqLab (Erlangen)

Antibiotika von Sigma-Aldrich

Cellfectin von Gibco-BRL

Azolectin (Typ IV S) von Sigma

Mega9 wurde von OxyL-Chemie (Bobingen) bezogen, alle anderen Detergentien stammten von Calbiochem.

Alle weiteren verwendeten Chemikalien wurden in p.A.-Qualität von den Firmen Sigma, Riedel De Haen, Baker, Biomol, Fluka und Serva bezogen.

Sonstige Materialien

Materialien aus Kunststoff (Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen) wurden von den Firmen Eppendorf, Sarstedt und Roth bezogen. Sterile Plastikflaschen für die Zellkultur stammten von der Firma Renner, sterile Plastikschrälchen von der Firma Nunc.

Spezielle Materialien, die bei einigen Experimenten Verwendung fanden, sind in den entsprechenden Abschnitten bei der Darstellung der Methoden aufgeführt.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Kultur von Sf21 Insektenzellen

Die Zellen wuchsen in 50, 75 und 250 ml großen Zellkulturflaschen als Monolayer. Sie wurden in Insect-Express-Medium (BioWhittaker, Belgien), supplementiert mit 2 % fötalem Rinderse- rum (Gibco-BRL, getestet für Insektenzellen), bei 27 °C gehalten.

Zur Subkultivierung wurden die Zellen bei einer Konfluenz von ca. 95 % durch Schlagen der Zellkulturflasche an den Handballen vom Untergrund abgelöst. Je nach gewünschter Zelldichte wurde $\frac{1}{2}$ bis $\frac{1}{10}$ der Zellsuspension in eine Kulturflasche mit frischem Medium überimpft.

2.2.2 Kryokonservierung von Insektenzellen

Die Zellen wurden bei ca. 95 % Konfluenz von den Kulturschalen abgelöst und 5 min bei 500 g pelletiert. Das Zellpellet wurde in Kryo-Medium (10 % DMSO, 90 % FCS, sterilfiltriert) auf- genommen und in Kryo-Röhrchen (Nunc) gefüllt. Die Röhrchen wurden zunächst 1 h bei –20 °C, dann über Nacht bei –80 °C und schließlich bis zum Auftauen in flüssigem Stickstoff gela- gert.

Das Auftauen der gefrorenen Zellen geschah zügig bei 37 °C in einem Wasserbad. Anschlie- ßend wurden jeweils 0.5 bis 1 ml der aufgetauten Zellen in eine 50 ml Kulturschale gebracht und 4 ml Kulturmedium dazugegeben. Nach Anheftung der Zellen (Dauer ca. 30 min) wurde das DMSO-haltige Medium gegen frisches Kulturmedium ausgetauscht. Der Mediumtausch wurde nach 24 h wiederholt.

2.3 Molekularbiologische und biochemische Methoden

2.3.1 Medien zur Anzucht von Bakterien

LB-Medium und LB-Agar wurden von der Firma Gibco-BRL in Pulverform bezogen. Die Medien wurden nach Herstellerangaben in Reinstwasser gelöst und autoklaviert (121 °C, 20

min). Nach dem Abkühlen wurden gegebenenfalls Antibiotika aus Stocklösungen (sterilfiltriert) zugesetzt.

2.3.2 Bakterienanzucht und Konservierung

Bakterienkulturen wurden aus Einzelkolonien von LB-Agarplatten oder Kryokulturen in LB-Medium angezogen. Die Anzucht fand in Reagenzgläsern auf einem Drehschüttler oder in Erlenmeyerkolben auf einem Schütteltisch bei 37 °C statt.

Zur Kryokonservierung von Bakterienkulturen wurde zu 500 µl einer Übernachtskultur 100 µl Glycerin gegeben, die Mischung in Flüssig-Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.3.3 Herstellung kompetenter Zellen

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden nach einer Methode von Hanahan (1983) hergestellt. Dazu wurden 200 ml LB-Medium 1:100 mit einer 5 ml-Übernachtskultur angeimpft, bis zu einer OD (600 nm) von 0,4-0,5 wachsen gelassen und 10 min bei 5000 g und 4 °C pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 50 ml TFB 1 (30 mM Kaliumacetat/Essigsäure pH 5,8, 50 mM MnCl₂, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerin) resuspendiert, 10 min auf Eis gekühlt und nochmals bei 5000 g und 4 °C zentrifugiert. Dann wurden die Zellen in 8 ml TFB 2 (10 mM MOPS pH 7,0, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15 % (v/v) Glycerin) resuspendiert, in 100 µl-Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

TFB1 und TFB2 wurden nach der Herstellung sterilfiltriert (0,22 µm-Filter).

2.3.4 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

Pro Ansatz wurden 50 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut. Zu den Zellen wurden ca. 50 ng Plasmid-DNA gegeben, gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation bei 37 °C für 20 s mit anschließender Abkühlung auf Eis für 2 min.

Zu den Zellen wurden dann 900 µl LB-Medium gegeben, die Mischung für 1 h bei 37 °C inkubiert und schließlich auf Selektionsplatten (LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikazusatz) ausgestrichen.

Wurden pUC18 -Derivate transformiert, bestand die Möglichkeit, mit Hilfe der Lac-Selektionsmethode (α -Komplementation, Sambrook *et al.*, 1990) Klone zu detektieren, in deren Plasmide DNA-Fragmente inseriert wurden. Für diese Nachweisreaktion enthielten die Selektionsplatten

zusätzlich 8 mg/ml Bluo-gal und 10 mg/ml IPTG.

2.3.5 Minipräparation von Plasmid-DNA

Die Minipräparation von Plasmid-DNA erfolgte mit dem QIAprep Spin Plasmid Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Bei dieser Methode werden die Bakterienzellen in Anlehnung an die Methode von Birnboim und Doly (1979) lysiert und das Gemisch auf eine Säule mit einer Silica-Matrix gegeben, an der die DNA unter Hochsalzbedingungen bindet. Nach zwei Waschschrritten kann dann die DNA mit Wasser wieder von der Säule eluiert werden.

2.3.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (Saiki *et al.*, 1988), wurde in einem Volumen von 50 μ l in einem Personal-Cycler von Biometra durchgeführt. Sie enthielt die folgenden Komponenten:

5 μ l 10x Thermopol-PCR-Puffer (incl. $MgCl_2$)

4 μ l dNTP-Mix (5 mM je dNTP)

je 50 pmol der beiden Primer

Template-DNA

1-5 u *vent*-Polymerase.

Die Reaktion lief nach folgendem Protokoll ab:

*5 min 95 °C anfängliche Denaturierung

*95 °C 45 s, AT 60 s, 72 °C 60 s; 35 Zyklen

*72 °C 10 min, 4 °C

Hierbei steht AT für die Annealing-Temperatur, diese hing von den jeweils benutzten Primern ab.

2.3.7 DNA-Präzipitation

DNA-Präzipitation (zur Verringerung des Volumens oder zur Entsalzung von DNA-Proben) wurde folgendermaßen durchgeführt:.

Nach Zugabe von 1/10 des Volumens von 3 M Natriumacetat (pH 4.8) und dreifachem Volu-

men Ethanol p. A. (100 %) wurde die DNA 15 min auf Eis gefällt und anschließend durch Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge 10 min bei 14000 g und 4 °C sedimentiert. Zur Entfernung von Salzresten wurde der Niederschlag mit 70 %igem Ethanol gewaschen, 5 min wie oben zentrifugiert und getrocknet. Danach wurde die DNA in H₂O oder Puffer EB (10 mM Tris/HCl, pH 8.5) aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

2.3.8 Agarose Gelelektrophorese

Die Agarose Gelelektrophorese (Sambrook *et al*, 1989) fand in horizontalen Gelkammern von Gibco-BRL bzw. von Amersham-Pharmacia statt. Für analytische Gele wurde je nach Fragmentgröße eine Agarosekonzentration von 0.8-2 % in 1xTBE (90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2.5 mM EDTA pH 8.0) verwendet. Präparative Gele enthielten 0.8 % Low-Melt-Agarose in 1xTBE. Als Gellaufpuffer diente ebenfalls 1xTBE, der Probenpuffer bestand aus 20 mM Tris/Borat pH 8.0, 10 % (v/v) Glycerin, 0.04 % (w/v) SDS, 0.02 % (w/v) Bromphenolblau. Die Gele liefen bei 6-8 V/cm. Um die DNA unter UV-Licht (Wellenlänge 312 nm) sichtbar zu machen, enthielt das Gel Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0.4 µg/ml.

Als DNA-Molekulargewichtsstandard, der auf die Gele mit aufgetragen wurde, diente mit *Pst*I in Fragmente definierter Größe geschnittene DNA des λ-Phagen von MBI Fermentas.

2.3.9 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die DNA-Fragmente wurden nach ihrer elektrophoretischen Auftrennung unter UV-Licht aus dem Gel herausgeschnitten und mit Hilfe des "QIAEX II Gel Extraction kit" oder des "QIAquick Gel Extraction kit" nach Angaben des Herstellers (beide von Qiagen) eluiert.

2.3.10 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Die Konzentrationsbestimmung geschah vereinfacht mittels Gelelektrophorese. Dazu wurde ein Aliquot der Probe unbekannter Konzentration mit gleichen Aliquots von DNA-Proben bekannter Konzentration parallel auf ein Agarose-Gel (2.3.8) aufgetragen und die Konzentration durch Vergleich der entsprechenden Leuchtintensitäten unter UV-Bestrahlung abgeschätzt.

2.3.11 Klonierungen

2.3.11.1 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Die restriktionsenzymatische Spaltung von Plasmid-DNA geschah mit 2-10 u des entsprechenden Enzyms nach Angaben des Herstellers in den mitgelieferten Puffern. Das Reaktionsvolumen betrug 20-50 μ l. Wenn nötig, wurde das Restriktionsenzym nach der Reaktion deaktiviert. Dieses geschah entweder durch Erhitzen (65 °C, 10 min) oder durch Addition des gleichen Volumens einer 1:1 (v/v) Phenol-Chloroform-Lösung mit anschließender Fällung der oberen (DNA-haltigen) Phase nach (2.3.7).

2.3.11.2 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Vektoren wurden nach der restriktionsenzymatischen Spaltung (2.3.11.1) mit Alkalischer Phosphatase aus Kälbermagen (CIAP) dephosphoryliert, um unerwünschte Religationen zu verhindern. Die Reaktion geschah in einem Volumen von 20-50 μ l mit dem mitgelieferten Puffer nach Angaben des Herstellers.

2.3.11.3 Phosphorylierung von DNA-Fragmenten

PCR-Amplifikate und nicht phosphorylierte Oligonukleotide mußten vor der Ligation am 5'-Ende phosphoryliert werden. Hierzu wurde T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK) in dem dazugehörigen Puffer (mit zusätzlich 10 μ M ATP) verwendet. Die Reaktion lief bei 37 °C in einem Volumen von 20-50 μ l ab. Anschließend wurde sie durch Inkubation bei 65 °C für 20 min gestoppt.

2.3.11.4 Auffüllen von überhängenden 5' Enden

Für sogenannte ‚Blunt-end‘-Ligationen war es notwendig, Plasmid-DNA mit 5'-Überhängen aufzufüllen, um so ‚glatte Enden‘ zu erzeugen. Dieses wurde mit 10 U Klenow-Fragment im dazugehörigen Puffer, supplementiert mit 5 mM dNTPs nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.3.11.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Um DNA-Fragmente in Plasmidvektoren einzusetzen, wurde die Methode der ‚In-Gel-Ligation‘ verwendet. Hierbei wurde die DNA auf einem präparativen Agarosegel aufgetrennt und

das gewünschte Stück aus dem Gel ausgeschnitten. Das Gelstück wurde bei 65 °C geschmolzen und mit der zwei- bis dreifachen Menge Wasser versetzt (DNA-Konzentration minimal 2 ng/μl). Zu einem Aliquot dieser Suspension wurden anschließend Vektor-DNA im molaren Verhältnis Vektor/Insert von 1:3 (auf 50-100 ng DNA insgesamt), T4-DNA-Ligasepuffer (10fach) und 5 U T4-DNA-Ligase gegeben (Endvolumen 150-200 μl).

Der Ansatz wurde dann mindestens 3 h bei 16 °C inkubiert, dann bei 65 °C für 10 min aufgeschmolzen und anschließend transformiert (2.3.4).

2.3.11.6 Insertion von Oligonukleotidkassetten

Die einzelsträngigen komplementären Oligonukleotide wurden zuerst auf eine Endkonzentration von 2 pmol/μl in H₂O verdünnt, auf 100 °C erhitzt und dann bei Raumtemperatur abgekühlt, um die Anlagerung der komplementären Bereiche zu gewährleisten. Anschließend wurden die überhängenden Enden phosphoryliert (2.3.11.3) und die Oligonukleotidkassetten in Plasmid-Vektoren durch Ligation inseriert.

Hierzu wurden 2 pmol der Oligonucleotide, 50 ng Plasmidvektor (geschnitten und dephosphoryliert) und 5 u T4-DNA-Ligase in T4-DNA-Ligasepuffer für mindestens 4 Stunden bei 16 °C inkubiert. Das Reaktionsvolumen betrug 20 μl. Anschließend erfolgte die Transformation nach (2.3.4).

2.3.11.7 Klonierung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden zuerst elektrophoretisch auf einem Agarosegel aufgetrennt und dann aus dem Gel extrahiert (2.3.9). Die Fragmente wurden dann mittels des Sure-Clone-Ligation-Kit (Amersham-Pharmacia) in den mitgelieferten Vektor pUC-18 (*Sma I* geschnitten) ligiert.

Nach Transformation (2.3.4) konnten mittels Blau-Weiss-Selektion positive Klone identifiziert und vermehrt werden.

2.3.12 Sequenzierungen

Sequenzierungen der klonierten Vektoren wurden von der Firma MWG-Biotech durchgeführt.

2.3.13 Heterologe Expression von Proteinen

2.3.13.1 Heterologe Expression in *E. coli* mittels des pET-Systems (Novagen)

Die heterologe Expression von Proteinen mit dem pET-System erfolgte im wesentlichen nach den Angaben des Herstellers. Verwendet wurde der Expressionsvektor pET-16b, welcher zur Fusion von 10 Histidinen mit dem Zielprotein dient. Die Zielsequenz wurde so in den Vektor eingesetzt, dass sich die Histidine am N-Terminus des Proteins befanden. Die Expression fand in *E. coli*-Stamm BL21 und BL21 (C43) bei 21-37 °C für 2-16 h statt.

2.3.13.2 Heterologe Expression von Proteinen in Insektenzellen / Baculovirus-System

Baculoviren sind Viren, die ausschließlich Insektenzellen befallen. Sie schleusen ihr aus DNA bestehendes Genom in die Wirtszelle ein und bedienen sich zu ihrer Vermehrung des Proteinbiosyntheseapparates des Wirtes. Die Wirtszelle lysiert nach Virusvermehrung und setzt dann neue Viren frei.

Der bekannteste Baculovirus ist der *Autographica californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV). Er besitzt eine Genomgröße von 130 kb und bildet eine kristalline Proteinmatrix aus Polyhedrin, in die die Viren eingehüllt werden. Das Polyhedrin-Gen steht unter der Kontrolle eines sehr starken Promotors und ist für die eigentliche Virusvermehrung nicht essentiell. Deshalb wird zur heterologen Expression mittels Baculoviren häufig das Polyhedrin-Gen gegen das zu exprimierende Gen ausgetauscht.

Aufgrund des großen Virus-Genoms ist eine direkte Klonierung von Fremd-DNA in den Virus unpraktikabel. Das Zielgen wird deshalb zuerst in einen Transfervektor geringer Größe kloniert und dann auf den Virus übertragen.

Beim hier verwendeten Expressionssystem von Gibco-BRL wird die Ziel-DNA in einen Vektor der pFastbac-Familie (pFastbac1, pFastbacHTa-c) kloniert. Der Vektor trägt flankierend zu Polyhedrin-Promotor und Polylinker Konsensussequenzen für das bakterielle Transposon Tn7. Das AcNPV-Genom liegt abgeändert in Form eines Shuttle-Vektors (Bacmid) in einem speziellen *E. coli*-Stamm (DH10Bac) vor. Es trägt die essentiellen Virusgene und darüberhinaus Resistenzmarker, mini-F-Replikon, eine LacZ-Kassette und Tn7-Attachment-Sites. Die Tn7 Transpositionsfunktionen werden durch ein Helferplasmid, welches sich ebenfalls in DH10Bac befindet, zur Verfügung gestellt.

Wird nun der Transfervektor mit subkloniertem Zielgen in DH10Bac transformiert, so werden Zielgen samt Polyhedrinpromotor durch gerichtete Transposition in das Bacmid eingesetzt.

Durch Blau/Weiss-Selektion können rekombinante Bacmid-Kolonien identifiziert werden. Nach Präparation der Bacmid-DNA und anschließender Transfektion in Insektenzellen können nach ca. 4 Tagen rekombinante Baculoviren geerntet werden, die zur Infektion benutzt werden können.

Herstellung und Vermehrung rekombinanter Baculoviren

Nach Klonierung des Zielgenes in pFastbac erfolgte Transformation in DH10Bac und Transfektion in Sf21 Insektenzellen nach dem Herstellerprotokoll. Die DH10Bac-Zellen wurden nach (2.3.3) kompetent gemacht.

Für die Transfektion wurden Zellen mit einer Konfluenz von 50 % in einer 50 ml-Zellkulturflasche verwendet. Der Transfektionsüberstand wurde nach 4 Tagen abgenommen und Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 500 g für 5 min pelletiert. Der so gewonnene, Viren-haltige Überstand wurde bei 4 °C gelagert und konnte für die Infektion von Insektenzellen benutzt werden.

Zur ersten Infektion wurden zu 80 % konfluente Zellen in einer 50 ml-Kulturflasche verwendet. Zuerst wurde das Medium abgenommen und 1 ml des Transfektionsüberstands zugegeben. Die Schale wurde dann 1 h bei RT langsam geschüttelt, danach 3 ml Zellkulturmedium dazu gegeben und im Brutschrank inkubiert. Nach 3 Tagen wurde das Medium abgenommen, Zellen durch Zentrifugation für 5 min bei 500 g pelletiert und der Überstand bei 4 °C gelagert.

Expression der Proteine

Hierzu wurden Insektenzellen bis zu einer Konfluenz von 80 % angezogen und dann, je nach Kulturflaschengröße, mit 0.1 bis 2 ml Virus-haltigem Zellkulturmedium versetzt. Die Virusmenge wurde so gewählt, dass der größte Teil der Zellen infiziert wurde. Nach zwei- bis dreitägiger Inkubation wurden die Zellen vom Flaschenboden abgeklopft, 5 min bei 500 g abzentrifugiert und der Überstand bei 4 °C gelagert. Das Zellpellet wurde in 4-15 ml Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl) resuspendiert, erneut abzentrifugiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Zur Abschätzung des Virustiters einer Stocklösung wurden 50 ml-Kulturflaschen mit verdünntem Virus-Stock infiziert (Verdünnungsstufen 1:1 bis 1:1000), je ein Aliquot (ca. 1/10) der Zellen nach der Ernte (2-3 Tage p.i.) in Probenpuffer aufgenommen und die darin enthaltenen Proteine mittels SDS-PAGE (2.3.16) aufgetrennt. Durch Vergleich der Mengen der überexprimierten Proteine in den einzelnen Spuren konnte die Verdünnungsstufe ermittelt werden, bei der noch maximale Proteinexpression (entsprechend einer optimalen Infektion der Zellen)

erfolgte.

2.3.14 Solubilisierung von Membranproteinen aus Insektenzellen

Das Zellpellet wurde nach dem Auftauen zuerst in Puffer (50 mM Tris-HCL pH 8, 300 mM NaCl) resuspendiert, dabei wurden pro 10^7 Zellen 100 μ l Puffer verwendet. Die Zellen wurden mit einem Branson-Sonifier (50 % Duty-Cycle, 2-4 Pulse) zerstört und alle Membranen durch Zentrifugation bei 100000 g für 45 min pelletiert.

Das Membranpellet wurde dann in Solubilisierungspuffer aufgenommen (Puffermenge wie oben) und unter Rühren für 30 min gelöst. Der Solubilisierungspuffer enthielt 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pH 8, 300 mM KCl, den Proteasehemmer Boehringer Complete ohne EDTA (Boehringer Mannheim) in der vom Hersteller vorgeschlagenen Konzentration und als Detergens entweder 1 % TritonX-100 oder 10 mM Dodecylmaltosid. Nach der Solubilisierung wurden die unlöslichen Bestandteile bei 100000 g für 45 min pelletiert und der Überstand weiterverarbeitet.

2.3.15 Reinigung von Membranproteinen mittels Nickel-chelatierender Agarose

Proteine mit His-Tag wurden nach (2.3.14) solubilisiert und mittels Affinitätschromatographie im Säulenverfahren gereinigt. Als Säulenmaterial dienten, je nach zu erwartender Proteinmenge, 100-200 μ l Ni-NTA Superflow (Qiagen).

Alle zur Reinigung verwendeten Puffer enthielten das bei der Solubilisierung verwendete Detergens in entsprechender Menge.

Die Säule wurde zuerst mit dem fünffachen Säulenvolumen Solubilisierungspuffer gespült und dann die Proteinlösung aufgetragen. Der Durchlauf wurde aufgefangen und erneut aufgetragen. Anschließend erfolgten zwei Waschschriffe mit jeweils fünf Säulenvolumina Waschpuffer ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pH 7, 300 mM KCl) und ein weiterer mit fünf Säulenvolumina Waschpuffer + 50 mM Imidazol.

Das gebundene Protein wurde dann in ein bis zwei Schritten mit einem Säulenvolumen Elutionspuffer ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pH 7, 300 mM KCl, 300 mM Imidazol) eluiert.

2.3.16 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Verwendet wurde ein vertikales Gelsystem der Firma Bio-Rad. Für zu untersuchende Proteine mit einem Molekulargewicht größer als 10 kDa wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE nach

Laemmli (1970) angewendet. 10- bis 15 %ige Polyacrylamid-Trenngele wurden dabei nach der Polymerisation mit 5 %igen Sammelgelen überschichtet.

Die Gele enthielten entsprechende Mengen einer 30 %-Acrylamid-Stocklösung (Bio-Rad, München) mit einem Acrylamid/Bisacrylamidverhältnis von 37.5. Die Trenngele enthielten weiterhin 375 mM Tris/HCl pH 8.8, 0.1 % (w/v) SDS, 0.03 % (v/v) TEMED 0.04 % (w/v) APS; die Sammelgele bestanden zusätzlich aus 125 mM Tris/HCl pH 6.8, 0.1 % (w/v) SDS, 0.08 % (v/v) TEMED und 0.1 % (w/v) APS.

Durchführung

Die Proteine wurden in Probenpuffer gelöst oder, bei gelösten Proteinen, mit der gleichen Menge 2-fach-Probenpuffer gemischt (Pufferkonzentrationen bei Probenauftrag: 100 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 12.5 % (v/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 2 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 0.01 % (w/v) Bromphenolblau).

Als Elektrodenpuffer wurde 25 mM Tris, 192 mM Glycin 0.1 % (w/v) SDS verwendet; die Gele liefen bei 100 V, bis die Proteine vollständig vom Sammel- ins Trenngel gewandert waren und dann bei 200-250 V.

Gelfärbung

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine im Gel wurden zunächst 15 min in Entfärbelösung (25 % (v/v) Methanol, 5 % (v/v) Essigsäure) fixiert, dann mindestens 15 min in Färbelösung (50 % (v/v) Methanol, 5 % (v/v) Essigsäure, 0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250 (Serva Blau R 250)) inkubiert und schließlich 2 h in Entfärbelösung entfärbt.

2.3.17 Konzentrationsbestimmung von Protein-Lösungen

Die Konzentrationsbestimmung wurde mittels SDS-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde ein Aliquot der Probe unbekannter Konzentration mit gleichen Aliquots von Protein-Proben bekannter Konzentration (meistens der Marker) parallel auf ein Gel (2.3.16) aufgetragen und die Konzentration durch Vergleich der gefärbten Proteinbanden ermittelt.

2.3.18 Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Die in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden in einer Semidry-Elektrophoresekammer (SEMI-PHOR TE 70 von Hoefer Scientific Instruments, USA) auf eine Nitro-

zellulosemembran mit einer Porengröße von 0.45 μm (Schleicher und Schuell) übertragen. Abhängig von den Molekulargewichten der zu detektierenden Proteine erfolgte der Transfer 15-45 min bei einer konstanten Stromstärke von 0.8 mA/cm² zwischen zwei Lagen Filterpapier. Das Filterpapier und die Nitrozellulosemembran wurden vorher in Transferpuffer (10 mM CAPS pH 11) getränkt.

Die Effektivität des Transfers wurde durch eine reversible Proteinfärbung (0.2 %ige Ponceau S-Lösung in 3 % TCA von Serva) auf der Nitrozellulosemembran überprüft.

2.3.19 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Nach dem Elektrotransfer wurde die Nitrocellulosemembran zweimal für 10 min in TBS (20 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl) gewaschen. Danach erfolgte das Blockieren von freien, unspezifischen Bindestellen auf der Membran in 3 % (w/v) BSA (gelöst in TBS) 1 h lang bei RT. Zur Entfernung der BSA-Lösung schlossen sich zwei Waschschrte in TBSTT (TBS mit 0.05 % Tween und 0.2 % Triton) und einer in TBS für je 10 min an. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (Verdünnung 1:10000 bis 1:30000 in TBS mit 3 % BSA) über Nacht bei Raumtemperatur. Um Proteine mit 6x-His- oder 10x-His-Tag nachzuweisen, wurde der Penta-His-Antikörper von Qiagen verwendet.

Nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper wurde zweimal je 10 min mit TBSTT und 10 min mit TBS gewaschen, bevor die Membran mit dem zweiten Antikörper (Anti-mouse Ig HRP-conjugate, Amersham-Pharmacia), 1:5000 verdünnt in TBS mit 10 % (w/v) Magermilchpulver, für eine Stunde inkubiert wurde. Daran schlossen sich vier Waschschrte (je 10 min mit TBSTT) an.

Die Detektion der mit den Antikörpern markierten Proteine geschah anschließend mit dem "ECL Western blotting system" (Amersham-Pharmacia) nach Angaben des Herstellers. Hierbei wird durch die mit dem zweiten Antikörper konjugierte Peroxidase eine Lumineszenz-Reaktion katalysiert, welche durch Exposition eines Röntgenfilms für 10-30 min sichtbar gemacht werden kann.

2.3.20 Reinigung von Lipid und Herstellung von Liposomen

Das für Rekonstitutionen oder Fusionen mit nativen Membranen verwendete Azolectin wurde vor der Verwendung folgendermaßen aufbereitet:

Das Lipid wurde zuerst in einer Konzentration von 15 mg/ml in Methanol/Chloroform (2:1 v/v)

gelöst. Danach wurden ca. 1/3 des Volumens an 1 M KCl, 0.2 M H₃PO₄ zugegeben. Nach der Phasentrennung wurde die untere Phase abgenommen und mit KOH auf pH 8 titriert. Jetzt wurde das sechsfache Volumen der obigen Methanol/Chloroform-Lösung zugegeben und die oben beschriebene Zugabe von KCl/H₃PO₄ mit anschließender Phasentrennung und Titration wiederholt.

Die Lipidlösung wurde dann abgedampft, das feste Lipid in Puffer (10 mM Mops/Tris pH 7) resuspendiert (Endkonzentration 50 mg/ml) und bei -80 °C gelagert.

2.3.21 Rekonstitutionen von Membranproteinen

2.3.21.1 Rekonstitutionen mit TritonX-100

Die nach (2.3.15) gereinigten, in TritonX-100-haltigem Elutionspuffer befindlichen Proteine wurden mit in TritonX-100 vorinkubierten, gereinigten Azolektin-Liposomen (2.3.20) gemischt. Dabei wurde das Detergens/Lipid-Verhältnis so gewählt, dass die Liposomen nicht vollständig aufgelöst wurden, da nur so optimale Rekonstitutionsraten zu erreichen sind (Rigaud *et al.* 1995).

Als Puffer wurde 10 mM Mops/Tris pH 7 verwendet, das Protein/Lipid-Verhältnis lag bei 1:100 bis 1:200. Um das im Elutionspuffer enthaltende Imidazol zu entfernen, wurde zuerst gegen das 1000-fache Volumen 10 mM Mops/Tris pH 7 für 1 h dialysiert (Dialyseschläuche von Spectrum Laboratories, Ausschlussgrenze: 3500 Da). Wegen der sehr geringen cmc des Detergenses (0.29 mM) wurde dann die eigentliche Rekonstitution durch Detergens-Adsorption an Bio-Beads (Bio-Rad) durchgeführt. Hierzu wurde pro mg Detergens 5 mg Beads zugegeben und 3-4 h unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert.

2.3.21.2 Rekonstitution mit Mega-9

Membranproteine, die in Harnstoff-haltigem Puffer vorlagen, wurden unter Verwendung des Detergenses Mega-9 rekonstituiert. Dazu wurde die Proteinlösung mit in Mega-9 vollständig aufgelösten Azolektin-Liposomen (2.3.20) gemischt. Die Detergens-Endkonzentration betrug dabei 80 mM, das Protein/Lipid-Verhältnis lag bei 1:100 bis 1:200.

Anschließend wurde die Mischung zuerst 1 h bei 20 °C und dann über Nacht bei 4 °C gegen das 10000-fache Volumen Puffer (10 mM Mops/Tris pH 7) dialysiert, was zur Bildung von Proteoliposomen führte.

2.3.22 Fusion von nativen Membranen mit Lipid

Die in dieser Arbeit für Bilayer-Messungen verwendete innere Chloroplasten-Hüllmembran (zur Verfügung gestellt von der AG Prof. Soll, Universität Kiel) hatte eine Proteinkonzentration von 2 mg/ml und wurde folgendermaßen mit gereinigtem Lipid (2.3.20) fusioniert:

30 μ l der Hüllmembran-Suspension wurden mit 60 μ l Liposomen und 90 μ l Puffer (10 mM Mops/Tris pH 7, 2 mM CaCl_2 , 5 mM DTT) gemischt, für 15 s im Ultraschallbad beschallt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Mischung wurde wieder aufgetaut, weitere 90 μ l Puffer zugegeben und das Frier/Tauen wiederholt. Anschließend wurden die Proteoliposomen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.4 Elektrophysiologie

2.4.1 Elektrophysiologische Grundlagen

Sowohl die Patch-Clamp- als auch die Bilayer-Technik erlauben die direkte Messung der elektrischen Eigenschaften von biologischen Membranen. Die während dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurden unter Voltage-Clamp-Bedingungen durchgeführt, ein entsprechendes Ersatzschaltbild der Messanordnung zeigt Abb. 2.1

Hierbei wird über die Membran eine konstante Spannung angelegt und der fließende Strom gemessen. Die Zell- bzw. die Bilayer-Membran können dabei vereinfacht als Parallelschaltung einer Kapazität (Membrankapazität) mit einem Widerstand (reziproker Leitwert des Ionenkanals und Leckleitwert der Membran) angesehen werden.

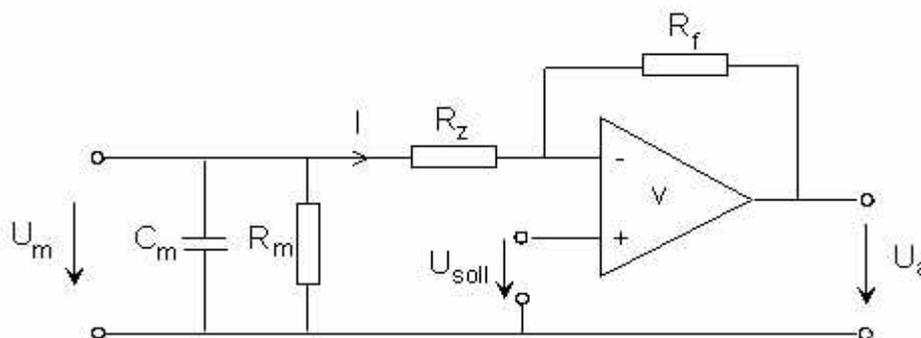


Abb. 2.1 Vereinfachtes Ersatzschaltbild der Messanordnung im Voltage-Clamp-Modus. U_m : Membranpotential, C_m : Membrankapazität, R_m : Reziproker Leitwert, R_z : Zuleitwiderstand, R_f : Rückkopplungswiderstand, V : Operationsverstärker, U_{soll} : Sollwert der Membranspannung, U_a : Ausgangsspannung. Diese Schaltung (als invertierender Operationsverstärker geschaltet) hält das Membranpotential konstant und gibt eine dem Strom I proportionale Spannung aus.

2.4.1.1 Datenerfassung

Die gemessenen Ströme wurden mittels eines Analog/Digital-Wandlers digitalisiert (Digidata1200, Axon Instruments) und mit Hilfe des Programms Axoscope (Axon Instruments) direkt auf die Festplatte eines Computers übertragen. Spannungsrampen (2.4.4.6) und Spannungs-Sprungprotokolle (2.4.4.7) wurden mit einem selbstgeschriebenen Programm (programmiert unter Verwendung der graphischen Programmierumgebung LabView, National Instruments) aufgezeichnet.

2.4.2 Planare Bilayer

Der planare Bilayer ist eine künstlich erzeugte Lipiddoppelschicht, die zwei mit Elektrolytlösungen gefüllte Kammern trennt. In jeder Kammer befindet sich eine Elektrode, die mit dem Messverstärker verbunden ist. Werden nun Kanalproteine in diesen Bilayer inkorporiert, können sie elektrophysiologisch charakterisiert werden.

2.4.2.1 Aufbau des Messstandes

Der gesamte Versuchsaufbau ist durch einen Faraday-Käfig gegen elektrische Streufelder geschützt. Innerhalb dieses Käfigs ist die Messapparatur schwingungsgedämpft auf einer massiven Grundplatte aufgebaut, die auf luftgefüllten Dämpfungselementen ruht (Luigs & Neumann). Auf diese Weise ist eine weitgehende mechanische Entkopplung von mechanischen Schwingungen, wie zum Beispiel Trittschall, sichergestellt.

Messkammer und Perfusion

Die eigentliche Messkammer (Abb. 2.2) besteht aus zwei Halbkammern aus Teflon, die jeweils ein Volumen von 3 ml Elektrolytlösung aufnehmen können. Die Aussenseiten der Halbkammern werden durch Plexiglasscheiben abgeschlossen, die mittels Parafilm (American National Can™) und je eines Teflon-Klemmrings gegen das Austreten von Flüssigkeit abgedichtet sind. Zwischen den beiden Kammern befindet sich eine 50 µm dicke Teflonfolie (Dielectric Corporation). Diese wird mit einer Nadel mittig perforiert und das Loch mittels einer Funkenstrecke aufgeweitet und abgerundet. Die Dichtigkeit zwischen den Halbkammern und der Folie wird durch Silikonfett hergestellt.

Der gesamte Aufbau wird in einem Edelstahlrohr festgeklemmt. Sowohl im Edelstahlrohr als

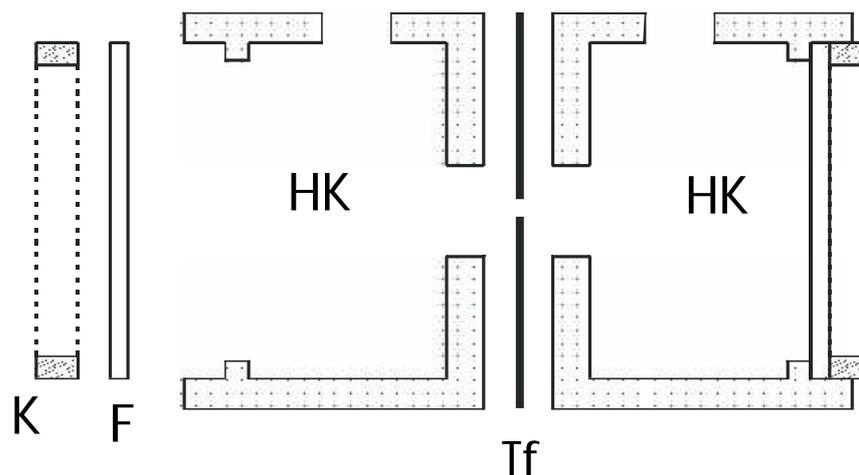


Abb. 2.2 Querschnitt durch die Bilayer-Messkammer. HK: Halbkammer, F: Fenster, K: Klemmring, Tf:: Teflonfolie. Nach Hinnah (1999), verändert.

auch in den Halbkammern befinden sich Öffnungen für die Elektroden und den Zugang zum Austausch der Messelektrolyten. Unterhalb der Messkammer ist ein Magnetrührer angebracht, welcher es ermöglicht, die Messlösungen in den Halbkammern mittels kleiner Magnetrührstäbchen zu durchmischen

Zur optischen Kontrolle kann das Loch in der Teflonfolie bzw. der "Bilayer" durch ein Binokular (MHS-10) in 100-facher Vergrößerung betrachtet werden

Als Perfusionsapparatur dienen zwei 50 ml Kunststoffspritzen, die jeweils über Silikonschläuche mit zwei Glasröhrchen verbunden sind, welche in die Messkammer getaucht werden können. Eine der Spritzen dient der Zufuhr von neuer Messlösung, die andere zum gleichzeitigen Absaugen der alten Lösung.

Elektrische Komponenten

Der elektrische Kontakt zwischen dem Messverstärker (s.u.) bzw. der Gerätemasse und den Messpuffern geschieht über Silberelektroden, die elektrolytisch mit einer Silberchlorid-Schicht versehen werden. Die Elektroden sitzen in Glaskapillaren, in denen sich mit 1.5 % Agarose verdickte KCl-Lösung (2M) befindet. Die Elektrode der *cis*-Kammer wurde auf Massepotential gelegt und die der *trans*-Kammer mit dem Eingang des Messverstärkers verbunden.

Zur Strom-Spannungswandlung und Verstärkung der Messsignale kam das Gerät Gene Clamp 500 (Axon Instruments) mit einem dazugehörigen Vorverstärker (Messverstärker) zum Einsatz. Der verwendete Messverstärker hat eine Verstärkung von 100 mV/pA und ist so modifiziert, dass der Eingang gegen Masse kurzgeschlossen werden kann (Elektronikwerkstatt,

FB4 Universität Osnabrück). Dies ist notwendig, da ansonsten Spannungsspitzen, die bei Manipulationen an bzw. in der Messkammer (Perfusion, Zugabe von Substanzen) auftreten, zur Zerstörung des 'Bilayers' führen.

2.4.2.2 Lösungen und Puffer

Lipidlösung

Die für die Bilayer-Messungen verwendete Lipid-Lösung wurde aus einer bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Stocklösung von 100 mg/ml Azolektin in einem Gemisch aus Chloroform und Methanol (1:1) hergestellt.

Dazu wurde das Lösungsmittel mittels Vakuumpumpe abgedampft und dann das trockene Lipid in n-Decan (Merck) gelöst (Endkonzentration 75 mg/ml).

Die Lösung wurde mit einer Glasspritze (Hamilton) in das Loch des Teflonfilmes eingebracht.

Messpuffer

Die Messpuffer enthielten standardmäßig KCl in unterschiedlichen Konzentrationen, sowie 10 mM Mops/Tris für Puffer mit pH 7. Für Puffer im sauren Bereich (pH 4-5) wurde als Puffersystem KAc/HAc benutzt, im basischen Bereich (pH 9) kam Bis-Tris-Propan/Tricine zum Einsatz.

2.4.2.3 Experimentelle Durchführung

Die Erzeugung des Bilayers geschah nach der "painting technique" (Müller et al., 1963). Dabei wird Lipidlösung auf das Loch in der Teflonfolie aufgetragen und dann der Flüssigkeitsspiegel in einer der Messkammern wiederholt bis unter das Loch abgesenkt und wieder angehoben, bis sich ein planarer Bilayer gebildet hat.

Als anfängliche Messbedingungen enthielt die *cis*-Kammer anfänglich 250 mM KCl-Puffer und zusätzlich 10 mM CaCl_2 und die *trans*-Kammer 20 mM KCl-Puffer. Diese asymmetrischen Messbedingungen sind wichtig, um eine Fusion der Proteoliposomen mit dem Bilayer zu ermöglichen (Cohen et al., 1980; Niles and Cohen, 1987; Woodbury and Hall, 1988; Cohen et al., 1989). Das Vorhandensein von Ca^{2+} ist eine notwendige Bedingung für die Anlagerung der Liposome an den "Bilayer" (Zimmerberg et al., 1980; Niles and Cohen, 1987).

Vor der Zugabe der Proteoliposome wurden diese kurz im Ultraschallbad beschallt, da nur kleine, unter Spannung stehende Liposome mit dem "Bilayer" fusionieren (Cohen et al., 1980; Niles and Cohen, 1987).

Nach erfolgreicher Fusion wurden dann die für das jeweilige Experiment benötigten Puffer durch Perfusion in die *cis*- bzw. *trans*-Kammer gebracht.

2.4.3 Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Technik erlaubt die Messung kleiner transmembranärer Ionenströme unter Zuhilfenahme einer Glas-Mikroelektrode. Diese sogenannte Patchpipette, welche mit Elektrolytlösung ('Intrazelluläre Lösung') gefüllt ist, wird vor der Messung auf die Zellmembran aufgesetzt. Durch Anlegen eines leichten Unterdrucks wird ein Membranstück ('patch') teilweise in die Pipette eingesaugt. Hierdurch ergibt sich ein extrem hoher Abdichtwiderstand (im Gigaohmbereich) gegen die extrazelluläre Flüssigkeit. Ausgehend hiervon können mehrere verschiedene Ableitkonfigurationen hergestellt werden. Wird das unter der Pipette befindliche Membranareal durch einen stärkeren Unterdruck zerstört, so gelangt man in die 'Whole-Cell' Konfiguration. Es werden dabei Ionenströme über der gesamten Zellmembran gemessen. Wird das Membranstück von der Zelle abgezogen ('Excised-Patch'), so gelangt man in die 'Inside-Out' Konfiguration, bei der nur Ströme durch diesen Membranfleck gemessen werden.

Für die Herstellung der Patch-Clamp Elektroden für 'Whole-Cell'-Messungen wurden Kapillaren aus Borosilikatglas (Kimax-51 mit, 1.8 mm äußerer Durchmesser, 1.5 mm innerer Durchmesser) von der Firma Kimble Products verwendet. Sie wurden mit einem Pipettenziehgerät (L/M-3P-A, List Medical) zu einem vorderen Öffnungsdurchmesser von 2-3 μm ausgezogen. Der Pipettenwiderstand betrug, nach Füllen mit intrazellulärer Lösung, ungefähr 2-3 $\text{M}\Omega$. Analog wurden Pipetten für 'Excised-Patch'-Messungen hergestellt; verwendet wurden ebenfalls Borosilikatglas-Kapillaren (1.5 mm äußerer Durchmesser, 0.87 mm innerer Durchmesser mit Innenfilament, Fa. Hilgenberg), der Pipettenwiderstand betrug ca. 30 $\text{M}\Omega$.

2.4.3.1 Messaufbau

Wie bei der Bilayer-Technik befindet sich der Messaufbau für die Patch-Clamp-Messungen schwingungsgedämpft innerhalb eines Faraday-Käfigs. Zur Beobachtung der Messobjekte dient ein invertierendes Mikroskop (Olympus IMT 2). Als Messverstärker bei diesen Messungen wird ein EPC-7 (List Medical) mit zugehörigem Vorverstärker eingesetzt, an dem die Patchpipette befestigt wurde. Die Verbindung zur Badlösung geschah über eine Ag/AgCl-Elektrode.

2.4.3.2 Messpuffer

Die Badlösung enthielt 10 mM MES/KOH pH 6.3, 20 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , und 2 mM MgCl_2 . Die Pipettenlösung bestand aus 10 mM HEPES/KOH pH 7.2, 120 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 10 mM EGTA, 7.5 mM CaCl_2 (entsprechend einer freien Ca^+ -Konzentration von 500 μM) oder, für Calcium-freie Pipettenlösung, kein CaCl_2 und 5 mM EGTA. Bei Whole-Cell-Experimenten enthielt die Pipettenlösung noch zusätzlich 1 mM ATP.

Beide Lösungen wurden mit Sorbitol auf eine Osmolarität von 320 mOsmol eingestellt.

2.4.4 Datenauswertung und mathematische Berechnungen

2.4.4.1 Vorzeichenkonventionen

Bilayer-Messungen: Die Spannungen beziehen sich auf die *trans* Kammer, das Potential der *cis* Kammer wird als Null angenommen.

Patch-Clamp: Die angegebenen Spannungen beziehen sich auf die Pipette, das Badpotential wird gleich Null gesetzt..

2.4.4.2 Leitwerte

Für die Leitwertbestimmung wurde die Stromdifferenz zwischen dem Geschlossen- und den Offenzuständen des zu untersuchenden Kanals gegen die angelegte Spannung aufgetragen ($I(U)$ -Diagramm). Setzt man einem linearen Zusammenhang zwischen Strom und Spannung voraus, so entspricht der Leitwert Λ der Steigung der Ausgleichsgeraden im $I(U)$ -Diagramm.

2.4.4.3 Selektivität

Alle Ionen-Kanäle zeigen eine mehr oder weniger starke Präferenz für bestimmte Ionen-Sorten. Sie sind grob in Kationen- bzw. Anionen-selektive Kanäle einzuteilen. Um einen bestimmten Kanal einer der beiden Gruppen zuzuordnen, werden Messungen in asymmetrischer Pufferanordnung (unterschiedliche Konzentrationen desselben Salzes auf beiden Seiten der Membran) durchgeführt. Aufgrund der Selektivität fließt schon ohne Membranpotential ein Strom, welcher durch Anlegen einer Spannung zu Null gemacht werden kann. Aus dieser Umkehrspannung E_{rev} kann geschlossen werden, welche Ladungsart bevorzugt geleitet wird und wie groß das Verhältnis der Permeabilitäten ist. Dieses kann - als Funktion von E_{rev} - aus der Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) Stromgleichung für eine Ionen-Art (Hille, 1992, S. 342) abgeleitet werden. Im Falle eines Salzes aus je einem einwertigen Kation und Anion (hier z.B. KCl)

ergibt sich:

$$\frac{P_{K^+}}{P_{Cl^-}} = \frac{[Cl^-]_i - [Cl^-]_a \exp\left(\frac{F E_{rev}}{RT}\right)}{[K^+]_i \exp\left(\frac{F E_{rev}}{RT}\right) - [K^+]_a}$$

(mit F : Faraday-Konstante, R : Gaskonstante; T : absolute Temperatur; die Indizes i und a beziehen sich auf die Innen bzw. Außenseite der Membran. Im Bilayer-System steht ‚innen‘ für die *trans*-Seite).

2.4.4.4 Offenwahrscheinlichkeit

Das Schalten von Ionenkanälen zwischen dem Geschlossen- und den Offenzuständen ist mit einer Konformationsänderung verbunden, der Kanal kann also mehrere stabile Zustände einnehmen. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich der Kanal in einem dieser Zustände befindet, lässt sich durch die Boltzmann-Gleichung beschreiben, da Konformationsänderungen aufgrund thermischer Energie stattfinden. Im einfachen Fall nur eines Offenzustands ergibt sich für die Wahrscheinlichkeit des Offen- und des Geschlossen-Zustands folgender Zusammenhang:

$$\frac{P_{auf}}{P_{zu}} = \exp\left(-\frac{E_{auf} - E_{zu}}{kT}\right)$$

(mit P_{auf} , P_{zu} : Wahrscheinlichkeit der Zustände, E_{auf} , E_{zu} : Energie der Zustände, k : Boltzmannkonstante, T : abs. Temperatur)

Die Offenwahrscheinlichkeit hängt also nicht nur von der Temperatur, sondern auch von der Energiedifferenz der Zustände ab. Aus diesem Grund ist sie oft durch das angelegte Membranpotential beeinflussbar.

Um die Abhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit von der angelegten Membranspannung zu bestimmen, wurde folgendermaßen vorgegangen:

Ausgehend vom Haltepotential 0 mV wurde die Membran de- oder hyperpolarisiert und der fließende Strom aufgezeichnet. Die Offenwahrscheinlichkeit (für die angelegte Spannung) ergibt sich dann aus dem Verhältnis von mittlerem zu maximalem Strom. Für die Berechnung des mittleren Stromes wurden die ersten 20 bis 30 s der Stromaufzeichnung verworfen, da in dieser Zeit das Gleichgewicht noch nicht eingestellt ist.

Danach wurde wieder ein Haltepotential von 0 mV angelegt und bis zur nächsten Spannungsänderung 30 bis 60 s gewartet, um eine Gleichgewichtseinstellung zu erreichen.

2.4.4.5 Bestimmung der Porengröße

Zur Bestimmung der Porengröße von Ionenkanälen wurden Leitwertmessungen in Gegenwart von Nichtelektrolyten durchgeführt. Die Methode basiert auf Untersuchungen von Krasilnikov *et al.* (1992) und beruht auf dem folgenden Prinzip:

Wird einer Elektrolytlösung ein Nichtelektrolyt zugesetzt, so verringert sich dessen Leitfähigkeit, da die Mobilität der Ionen eingeschränkt wird. Die Verminderung der elektrischen Leitfähigkeit ist abhängig von der Konzentration (w/w) des Nichtelektrolyten aber unabhängig von dessen Größe.

Allerdings wird der Leitwert des Kanals vom hydrodynamische Radius des Nichtelektrolyten beeinflusst: Ist dieser geringer als der Porenradius, so kann er ungehindert in die Pore gelangen und die Leitfähigkeiten der Elektrolyte innerhalb und außerhalb der Pore stimmen überein. Mit zunehmender Größe des Nichtelektrolyten nimmt die Reibung zwischen diesen Molekülen und der Porenwand zu und es gelangt immer weniger Nichtelektrolyt in die Pore. Im Grenzfall (Konzentration des Nichtelektrolyten in der Pore ist gleich Null) nähert sich die Leitfähigkeit der Lösung in der Pore dem einer Lösung ohne Nichtelektrolyt an. Der Porenradius des Kanals entspricht also dem desjenigen Nichtelektrolyten, der den Leitwert des Kanals gerade nicht mehr beeinflusst.

Tabelle 2.2 Hydrodynamische Radien der PEGs (entnommen aus Krasilnikov *et al.* (1992), Wert für PEG 8000 extrapoliert) und entsprechende Leitfähigkeiten der verwendeten Puffer

	Hydrodyn. Radius /Angström	Leitfähigkeit des Puffers / mS
100 mM KCl	-	106
PEG 300	6 ± 0.02	59
PEG 400	7 ± 0.03	59
PEG 1000	9.4 ± 0.3	58
PEG 1500	10.5 ± 0.1	58
PEG 2000	12.2 ± 0.1	58
PEG 3000	14.4 ± 0.4	58
PEG 4000	19.2 ± 0.3	58
PEG 6000	25.0 ± 0.3	58
PEG 8000	31	58

Als Nichtelektrolyte wurden im Rahmen dieser Arbeit Polyethylenglycole (PEGs) verwendet, da ihre Struktur annähernd kugelförmig ist. Der Messpuffer enthielt 100 mM KCl, 10 mM Mops/Tris pH 7.0 und 20 % (w/w) des entsprechenden PEGs (Tabelle 2.2). Die elektrische Leitfähigkeit wurde mit einem Knick Digital-Konduktometer gemessen.

Zur Größenbestimmung der Pore wurde dann der Einzelkanalleitwert (bezogen auf den Leitwert in Nichtelektrolyt-freier Lösung) gegen den hydrodynamischen Radius des PEGs aufgetragen. Aus der sich ergebenden Sättigungskurve läßt sich die Größe der Pore bestimmen, bei einer nicht-zylinderförmigen Pore lassen sich minimaler und maximaler Porenradius ermitteln. Der maximale Porenradius entspricht dem Radius des PEGs, mit welchem (innerhalb der Fehlerbreite des maximal gemessenen Leitwerts) die Sättigung beginnt, der minimale Radius entspricht dem Radius des PEGs, bei welchem die Änderung des Leitwerts beginnt (Krasilnikov et al. 1998, Smart *et al.*, 1997).

2.4.4.6 Spannungsrampen

Der Begriff "Spannungsrampe" bezeichnet eine kontinuierliche Veränderung der Spannung über den Bilayer oder den Membranfleck. Im Allgemeinen wurden Spannungsrampen von 10-15 s Dauer angelegt.

Bei den Bilayer-Messungen entstehen hierbei nicht zu vernachlässigende Offsetströme im Bereich einiger pA, bedingt durch die relativ große Kapazität des Bilayers (etwa 200 pF). Diese wurden bei der Auswertung nachträglich berücksichtigt.

2.4.4.7 Spannungssprung-Protokolle

Spannungsprotokolle, bei denen das Membranpotential stufenweise geändert wurde, wurden bei den Whole-Cell Patch-Clamp Experimenten verwendet. Nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration wurden hierzu Spannungssprünge von ein bis vier s Dauer angelegt, wobei die Spannung stufenweise um 20 mV erhöht bzw. erniedrigt wurde.

Ausgehend von positiven Haltepotentialen (+30 bis +50 mV) wurde die Zellmembran bis zu einem Potential von -110 mV hyperpolarisiert; von negativen Haltepotentialen aus (-50 bis -30 mV) wurde sie bis zu einer Membranspannung von +80 mV depolarisiert. Höhere positive Spannungen als 80 mV führten zur Destabilisierung des Seals.

Nach jeder einzelnen De- oder Hyperpolarisation erfolgt eine Pause von zwei bis vier Sekunden.

2.4.5 Peptide

2.4.5.1 Troe33

Das Peptid Troe33 wurde uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Soll, Universität Kiel, zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um das Transitpeptid eines 33 kDa großen Bestandteils des Oxygen Evolving Complex, der an der inneren Seite der Thylakoidmembran mit dem Reaktionszentrum des Photosystem II assoziiert ist (Hashimoto *et al.*, 1997). Troe33 stellt ein zweigeteiltes Transitpeptid dar; es besteht aus einer C-terminalen Thylakoidzielsequenz (AS 44-81) und einer N-terminalen Stromazielsequenz (AS 1-43). Letztere ist der relevante Bereich für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente. Die Stromazielsequenz ist in ihrer Zusammensetzung typisch: auf einen N-terminalen ungeladenen Bereich folgt eine positiv geladene Region; weiterhin enthält sie 18 % hydroxylierte Aminosäuren.

Troe33 umfasst 81 Aminosäuren und trägt 3.92 positive Ladungen bei pH 7.0.

Es wurde in *E. coli* exprimiert und gereinigt und lag in einer Konzentration von ca. 2 mg/ml in 100 mM NaCl, 50 mM Imidazol, 8M Urea und 20 mM Tris/HCl pH 8.6 vor.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung eines putativen Chloroplasten-Kaliumkanals

In der NCBI/GeneBank befindet sich eine cDNA-Sequenz (Accession Number Z83202) von *Arabidopsis thaliana*, die für ein Protein mit der Länge von 662 AS codiert. In Tabelle 3.1 sind die wichtigsten Eigenschaften des abgeleiteten Proteins zusammengefasst.

Tabelle 3.1 Allgemeine Eigenschaften (links) und Aminosäurezusammensetzung (rechts) des vermuteten Chloroplasten-Kaliumkanals

Länge (AS)	662
Molekulargewicht (kDa)	75.6
Isoelektrischer Punkt (pH)	7.4
Ladung bei pH 7.0	1.14

Aminosäuren	Anzahl	Häufigkeit (%)
Geladen (RKHYCDE)	189	28.6
Sauer (DE)	75	11.3
Basisch (KR)	75	11.3
Polar (NCQSTY)	159	24
Hydrophob (AILFWV)	263	39.8

Ein BLAST-Vergleich mit bekannten Proteinsequenzen aus der PROSITE-Datenbank (Altschul *et al.* 1997) zeigte Ähnlichkeiten zu dem *Drosophila*-Kaliumkanal Eag und zu zyklisch-Nukleotid-gesteuerten olfaktorischen Kationenkanälen aus Kuh und Ratte. Weiterhin bestehen Ähnlichkeiten zu pflanzlichen Kaliumkanälen (Abb. 3.1).

3.1.1 Primärstruktur und Sekundärstrukturvorhersage

Der Bereich von AS 279-298 zeigt größte Ähnlichkeit zu den P-Regionen von Kaliumkanälen und enthält das hierfür charakteristische konservierte AS-Sequenzmotiv TVGYGG (Heginbotham *et al.*, 1994; Doyle *et al.*, 1998). Eine Hydrophathieanalyse (Abb. 3.2) zeigte sechs hydrophobe Bereiche, die wahrscheinlich transmembrane Helices darstellen. Das Hydrophathie-

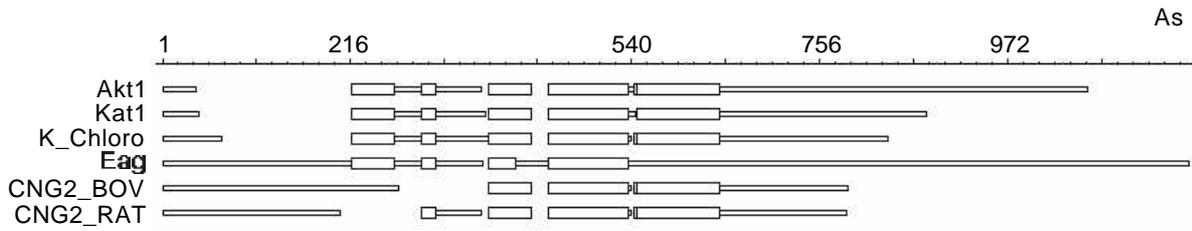


Abb. 3.1 Schematischer AS-Sequenzvergleich des putativen Chloroplasten-Kaliumkanals (K_Chloro) mit bekannten Kaliumkanälen (Akt1, Kat1 : Kaliumkanäle von *Arabidopsis thaliana*, Eag: *Drosophila*-Kaliumkanal, CNG2_BOV, CNG2_RAT : zyklich-Nukleotid-gesteuerte Kationenkanäle aus Kuh und Ratte). Die Kästen stellen Bereiche hoher Sequenzähnlichkeit dar.

profil ähnelt somit stark dem bisher beschriebener Kaliumkanäle von *A. thaliana* (Akt1 und Kat1, Sentenac *et al.* 1992, Anderson *et al.* 1992) und den Kanälen des Shaker-Typs von *Drosophila melanogaster*.

Am N-Terminus befindet sich eine 52 AS lange Signalsequenz, die auf eine chloroplastidäre Lokalisation des Proteins schließen läßt (Emanuelsson *et al.* 2000, Nielsen *et al.*, 1997). Weiterhin existiert am C-Terminus ein Bindemotiv für zyklische Nukleotide (AS 406-AS 519), welches sowohl in den zyklich-Nukleotid-gesteuerten Kanälen als auch in den Kaliumkanälen der Akt- und Kat-Familie zu finden ist.

Aufgrund dieser Befunde handelt es sich bei dem beschriebenen, aus der cDNA abgeleiteten Protein wahrscheinlich um einen Chloroplasten-Kaliumkanal. In elektrophysiologischen Experimenten im Rahmen dieser Arbeit (3.4) sowie in vorangegangenen elektrophysiologischen

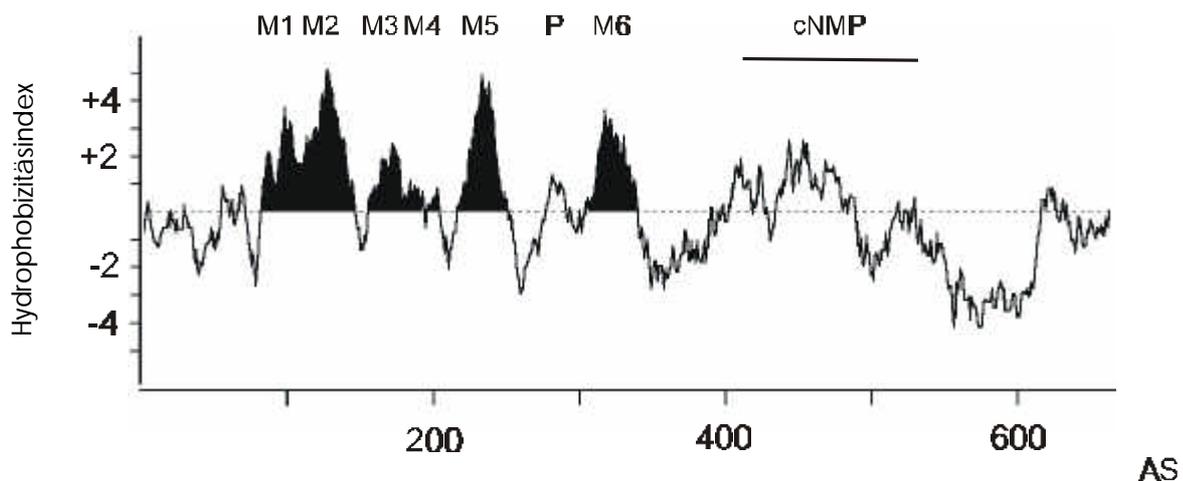


Abb. 3.2 Hydrophathieprofil des putativen Chloroplasten-Kaliumkanals, erstellt nach der Methode von Kyte und Doolittle (1982). Für die Berechnungen wurde ein Fenster von 11 AS verwendet. Die wahrscheinlichen transmembranen Helices (M1-M6) sowie die Porenregion (P) und die Bindestelle für zyklische Nucleotide (cNMP) sind markiert.

Messungen an isolierten Chloroplasten-Hüllmembranen konnte ein Kaliumkanal nachgewiesen werden, der sich wahrscheinlich in der inneren Hüllmembran befindet (Heiber *et al.*, 1995; Mi *et al.* 1994).

3.1.2 Expression in sf21-Insektenzellen

Zur näheren Charakterisierung des putativen Chloroplasten-Kaliumkanals sollte das Gen in Insektenzellen heterolog exprimiert werden. Die entsprechende cDNA wurde uns freundlicherweise von Andreas Weber, AG Prof. Flügge, Universität Köln, zur Verfügung gestellt. Klonierungen in den Baculovirus-Transfervektor wurden im dortigen Labor durchgeführt.

Dabei wurde die cDNA, ohne den für die Signalsequenz codierenden Bereich, in pFastbac HTa eingesetzt (*EcoRI*, *XbaI*), woraus sich eine N-terminale Fusion von sechs Histidinen mit dem Genprodukt ergab.

Mittels des so klonierten Transfervektors wurden rekombinante Baculoviren hergestellt und zur Infektion von Insektenzellen eingesetzt (2.3.13.2).

48-72 Stunden nach Infektion konnte in der Membranfraktion infizierter Zellen mittels SDS-PAGE (2.3.16) ein überexprimiertes Protein der erwarteten Größe von 70 kDa nachgewiesen werden, welches in Kontroll-infizierten Zellen, die GFP (Green fluorescent protein) heterolog exprimierten, nicht vorhanden war (Abb. 3.3).

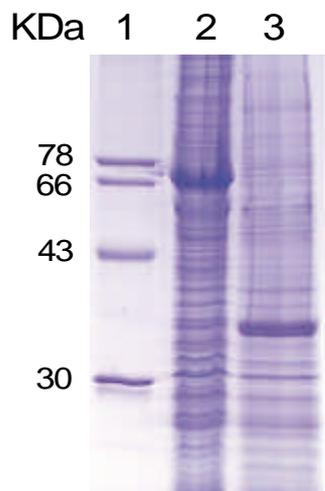


Abb. 3.3 Expression des putativen Chloroplasten-Kaliumkanals in Baculovirus-infizierten Insektenzellen und Analyse mittels SDS-PAGE. Es wurde jeweils die Membranfraktion geernteter Zellen (48-72 h p.i) aufgetragen. Spur 1: Molekulargewichtsmarker, Spur 2: Putativer Chloroplasten-Kaliumkanal, Spur 3: Expression von GFP in Sf21-Insektenzellen (Kontrollspur)

3.1.2.1 Patch-Clamp-Messungen

Um die Funktion des putativen Chloroplasten-Kaliumkanals aufzuklären, wurden Sf21-Insektenzellen 48-72 h nach der Infektion mit rekombinanten Baculoviren mittels der Patch-Clamp-Technik (2.4.3) untersucht. Hierzu wurden zunächst Messungen in der 'Whole-Cell'-Konfigu-

ration durchgeführt, wobei standardmäßig Calcium-haltige Bad- und Calcium-freie Pipettenlösung verwendet wurde.

Durch de- oder hyperpolarisierende Spannungssprünge über die Zellmembran (2.4.4.7) konnten keine spannungsaktivierbaren Ströme gemessen werden. Cytosolisches Calcium kann ein notwendiger Faktor bei der Aktivierung von Kaliumkanälen sein (Breitwieser, 1996; Czempinski *et al.*, 1997). Deshalb wurden ebenfalls Messungen mit Calcium-haltiger Pipettenlösung durchgeführt, diese führten aber ebenfalls zu keinem positiven Befund.

Da der putative Chloroplasten-Kaliumkanal ein Bindemotiv für zyklische Nucleotide besitzt, wurden 'Whole-Cell'-Messungen (wie oben beschrieben) mit je 100 μM cAMP und cGMP in der Pipettenlösung durchgeführt. Hierdurch sollte eine eventuelle Aktivierung des Kanals durch diese Substanzklasse überprüft werden. Es zeigte sich aber, dass auch unter diesen Messbedingungen keine spezifisch induzierten Ströme durch die Zellmembran zu registrieren waren.

Messungen in der 'Excised-Patch'-Konfiguration

Bei den Messungen in der 'Whole-Cell'-Konfiguration konnten aus Stabilitätsgründen nur Spannungen von -110 bis $+80$ mV an die Membran angelegt werden. Kanäle, die erst bei höheren Membranspannungen aktivieren, sind somit nicht nachweisbar. Aus diesem Grund wurden weitere Messungen in der 'Excised-Patch'-Konfiguration durchgeführt, bei der es möglich ist, Einzelkanalmessungen bei Membranspannungen von -150 mV bis $+150$ mV durchzuführen. Hierbei wurde standardmäßig Calcium-freie Bad- und Pipettenlösung verwendet. Messungen an 'Excised-Patches' der Zellmembran zeigten bei positiven oder negativen Membranspannungen keine Kanalaktivität. Eine Perfusion des Membranflecks mit Badlösung, die zusätzlich je 100 μM cAMP und cGMP enthielt, zeigte bei gleichen Bedingungen keine Änderung.

Weiterhin wurden Messungen mit Calcium-haltigen Puffern in Bad und Pipette durchgeführt. Bei diesen Messbedingungen werden spannungsaktivierbare Kanäle sichtbar, die aber endogen von den Insektenzellen produziert werden, da sie auch an nicht infizierten Zellen gemessen werden konnten (Daten nicht gezeigt). In den infizierten Insektenzellen zeigten sich allerdings auch bei Verwendung von Calcium-haltigen Puffern keine deutlich andere Kanalaktivität in den 'Excised-Patches'. Auch durch Perfusion des Patches mit cNMP-haltiger Badlösung (s. o.) konnten keine weiteren Kanäle geöffnet werden.

3.1.2.2 Solubilisierung und Reinigung

Für eine weitere biochemische Charakterisierung des putativen Chloroplasten-Kaliumkanals sollte das in den Insektenzellen exprimierte Protein gereinigt werden. Hierzu wurde das Protein

nach (2.3.14) solubilisiert, wobei als Detergens Dodecylmaltosid verwendet wurde. Das Solubilisat wurde dann nach (2.3.15) einer His-tag-Affinitätschromatographie unterworfen. Es zeigte sich, daß nur ein sehr geringer Teil des solubilisierten Proteins (ca. 1 %) an die Ni-chelatierende Agarose band. Aufgrund dieser sehr geringen Ausbeute der Proteinreinigung wurde auf weitere Experimente mit dem solubilisierten Protein verzichtet.

3.2 Charakterisierung eines putativen *Synechocystis*-Kaliumkanals

Nach Sequenzvergleich auf Aminosäureebene mit bekannten Kaliumkanalsequenzen konnte im Genom von *Synechocystis* sp. PCC6803 ein offenes Leseraster (sll0993) identifiziert werden, welches potentiell für einen Kaliumkanal codiert. Ein BLAST-Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz mit bekannten Proteinsequenzen aus der PROSITE-Datenbank (Altschul *et al.* 1997) zeigte Ähnlichkeiten zu einem Kaliumkanal von *E. coli* und zu zwei angenommenen Kaliumkanälen von *Methanococcus jannaschii*. Weitgehend bestehen Sequenzähnlichkeiten zu dem Kaliumkanal KcsA von *Streptomyces lividans* (Abb. 3.4).

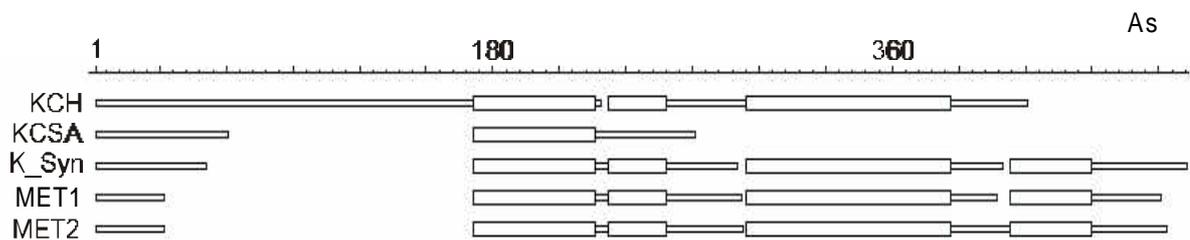


Abb. 3.4 Schematischer AS-Sequenzvergleich des putativen *Synechocystis*-Kaliumkanals (K_Syn) mit bekannten oder vermuteten Kaliumkanälen (KCH: *E. coli*-Kaliumkanal, KcsA: Kaliumkanal von *Streptomyces lividans*, MET1, MET2 : potentielle Kaliumkanäle von *Methanococcus jannaschii* Y13B_METJA und YD57_METJA). Die Kästen stellen Bereiche hoher Sequenzähnlichkeit dar.

3.2.1 Primärstruktur und Sekundärstrukturvorhersage

In Tabelle 3.2 sind die wichtigsten Eigenschaften des abgeleiteten Proteins zusammengefasst. Es besteht aus 365 Aminosäuren und besitzt im Aminosäurebereich 54 bis 75 eine starke Sequenzähnlichkeit (ca. 75 % ähnliche AS) zu Porenregionen pro- und eukaryontischer Kaliumkanäle. Das für P-Regionen charakteristische AS-Sequenzmotiv TVGYGD ist mit zwei konservierten AS-Austauschen zu TVGFGE darin vorhanden. Der Porenbereich wird flankiert von zwei sehr hydrophoben Sequenzabschnitten, die wahrscheinlich eine α -helikale Sekundärstruktur

Tabelle 3.2 Allgemeine Eigenschaften (links) und Aminosäurezusammensetzung (rechts) des vermuteten *Synechocystis*-Kaliumkanals

Länge (AS)	365	Aminosäuren	Anzahl	Häufigkeit (%)
Molekulargewicht (kDa)	40.5	Geladen (RKHYCDE)	100	27.4
Isoelektrischer Punkt (pH)	7.13	Sauer (DE)	39	10.7
Ladung bei pH 7.0	0.2	Basisch (KR)	39	10.7
		Polar (NCQSTY)	83	22.8
		Hydrophob (AILFWV)	154	42.2

tur einnehmen (Hofmann und Stoffel, 1993) (Abb. 3.5). Hiermit ähnelt sll0993 in seiner Strukturvorhersage der Sekundärstruktur von KcsA (Doyle *et al.* 1998), wengleich er einen längeren C-Terminus besitzt. Aufgrund dieses Merkmals besteht eine Ähnlichkeit zu eukaryontischen einwärts-gleichrichtenden Kaliumkanälen der Kir-Familie (Jan und Jan, 1997).

3.2.2 Klonierung von sll0993

Aus genomischer DNA von *Synechocystis* wurde unter Verwendung der Primer HL 375 und HL 376 mittels PCR (2.3.6) ein 1159 bp langes DNA-Stück amplifiziert. Die Annealing-Temperatur betrug 64 °C. Das PCR-Produkt trägt, durch die Primer vorgegeben, am 5'-Ende eine *NdeI* und am 3'-Ende eine *BamHI*-Schnittstelle. Die DNA wurde aus dem Gel extrahiert (2.3.9) und in pUC-18 subkloniert (2.3.11.7). Ausgehend von diesem Shuttle-Vektor erfolgten dann Klonierungen in die Vektoren zur Expression in *E. coli* und Sf21-Insektzellen (Abb. 3.6), wie im folgenden beschrieben. Die fertigen Expressionsvektoren wurden nach (2.3.12) sequenziert (ca. 800bp von beiden Enden des Inserts aus), um ihre Identität zu überprüfen.

3.2.2.1 Klonierung in den pET-Vektor und Expression in *E. coli*

Die cDNA wurde mit *NdeI* und *EcoRI* aus pUC18 ausgeschnitten (2.3.11.1), wobei die überhängenden Enden der *EcoRI*-Schnittstelle aufgefüllt wurden (2.3.11.4). PET16b wurde

NdeI/BamHI aufgeschnitten (2.3.11.1), die *BamHI*-Schnittstelle aufgefüllt (2.3.11.4) und das Insert durch Ligation (2.3.11.5) eingesetzt.

Die Expression in *E. coli* erfolgte nach (2.3.13.1). Die Zellen wurden 0,5, zwei, vier und 16 Stunden nach Induktion geerntet und das gesamte Zellprotein mittels SDS-PAGE (2.3.16) aufgetrennt.

Im Vergleich zu nicht-induzierten Zellen war keine Überexpression des *Synechocystis*-Proteins nachzuweisen. Nach Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (2.3.18) und Inkubation mit dem Penta-His-Antikörper (2.3.19), zeigte sich, dass in keiner der untersuchten Zellproben ein His-Tag-Protein nachgewiesen werden konnte. Eine daraufhin erfolgte Änderung der Expressionstemperatur von 37 °C auf 21 °C oder 30 °C zeigte keine Verbesserung.

3.2.2.2 Klonierung in pFastbac und Expression in Insektenzellen

Da die Expression des putativen *Synechocystis*-Kaliumkanals in *E. coli* nicht erfolgreich war, sollte das Protein in Sf21-Insektenzellen exprimiert werden. Hierzu wurde das Insert mit *BamHI* aus dem pUC18-Vektor ausgeschnitten (2.3.11.1) und in den mit *BamHI* geöffneten pFastbac1 ligiert (2.3.11.5). Das Gen (in seiner richtigen Orientierung) liegt nun downstream des Polyhedrinpromotors mit der *NdeI*-Schnittstelle am 5'-Ende. Der so erstellte Vektor wurde nun mit *NdeI* geöffnet (2.3.11.1) und eine 6x-His-Tag-Kassette (HL 326/327) eingesetzt (2.3.11.6). Die Kassette codiert für 6 Histidine inklusive eines vorangestellten ‚RGS‘ Epitops. Die Expression des so erstellten sll0993/6x-His-Konstrukts in Sf21 Insektenzellen erfolgte nach (2.3.13.2). Nach 2 Tagen p.i. ließ sich ein Protein mittels SDS-Page nachweisen (2.3.16),

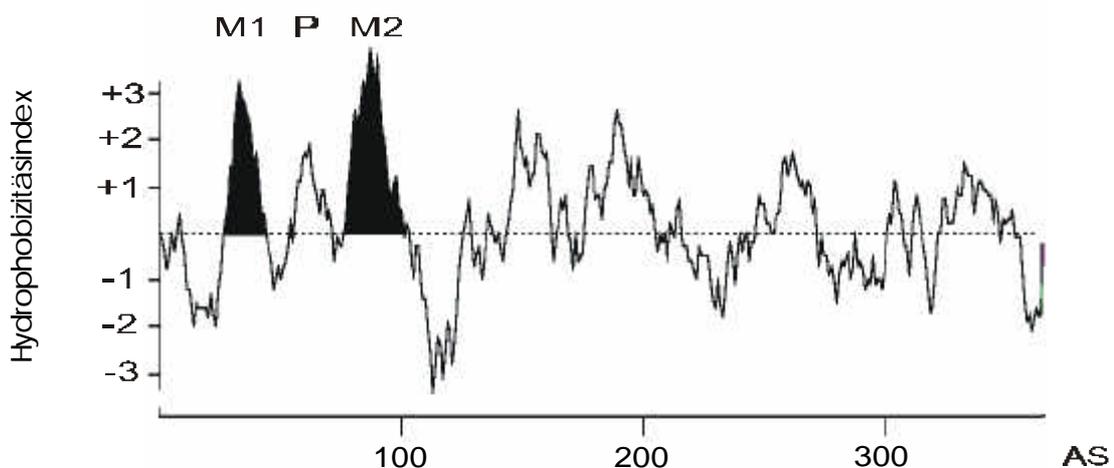


Abb. 3.5 Hydropathieprofil des putativen *Synechocystis*-Kaliumkanals, erstellt nach der Methode von Kyte und Doolittle (1982). Für die Berechnungen wurde ein Fenster von 11 AS verwendet. Die wahrscheinlichen transmembranen Helices (M1, M2) sowie die Porenregion (P) sind markiert.

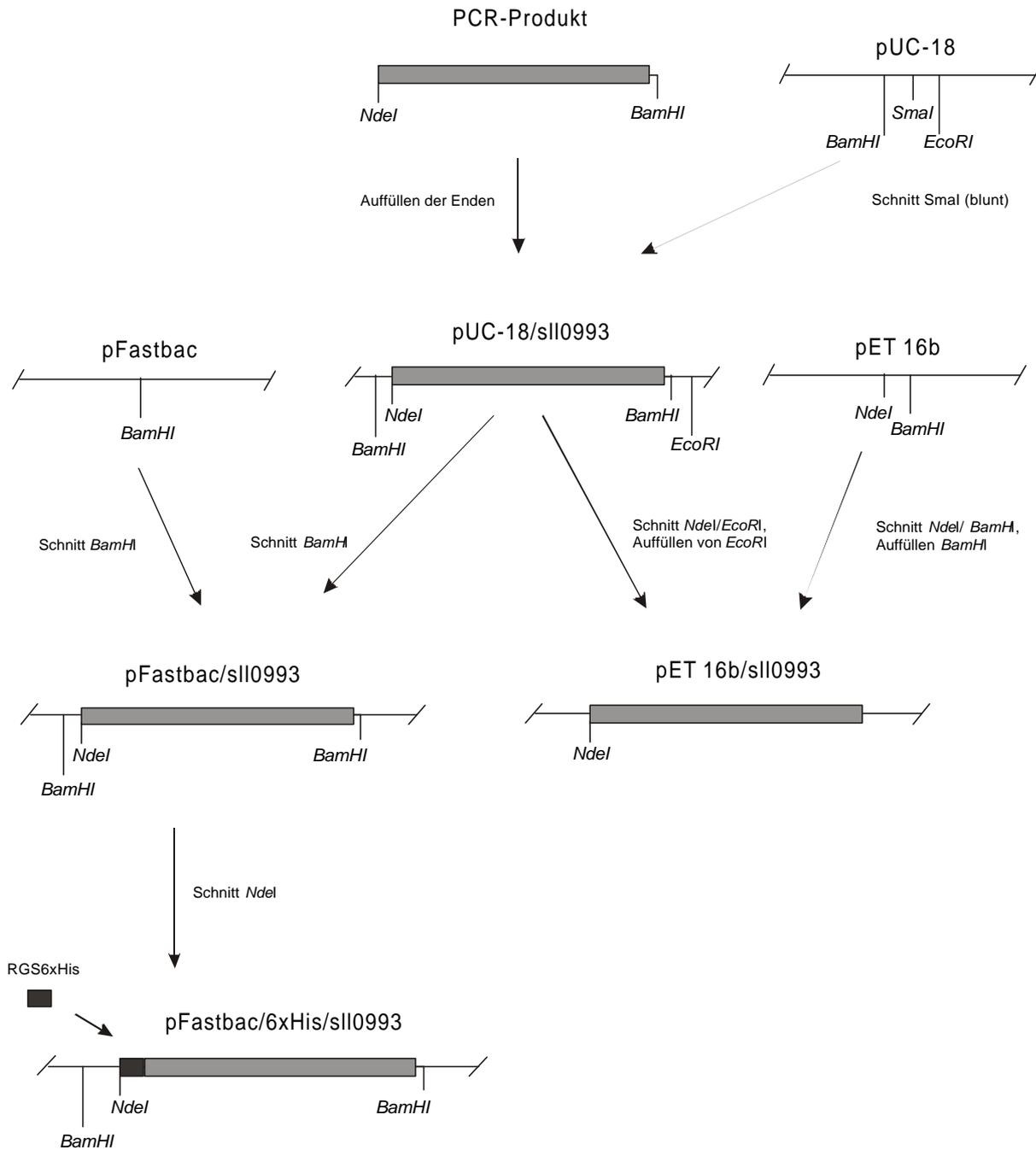


Abb. 3.6 Klonierung von sII0993 in die Vektoren zur Expression in *E. coli* (pET 16b) und in Insektenzellen (pFastbac). Der für das Protein codierende Bereich ist grau dargestellt, die RGS6xHis-Kassette schwarz.

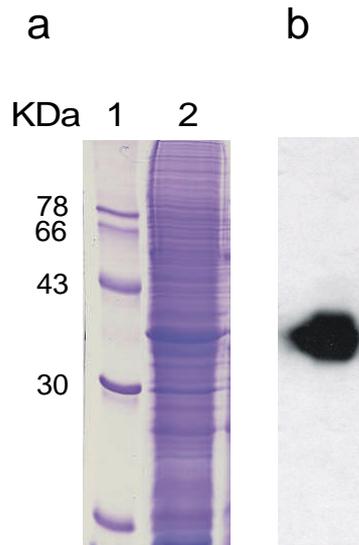


Abb. 3.7 Expression des putativen *Synechocystis*-Kaliumkanals sll0993 in Baculovirus-infizierten Insektenzellen.
 A SDS-PAGE. Spur 1: Molekulargewichtsmarker, Spur 2: Membranfraktion der Insektenzellen 72 h p.i.
 B Western-Blot der Membranfraktion der Insektenzellen 72h p.i. nach SDS-PAGE und Nachweis mit Anti-Penta-His-Antikörper

welches im Gel in etwa in der erwarteten Höhe von 42 kDA erschien. Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran (2.3.18) und immunologischem Nachweis mit dem Anti-Penta-His-Antikörper (2.3.19) zeigte sich ein stark immunopositives Signal in der Höhe der Bande des exprimierten Proteins (Abb. 3.7).

3.2.3 Patch-Clamp-Messungen

Um die Funktion des putativen *Synechocystis*-Kaliumkanals zu untersuchen, wurden, wie schon unter (3.1.2.1) beschrieben, 'Whole-Cell'-Patch-Clamp Untersuchungen an infizierten Sf21-Insektenzellen durchgeführt.

Durch de- oder hyperpolarisierende Spannungssprünge über die Zellmembran konnten keine spannungsaktivierten Ströme registriert werden. Messungen in der 'Excised-Patch'-Konfiguration (jeweils mit und ohne Calcium) zeigten ebenfalls keine Kanalaktivität, die auf das überexprimierte Protein zurückzuführen wäre.

3.2.4 Reinigung

Da sich die Charakterisierung des in den Insektenzellen exprimierten putativen Kaliumkanals mittels der Patch-Clamp-Technik als nicht durchführbar erwiesen hat, sollte das in Insektenzellen exprimierte Protein solubilisiert, gereinigt und dann weiter charakterisiert werden.

Es erwies sich, dass von den getesteten Detergentien TritonX-100 die höchste Ausbeute bei der Solubilisierung zeigte. Nach der Solubilisierung (2.3.14) mit diesem Detergens wurde das Protein dann nach (2.3.15) mittels einer His-tag-Affinitätschromatographie gereinigt (Abb. 3.8). Es zeigte sich, dass ca. nur 10-20 % des solubilisierten Proteins an die Ni-Agarose band und wieder

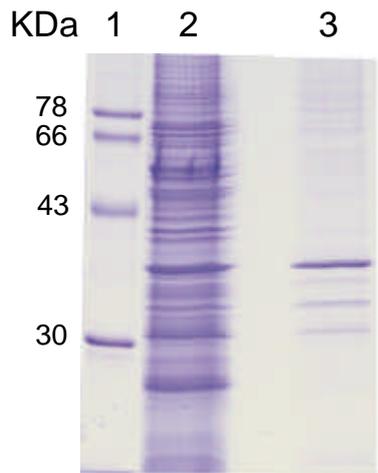


Abb. 3.8 Reinigung des putativen *Synechocystis*-Kaliumkanals mittels Ni-chelatierender Agarose. Dargestellt ist ein SDS-Polyacrylamidgel nach Coomassie-Färbung. Spur 1: Molekulargewichtsmarker, Spur 2: Membranfraktion geernteter Zellen (48-72 h p.i.) nach Solubilisierung, Spur 3: Elutionsfraktion nach Reinigung.

eluiert werden konnte. Eine Verlängerung der Bindungsdauer auf 12-16 h zeigte keine Verbesserung, was auf eine nicht optimale Zugänglichkeit des His-Tags schließen ließ.

Weiterhin wurden nach der Reinigung im Eluat noch Proteine mit geringerem Molekulargewicht nachgewiesen (Abb. 3.8, Spur 2). Diese traten, relativ zur Menge des eigentlichen Proteins, je nach Dauer der Proteinreinigung, unterschiedlich stark in Erscheinung. Deswegen handelt es sich hierbei vermutlich um Abbauprodukte, die trotz eingesetztem Proteasehemmer auftraten.

Insgesamt konnten aus $6 \cdot 10^7$ Zellen (entsprechend dem Inhalt einer 175 cm^2 -Zellkulturschale) ca. 20-40 μg gereinigtes Protein gewonnen werden, was für eine Rekonstitution in Liposomen ausreichend war.

3.2.5 Rekonstitution und Bilayer-Messungen

Das nach (3.2.4) gereinigte Protein wurde zunächst in Azolektin-Liposomen rekonstituiert (2.3.20) und dann mittels der Bilayer-Methode (2.4.2) weiter untersucht.

Bei Messungen mit der Puffer-Standardkonfiguration (250 mM KCl *cis*/ 20 mM KCl *trans*) konnten keine Fusionen von Proteoliposomen mit der künstlichen Lipiddoppelschicht erzeugt werden, welche zur Inkorporation von Kanalproteinen in den Bilayer geführt hätte. Eine Veränderung des KCl-Gradienten über die Bilayer-Membran (1 M KCl zu 20 mM KCl) führte nicht zu Fusionen.

Da der bisher mit der Bilayer-Methode charakterisierte bakterielle Kaliumkanal eine pH-abhängige Offenwahrscheinlichkeit besitzt (Cuello *et al.* 1998; Meuser, 2000) und letztere für Fusionen der Proteoliposomen mit dem Bilayer wichtig ist, wurden die Experimente bei pH 9 und pH 4 wiederholt. Dieses führte ebenfalls nicht zu einer Inkorporation von Kanälen in den Bilayer.

3.3 Charakterisierung von Tic110

Die nachfolgenden Ergebnisse beziehen sich auf das Protein aus *Pisum sativum*. Es besteht aus 996 AS, wobei die ersten 37 AS eine Zielsequenz für den Import in den Chloroplasten darstellen (Lübeck *et al.* 1996). In Tabelle 3.3 sind die wichtigsten Eigenschaften des Proteins zusammengefasst.

Tabelle 3.3 Allgemeine Eigenschaften (links) und Aminosäurezusammensetzung (rechts) von Tic110

Länge (AS)	996	Aminosäuren	Anzahl	Häufigkeit (%)
Molekulargewicht (kDa)	110	Geladen (RKHYCDE)	333	33.4
Isoelektrischer Punkt (pH)	5.99	Sauer (DE)	148	14.9
Ladung bei pH 7.0	-8.1	Basisch (KR)	139	14
		Polar (NCQSTY)	225	22.6
		Hydrophob (AILFWV)	362	36.4

Ein BLAST-Vergleich (Altschul *et al.* 1997) mit bekannten PROSITE-Proteinsequenzen ergab keinerlei Sequenzähnlichkeiten von Tic110 mit anderen Proteinen, die an der Translokation von Proteinen (z.B. über die Hüllmembranen von Mitochondrien, über die ER-Membran oder die äußere Chloroplasten-Hüllmembran) beteiligt sind.

3.3.1 Angenommene Sekundärstruktur

Tic110 zeigt im Hydropathieplot viele kürzere hydrophobe und hydrophile Bereiche (Daten nicht gezeigt). Auffällig ist sein hoher Anteil an geladenen Aminosäuren (33.4 %). Der Bereich von AS 70 bis AS 140 zeigt eine ausreichende Hydrophobizität, um transmembrane Segmente darzustellen. Aus diesem Grund wurde für die Sekundärstruktur des Proteins ein N-terminaler Membrananker aus einer oder zwei α -Helices mit einem darauf folgendem freien C-Terminus prognostiziert (Kessler und Blobel 1996, Lübeck *et al.* 1996). Andere Sekundärstrukturvorhersagemodelle (Gilbert, 1992) errechnen für Tic110 nur einen geringen α -helicalen Anteil (ca.

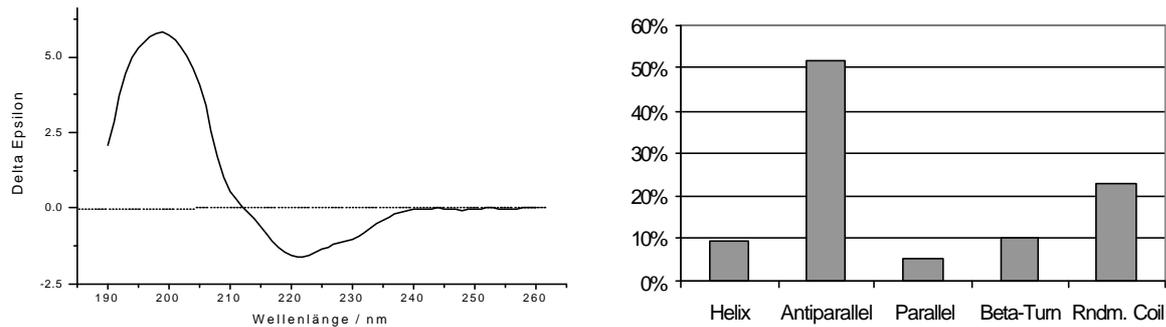


Abb. 3.9 Links: CD-Spektrum des rekombinanten Tic110 (in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pH 7, 1 % Mega-9). Rechts: Analyse des Spektrums auf den relativen Gehalt an verschiedenen Sekundärstrukturen. Die Analyse wurde mittels eines neuronalen Netzwerks anhand bekannter Proteinstrukturen und deren CD-Spektren durchgeführt (Andrade *et al.*, 1993; Dalmas *et al.* 1994).

12%), aber über 80% β -Faltblätter in der Sekundärstruktur.

CD-Spektren (durchgeführt von Prof. R. Wagner) deuten ebenfalls auf einen hohen Anteil von β -Faltblättern (>50 % antiparallele) in der Sekundärstruktur hin (Abb. 3.9).

3.3.2 Expression und Reinigung

Alle diesbezüglichen Arbeiten wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. J. Soll, Universität Kiel, durchgeführt.

Tic110 wurde in *E. coli* als His-Tag-Fusionsprotein exprimiert und mittels Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt. Das gereinigte Protein zeigte im SDS-Gel dieselbe elektrophoretische Beweglichkeit wie das native Protein der inneren Hüllmembran. Beide Proteine reagierten in einer Immunoblot-Analyse mit Tic110-spezifischen Antikörpern (Daten nicht gezeigt).

Das Protein wurde uns, gelöst in Puffer (20 mM Tris/HCl pH 8, 100 mM NaCl, 100 mM Imidazol, 8 M Urea) für die nachfolgenden Experimente zur Verfügung gestellt. Die Rekonstitution in Liposome geschah nach (2.3.21.2).

3.3.3 Elektrophysiologische Charakterisierung des rekombinanten Tic110

Hierzu wurde die Bilayer-Technik, wie unter 2.4.2 beschrieben, angewendet. Die dabei verwendeten Messpuffer (2.4.2.2) hatten einen pH von 7.0.

Die Bestimmung der Offenwahrscheinlichkeit und des Porendurchmessers wurden von Roland Hemmler in dieser Arbeitsgruppe durchgeführt.

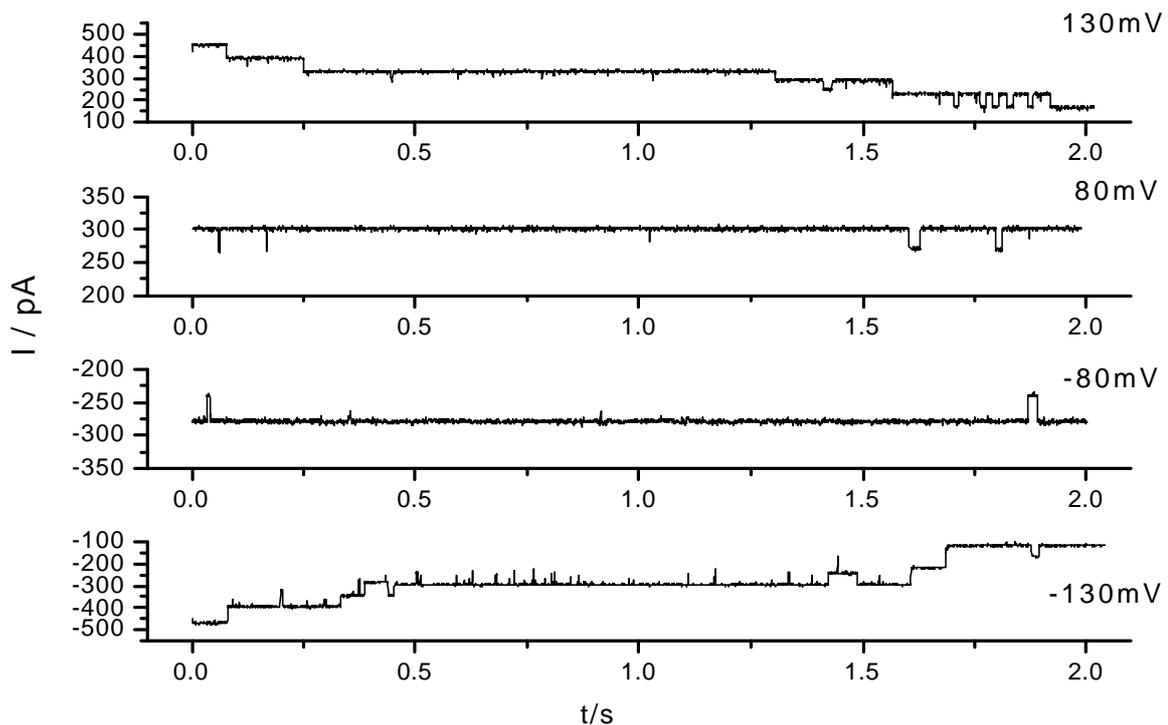


Abb. 3.10 Beispielspuren des Stromes durch mehrere Kopien von Tic110 nach Spannungssprüngen auf verschiedene Membranpotentiale (Pufferbedingungen: 250 mM KCl symmetrisch).

Nach Fusion der Tic110 enthaltenden Proteoliposome mit der künstlichen Lipiddoppelschicht konnte Kanalaktivität festgestellt werden. Das Schaltverhalten der Kanäle bei symmetrischen Pufferbedingungen (250 mM KCl) ist in Abb. 3.10 dargestellt. Nach Spannungssprüngen auf hohe positive oder negative Haltepotentiale erfolgte ein schnelles Schließen von Kanälen, mit anschließender Gleichgewichtseinstellung. Bei kleineren Membranspannungen war der Kanal fast immer offen. Generell schaltete der Kanal relativ selten, ein schnelles Flickern war fast nie zu beobachten.

3.3.3.1 Leitwert und Selektivität

In Abb. 3.11 (links) ist das Strom-Spannungs-Diagramm der Einzelkanalströme dargestellt (Messbedingungen 250 mM KCl symmetrisch). Es trat ein Hauptleitwert von 446 ± 9 pS auf. Selten wurden noch Unterleitwerte beobachtet, die aber nicht näher charakterisiert wurden. Aufgrund der hohen Offenwahrscheinlichkeit bei kleinen Membranpotentialen konnte die Selektivität mittels Spannungsrampen bei unsymmetrischer Salzkonzentration bestimmt werden (Abb. 3.11 rechts). Der Kanal besitzt ein Umkehrpotential von 44 ± 1.6 mV ($n=12$), das Protein ist somit deutlich selektiv für Kationen. Das Permeabilitätsverhältnis von Kalium- zu

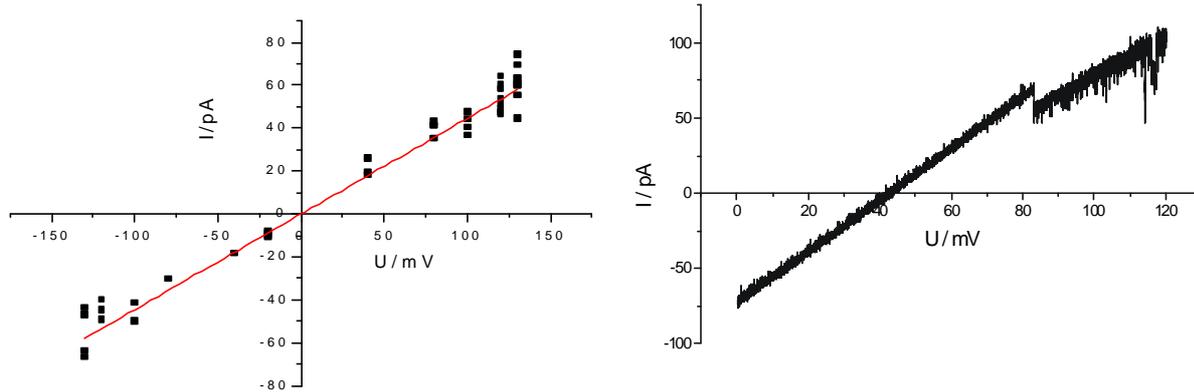


Abb. 3.11 Links: Strom-Spannungs-Diagramm von Tic110 bei symmetrischen Pufferbedingungen (250 mM KCl). Aufgetragen sind die Einzelkanalströme von vier Messungen. Der Kanal besitzt einen Leitwert von 446 ± 9 pS.

Rechts: Selektivität von Tic110

Dargestellt ist eine Spannungsrampe durch mehrere Kopien des Kanals unter asymmetrischen Pufferbedingungen (250 mM KCl *cis*, 20 mM KCl *trans*). Der Kanal ist selektiv für Kationen ($E_{rev} = 44$ mV).

Chloridionen ergibt sich nach (2.4.4.3) zu $P_K/P_{Cl} = 9.6$.

3.3.3.2 Offenwahrscheinlichkeit

Die Offenwahrscheinlichkeit wurde nach (2.4.4.4) ermittelt und ist in Abb. 3.12 dargestellt. Als Messpuffer wurde 250 mM KCl symmetrisch verwendet. Der Kanal hat bei einer Membranspannung von 0 mV seine höchste Offenwahrscheinlichkeit, die etwa bei 1 liegt. Zu höheren positiven und negativen Spannungen fällt sie ab und beträgt bei ± 130 mV fast Null.

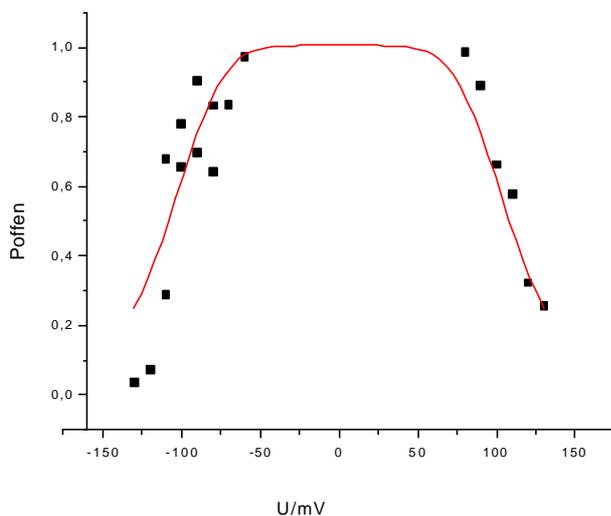


Abb. 3.12 Offenwahrscheinlichkeit des durch Tic110 gebildeten Kanals in Abhängigkeit von der Membranspannung. Die Daten stammen aus vier unabhängigen Messungen mit jeweils mehreren Kanälen (> 5) im Bilayer.

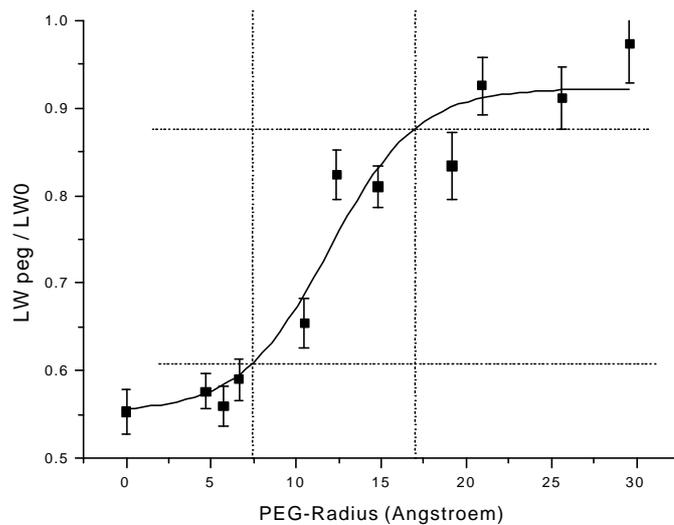


Abb. 3.13 Größenbestimmung der durch Tic110 gebildeten Pore mittels Messungen in Gegenwart von Nichtelektrolyten (Polyethylenglycolen). Aufgetragen ist der Einzelkanalleitwert (LW_{peg}) relativ zum Leitwert ohne PEGs (LW_0) gegen den PEG-Radius. Der Porenradius liegt zwischen 7.5 und 17 Angström.

3.3.3.3 Porendurchmesser

Der Porendurchmesser wurde durch Leitwertmessungen in Gegenwart von Nichtelektrolyten (2.4.4.5) bestimmt. Für den kleinsten Porenradius (beginnender Effekt der PEGs) ergab sich ein Wert von ca. 7.5 Angström, der größte Porenradius (Sättigung) beträgt ungefähr 17 Angström.

3.3.3.4 Einfluss von Troe33 auf Tic110

Bei den Versuchen zum Effekt des Transitpeptids Troe33 (2.4.5.1) wurden bezüglich der Puffer asymmetrische Messbedingungen (250 mM KCl *cis*/ 20 mM KCl *trans*) gewählt. Das Peptid wurde auf der *trans*-(Niedrigsalz-)Seite zugegeben.

Troe33 ruft einen spannungsabhängigen Block der Tic110-Kanäle hervor (Abb. 3.14 links). Bei höheren positiven Spannungen (entsprechend einer Triebkraft für das positiv geladene Peptid von *trans* nach *cis*) zeigte sich, im Vergleich zur Kontrolle, eine Verringerung des Gesamtstromes durch die Kanäle ($n=5$). Diese setzte schon bei einer Troe33-Konzentration von 130 nM ein und stieg bei steigenden Peptidkonzentrationen noch weiter an. In Abb. 3.14 (rechts) ist der Effekt nochmals graphisch dargestellt. Aufgetragen ist die Differenz zwischen dem mittleren Gesamtstrom mit und ohne Peptid, bezogen auf den mittleren Strom der Kontrollspannungsrampe (jeweils im Spannungsbereich 90-110 mV).

Der durch Troe33 verursachte Block äußerte sich in einer Verringerung der Offenwahrscheinlichkeit des Kanals mit verstärktem Auftreten von Schaltereignissen. Dieses entspricht einem mittelschnellem Block (siehe Hille 1992, s. 393). Nach Beendigung der Applikation der Spannungsrampe waren die Kanäle wieder vollständig geöffnet (Daten nicht gezeigt).

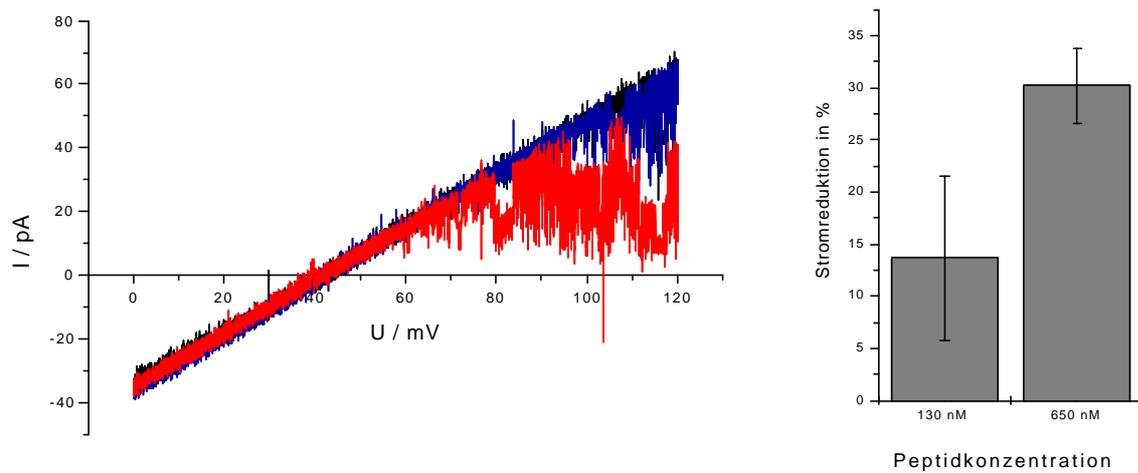


Abb. 3.14 Links: Effekt von Troe33 auf Tic110.

Dargestellt sind Spannungsrampen unter asymmetrischen Pufferbedingungen (250 mM KCl *cis*, 20 mM KCl *trans*). Schwarz: Kontrolle; Blau: 130 nM Troe33 *trans*; Rot: 650 nM Troe33 *trans*

Rechts: Stärke der Stromreduktion durch Troe33 nach Applikation von Spannungsrampen.

3.4 Elektrophysiologische Charakterisierung der inneren Chloroplasten-Hüllmembran

Abb. 3.15 zeigt eine Übersicht der Proteine der inneren Hüllmembran des Chloroplasten aus *Pisum sativum*. Um diese Membran elektrophysiologisch zu charakterisieren, wurde die Bilayer-Technik (2.4.2) angewendet. Zunächst wurden die Membranfragmente/Vesikel direkt appliziert. Auf diese Art konnten Fusionen der Membranen mit der künstlichen Lipiddoppelschicht erzeugt werden, was zur Inkorporation von Kanalproteinen in den Bilayer führte. Es zeigte sich jedoch, dass durch diese Fusionen die Bilayer-Membran stark destabilisiert wurde, was eine Charakterisierung der Kanalproteine unmöglich machte.

Aus diesem Grund wurden für alle weiteren Versuche innere Chloroplasten-Hüllmembranen verwendet, die vorher mit Azolektin-Liposomen fusioniert wurden (2.3.22). Durch diese Maßnahme blieb die Stabilität des Bilayers nach Fusionsereignissen weitestgehend erhalten. Es konnten so in ca. 20-30 % der Fälle ausreichend lange Messungen (> 2 min) durchgeführt werden.

Die elektrophysiologischen Messungen an der inneren Chloroplasten-Hüllmembran zeigten, dass in dieser Membran verschiedene, sowohl Anionen- als auch Kationen-selektive Kanalproteine mit unterschiedlich großen Leitwerten vorhanden sind. In ca. 30 % der Fälle befand sich nach einer Fusion mehr als ein Kanal im Bilayer.

Die folgenden Experimente wurden auf die Charakterisierung der Kationen-selektiven Kanäle beschränkt. Es konnten ein mäßig Kationen-selektiver Kanal, im Folgenden mit CIMCC1 (Chloroplast Inner Membrane Cation Channel 1) bezeichnet und ein stärker Kationen-selektiver Kanal, im Folgenden mit CIMCC2 (Chloroplast Inner Membrane Cation Channel 2)

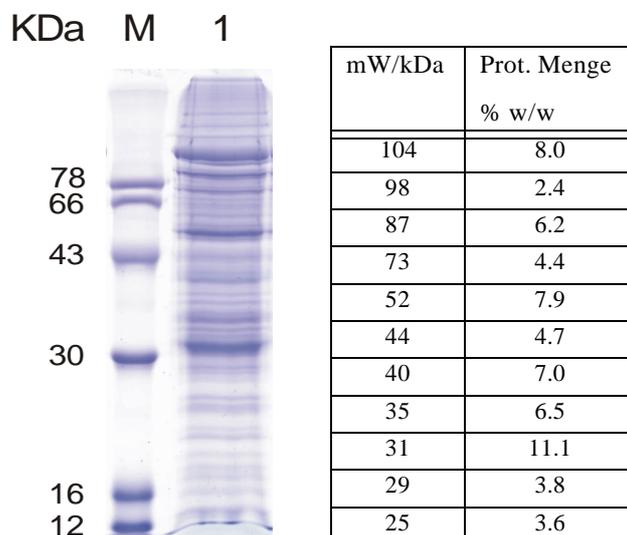


Abb. 3.15 Links: SDS-Gelelektrophorese der inneren Chloroplasten-Hüllmembran (Spur 1). Aufgetragen wurde ca. 15 µg Protein. M: Molekulargewichtsstandard.

Rechts: Aus dem Gel entnommene relative Mengen (bezogen auf den Gesamtproteingehalt der Spur) der häufigsten Proteine der Membran.

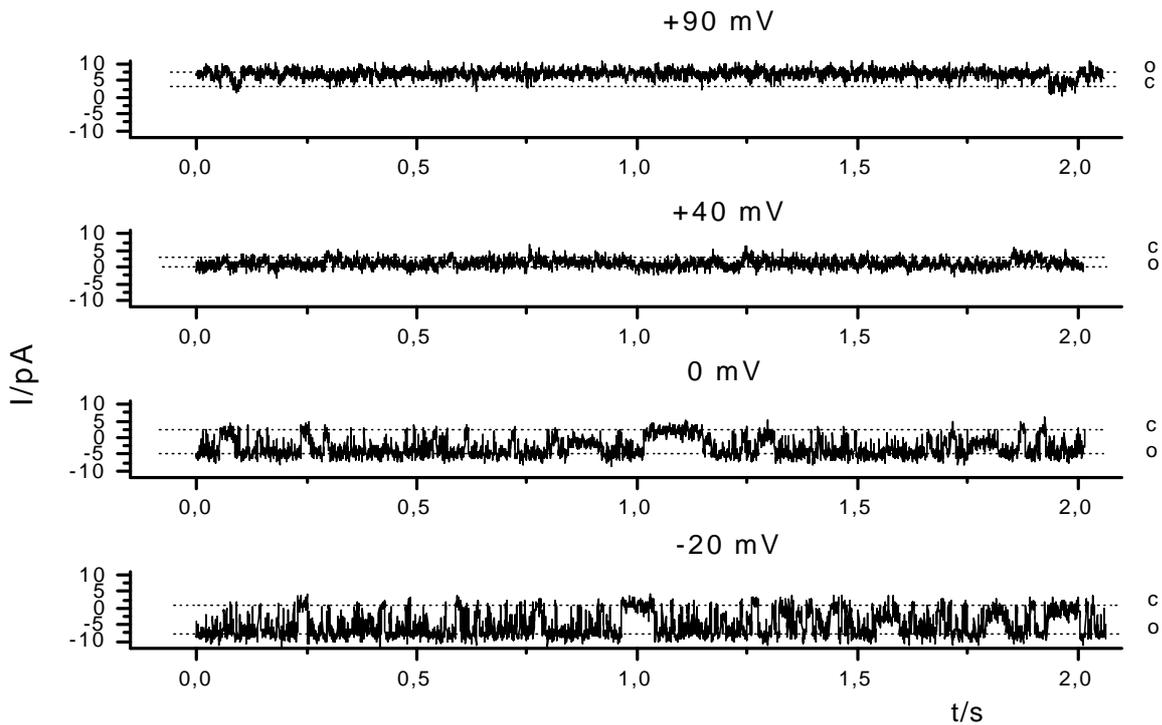


Abb. 3.16 Repräsentatives Beispiel für Ströme durch den Kaliumkanal der inneren Chloroplasten-Hüllmembran bei verschiedenen Membranspannungen (Puffer 250 mM KCl *cis*, 20 mM KCl *trans*). Geschlossen- und Offenzustand (c bzw. o) sind markiert.

bezeichnet, mit jeweils vergleichsweise großem Leitwert (>500 pS in 250 mM KCl) charakterisiert werden. Ersterer war mit Abstand am häufigsten zu sehen. Weiterhin konnte noch ein weiterer Kanal detektiert werden, der einen kleinen Leitwert (ca. 100-150 pS in 250 mM KCl) und eine sehr starke Selektivität für Kationen besaß (Umkehrpotential >50 mV bei 250 mM KCl *cis* und 20 mM KCl *trans*, entsprechend einem P_K/P_{Cl} von > 20). Abb. 3.16 zeigt Beispiel-Stromverläufe durch diesen Kanal.

Da Proteoliposome, die diesen Kanal enthielten, nur selten mit der künstlichen Lipiddoppelschicht fusionierten, wurde zunächst keine ausführliche Charakterisierung durchgeführt. Wahrscheinlich handelt es sich dabei jedoch um den schon beschriebenen chloroplastidären Kaliumkanal (Heiber *et al.*, 1995; Mi *et al.* 1994).

3.4.1 Charakterisierung CIMCC1

Abb. 3.17 zeigt repräsentative Stromverläufe durch diesen Kanal bei verschiedenen Spann-

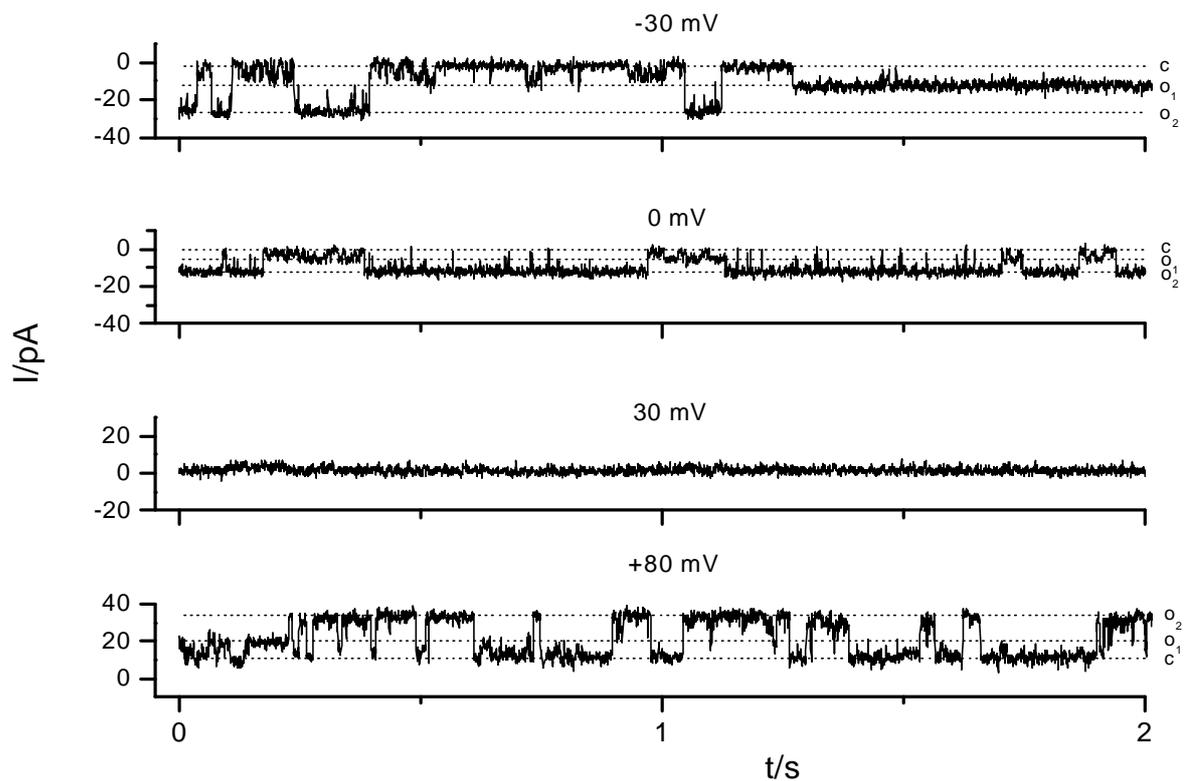


Abb. 3.17 Stromverlauf durch CIMCC1 bei verschiedenen Membranspannungen (Puffer 250 mM KCl *cis*, 20 mM KCl *trans*). Der Geschlossenzustand (c) und die Offenzustände (o1, o2) sind markiert.

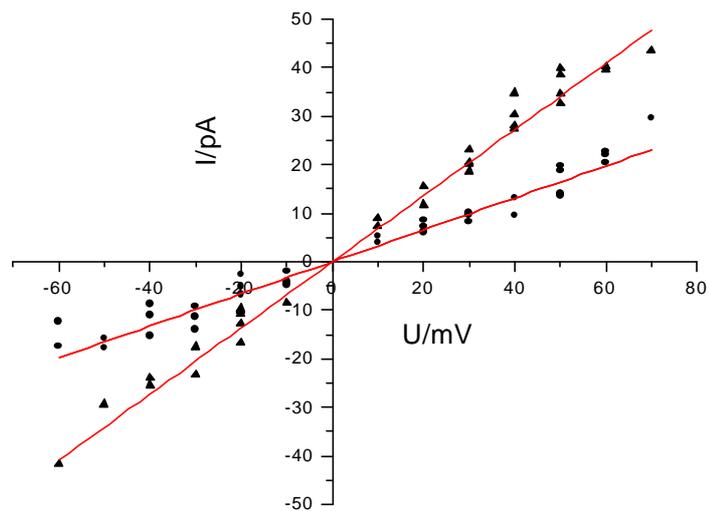


Abb. 3.18 Strom-Spannungs-Diagramm von CIMCC1 bei symmetrischen Pufferbedingungen (250 mM KCl). Aufgetragen sind die Ströme aus 5 Messungen durch beide Offenzustände. Als Leitwerte ergeben sich 680 ± 13 pS für den Hauptleitwert und 330 ± 12 pS für den Unterleitwert.

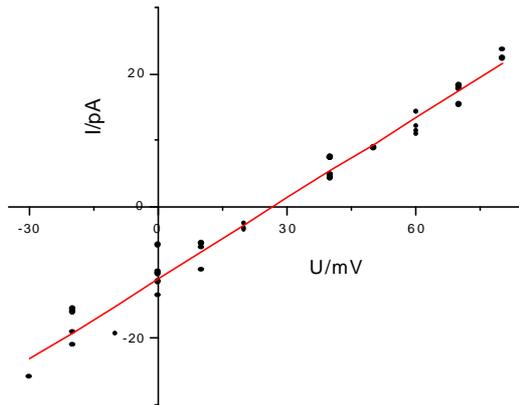


Abb. 3.19 Strom-Spannungs-Diagramm bei asymmetrischen Pufferbedingungen (250 mM KCl *cis*, 20 mM *trans*). Aufgetragen sind die Ströme durch den Hauptleitwert von jeweils 6 Messungen. Durch lineare Annäherung der Daten ergibt sich für den Kanal ein Umkehrpotential von 27 ± 1 mV

gen unter asymmetrischen Pufferbedingungen (250 mM KCl *cis*/20 mM KCl *trans*). Es ist deutlich zu erkennen, dass der Kanal zwei verschiedene Offenzustände einnimmt.

Da zwischen den verschiedenen Offenzuständen und dem Geschlossen-Zustand direkte Durchschaltereignisse zu beobachten waren, handelt es sich hierbei höchst wahrscheinlich um zwei Leitwerte desselben Kanals.

3.4.1.1 Leitwerte und Selektivität

Abb. 3.18 zeigt das Strom-Spannungs-Diagramm des Kanals in symmetrischer Elektrolytlösung (250 mM KCl). Für beide Offenzustände zeigte sich im Bereich von -60 mV bis $+60$ mV ein linearer Zusammenhang zwischen Strom und Spannung. Die beiden Leitwerte ergeben sich zu 680 ± 13 pS für den Hauptleitwert und 330 ± 12 pS für den Unterleitwert.

Aus dem Strom/Spannungsdiagramm des Hauptleitwerts (Abb. 3.19) ergibt sich ein Umkehrpotential von 27 ± 1 mV (Pufferbedingungen: 250 mM KCl *cis*/20 mM KCl *trans*). Dieses entspricht einem Permeabilitätsverhältnis P_K/P_{Cl} von 3.5. Der Kanal ist somit mäßig selektiv für

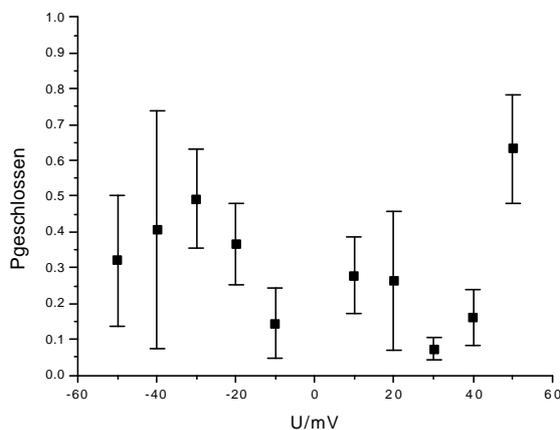


Abb. 3.20 Wahrscheinlichkeit des Geschlossen-Zustands von CIMCC1 in Abhängigkeit von der Membranspannung. Die Daten stammen aus sechs unabhängigen Messungen.

Kationen.

3.4.1.2 Offenwahrscheinlichkeit

Um die Offenwahrscheinlichkeit zu bestimmen, wurde nach (2.4.4.4) die Wahrscheinlichkeit des Geschlossen-Zustands ermittelt (Abb. 3.20). Als Messpuffer wurde 250 mM KCl symmetrisch verwendet. Die Wahrscheinlichkeit, dass der Kanal sich im geschlossenen Zustand befindet, ist über den gemessenen Spannungsbereich in etwa konstant und beträgt ca. 0.3. Die Wahrscheinlichkeit, dass der Kanal einen der beiden Offenzustände annimmt, liegt somit bei 70 %.

3.4.1.3 Effekt von Troe33

Bei den Versuchen zum Effekt des Transitpeptids Troe33 auf CIMCC1 wurden bezüglich der Puffer asymmetrische Messbedingungen (250 mM KCl *cis*/ 20 mM KCl *trans*) gewählt. Das Peptid wurde auf der *trans*-(Niedrigsalz-)Seite zugeben.

Eine Zugabe von Troe33 hatte keinen oder nur einen sehr geringen Effekt auf den Kanal. Bei der Applikation von Spannungsrampen (0 bis 110 mV, Daten nicht gezeigt) ergab sich bei einer Troe33-Konzentration von 170 nM keine (n=4), bei einer Peptidkonzentration von 340 nM nur eine sehr schwache (n=3) Änderung des Gesamtstromes durch den Kanal im Vergleich zu der Kontrolle.

3.4.2 Charakterisierung von CIMCC2

Abb. 3.21 zeigt repräsentative Stromverläufe durch den Kanal bei verschiedenen Spannungen unter symmetrischen Pufferbedingungen (250 mM KCl). Bei höheren positiven oder negativen Potentialen erfolgte ein verstärktes Schließen der Kanäle. Das Schaltverhalten war eher langsam, ein schnelles Flickern war fast nie zu beobachten.

3.4.2.1 Selektivität und Leitwert

Abb. 3.22 (rechts) zeigt eine Spannungsrampe an einem Bilayer mit mehreren Kanälen bei asymmetrischen Pufferbedingungen (250 mM KCl *cis*/ 20 mM KCl *trans*). Der Kanal ist Kationen-selektiv und besitzt ein Umkehrpotential von 34 ± 1.6 mV (n=4). Das hieraus errechnete Permeabilitätsverhältnis für Kalium- zu Chloridionen ist $P_K/P_{Cl} = 5.3$.

In Abb. 3.22 (links) ist das Strom-Spannungs-Diagramm der Einzelkanalströme durch den

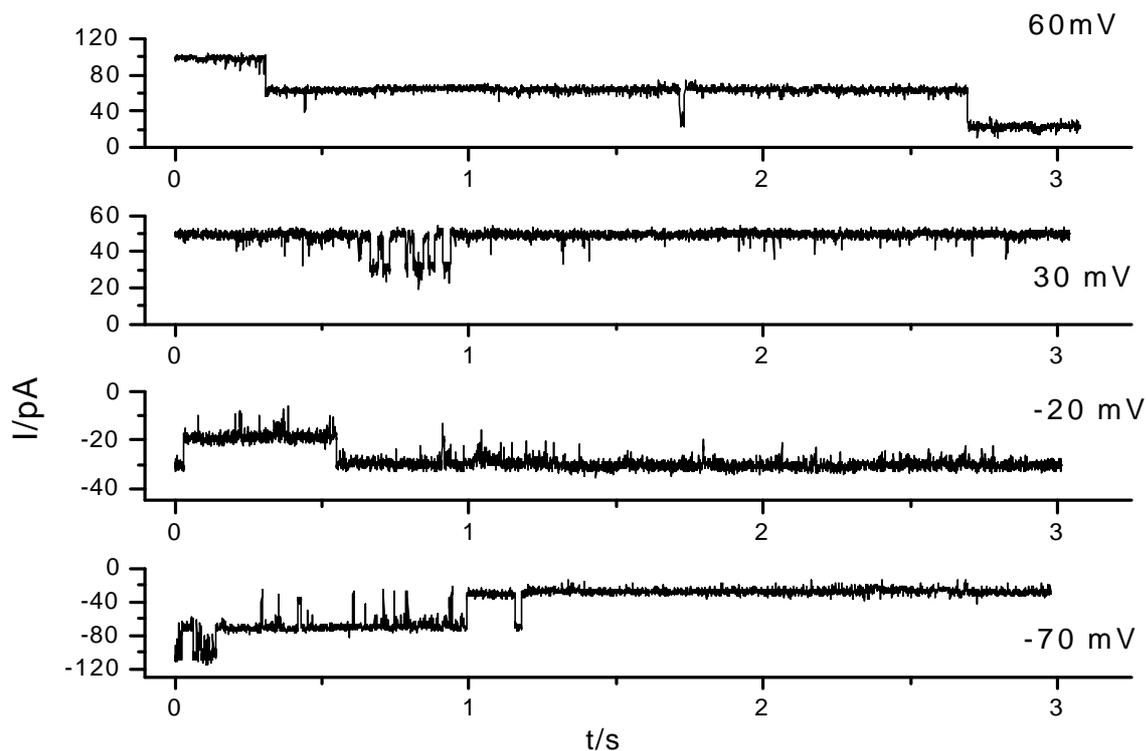


Abb. 3.21 Beispielspuren des Stromes durch mehrere Kopien von CIMCC2 bei verschiedenen Membranspannungen (Pufferbedingungen: 250 mM KCl symmetrisch).

Kanal dargestellt (Messbedingungen 250 mM KCl symmetrisch). Im gemessenen Spannungsbereich ist die Beziehung linear, der Kanal besitzt unter diesen Messbedingungen einen Einzelkanalleitwert von 600 ± 8 pS.

3.4.2.2 Einfluss von Troe33 auf den Kanal

Bei den Versuchen zum Effekt des Transitpeptids Troe33 auf CIMCC2 wurden bezüglich der Puffer asymmetrische Messbedingungen (250 mM KCl *cis*/ 20 mM KCl *trans*) gewählt. Das Peptid wurde auf der *trans*-(Niedrigsalz-) Seite zugegeben.

Abb. 3.23 zeigt, dass Troe33 einen spannungsabhängigen Block des Kanals hervorruft. Er äußert sich bei höheren positiven Spannungen in einer Verringerung der Offenwahrscheinlichkeit, was zu einer Reduzierung des Gesamtstromes durch die Kanäle führt.

Bei einer Peptidkonzentration von 340 nM sind die Kanäle ab einer angelegten Spannung von ca. 40 mV fast komplett geschlossen ($n=3$). Berechnet man, wie schon unter 3.3.3.4 beschrieben, die relative Reduktion des Gesamtstromes (Bereich 90-110 mV) durch das Peptid, so ergibt

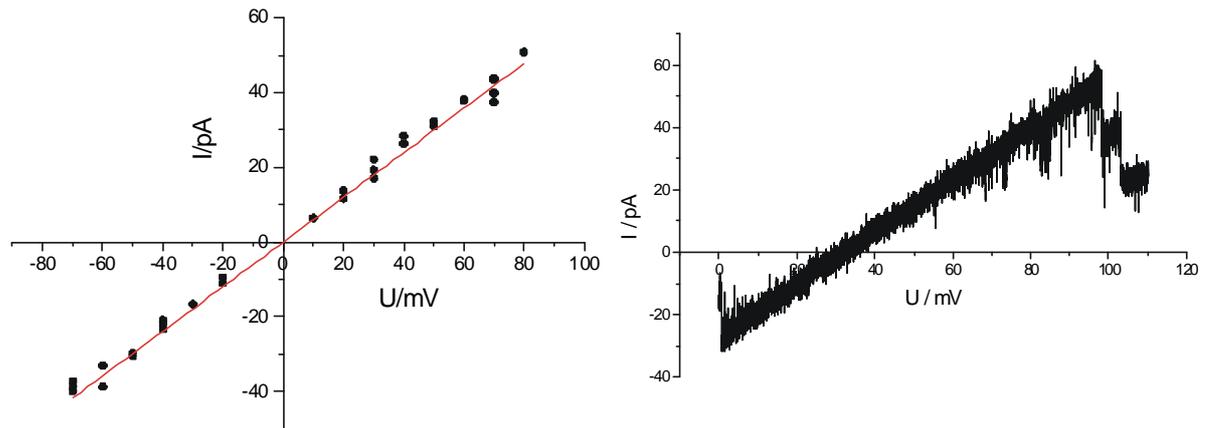


Abb. 3.22 Links: Strom-Spannungs-Diagramm von CIMCC2 bei symmetrischen Pufferbedingungen (250 mM KCl). Aufgetragen sind die Ströme von drei Messungen. Der Kanal besitzt einen Leitwert von 600 ± 8 pS.

Rechts: Selektivität von CIMCC2. Dargestellt ist eine Spannungsrampe durch mehrere Kopien des Kanals unter asymmetrischen Pufferbedingungen (250 mM KCl *cis*, 20 mM KCl *trans*).

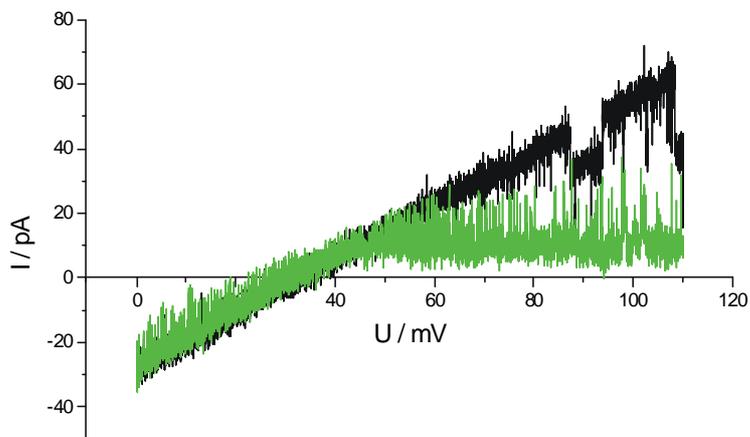


Abb. 3.23 Effekt von Troe33 auf CIMCC2. Dargestellt sind Spannungsrampen unter asymmetrischen Pufferbedingungen (250 mM KCl *cis*, 20 mM KCl *trans*). Schwarz: Kontrolle, grau: 340 nM Troe33 *trans*. Das Peptid verursacht einen spannungsabhängigen Block des Kanals.

sich eine Stromreduktion von 70 ± 10 %.

4 Diskussion

4.1 Putative Kaliumkanäle in Chloroplasten und Cyanobakterien

Im Genom von *Synechocystis* sp. PCC6803 und *Arabidopsis thaliana* konnten Gene lokalisiert werden, die für potentielle Kaliumkanäle codieren, wobei das *A. thaliana*-Genprodukt wahrscheinlich eine chloroplastidäre Lokalisation hat. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen beider Gene enthalten das für die Kaliumkanal-P-Region typische AS-Konsensusmotiv TVGYGD, wobei im Falle des *Synechocystis*-Genproduktes zwei AS konservativ ausgetauscht sind (resultierende Sequenz TVGFGE). Für die Funktion als potentieller Kaliumkanal sind diese Austausche aber wahrscheinlich ohne Bedeutung. Die Aminosäuren GYG in der Konsensussequenz werden für die Kalium-Selektivität verantwortlich gemacht (Heginbotham *et al.*, 1994; Navarro *et al.*, 1996), eine Substitution von GYG nach GFG bei verschiedenen Kaliumkanälen bewirkte aber keine Änderung dieser Selektivität (Heginbotham *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 1997; Splitt, 2000). Die AS nach der GYG-Sequenz dient der Ausbildung einer Salzbrücke (Doyle *et al.*, 1998; Splitt, 2000), was durch den Austausch von Aspartat zu Glutamat nicht wesentlich beeinträchtigt werden sollte.

Der putative Chloroplasten-Kaliumkanal (ohne Transitsequenz) besitzt ein ungefähres Molekulargewicht von 67 kDa. Dieses steht in recht guter Übereinstimmung mit einem in der inneren Chloroplasten-Hüllmembran gefundenen Protein mit einer elektrophoretischen Mobilität (SDS-PAGE) von 62 kDa. Dieses immunoreagiert mit Antikörpern gegen die Kaliumkanal-Porenregion und stellt wahrscheinlich auch funktionell einen Kaliumkanal dar (Mi *et al.*, 1994).

Das abgeleitete Genprodukt aus *A. thaliana* besitzt wahrscheinlich sechs transmembrane, α -helikale Domänen und ähnelt somit den spannungsgesteuerten Kaliumkanälen des Shaker-Typs. Durch die Bindestelle für zyklische Nukleotide am C-terminalen Ende bestehen weiterhin Ähnlichkeiten zu zyklisch-nukleotid-gesteuerten Kanälen. Allerdings besitzen auch spannungsgesteuerte Kaliumkanäle (z.B. Eag, Akt1, Kat1) ein solches cNMP-Bindemotiv. Bei diesen Kanälen ist eine regulatorische, aber keine ausschließlich aktivierende Funktion dieser Nukleotide nachgewiesen worden (Bruggemann *et al.*, 1993; Gaymard *et al.*, 1996; Hoshi, 1995).

Der vermutete *Synechocystis*-Kaliumkanal läßt sich in die Gruppe der 2TM-Kanäle einordnen, er besitzt zwei transmembrane Domänen, die die Porenregion flankieren. Der N-Terminus ist relativ kurz, eine N-terminale Signalsequenz ist offensichtlich nicht vorhanden.

Das Protein besitzt auf Grund seiner vorhergesagten Sekundärstruktur Ähnlichkeiten zu KcsA,

dem bisher einzigen auf molekularer Ebene charakterisierten bakteriellen Kaliumkanal (Schrempf *et al.*, 1995). Aufgrund des sehr langen C-Terminus bestehen ebenfalls Ähnlichkeiten zu tierischen einwärts-gleichrichtenden (IRK) Kaliumkanälen.

4.1.1 Expression der Proteine

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das für den potentiellen *Synechocystis*-Kaliumkanal codierende Gen aus genomischer DNA amplifiziert und jeweils als His-Tag Fusionsprotein in Vektoren zur Expression in *E. coli* und in Baculovirus-infizierten Insektenzellen kloniert.

Es war nicht möglich, mit dem in dieser Arbeit verwendeten *E.coli*-Expressionssystem nachweisbare Mengen des entsprechenden Proteins zu exprimieren. Eine Variation der Expressionstemperatur zeigte keine Verbesserung. Um zu überprüfen, ob das Protein entweder sehr schnell nach der Translation wieder abgebaut wird, oder erst viel später als erwartet produziert wird, wurden induzierte Zellen nach 30 min und 16 Stunden untersucht, ohne jedoch eine Expression festzustellen. Ein Abbau der mRNA, der die Genexpression verhindern könnte, ist unwahrscheinlich (Novagen, 1995); auch sind für *E.coli* seltene Codons in der zu exprimierenden cDNA nicht zu finden. Deshalb sind die wahrscheinlichen Ursachen für die fehlgeschlagene Expression des Zielproteins entweder eine Interaktion des Genproduktes mit der Expressionsmaschinerie oder eine Sekundärstruktur der mRNA, die die Bindung der Ribosomen und/oder der RNA-Polymerase behindert (Novagen, 1995).

In Insektenzellen konnte eine Überexpression eines Proteins erzielt werden, welches ungefähr die vorausgesagte Größe hatte. Dieses Protein konnte mit einem Anti-Penta-His-Antikörper nachgewiesen werden. Der Antikörper erkennt zwar nur den N-Terminus des Proteins, trotzdem zeigt dieser Nachweis, dass mit einiger Sicherheit das erwartete Protein überexprimiert wurde. Die cDNA, die für den angenommenen *A. thaliana* Chloroplasten-Kaliumkanal codiert, wurde uns, kloniert in einen Baculovirus-Transfervektor (ohne den für die Transitsequenz codierenden Bereich), zur Verfügung gestellt. In Sf21-Insektenzellen ließ sich ein Protein mit der erwarteten Größe überexprimieren. Da kontroll-infizierte Zellen kein Protein dieser Größe zeigten, wurde höchstwahrscheinlich das erwartete Protein exprimiert.

Erwartungsgemäß konnten beide putativen Kaliumkanäle in der Gesamt-Membran-Fraktion der Insektenzellen nachgewiesen werden, eine genauere Bestimmung auf biochemischem Weg wurde nicht vorgenommen. Der Großteil des Proteins ist wahrscheinlich in inneren Membranen (beispielsweise der Membran des Endoplasmatischen Retikulums) enthalten. Bei der Expression von Kanalproteinen in Insektenzellen wurde eine Lokalisation des Proteins in inneren

Membranen sehr häufig beobachtet (Gaymard et al., 1996; Stauffer et al., 1991; Klaiber et al., 1990).

4.1.2 Patch-Clamp-Messungen

Zur elektrophysiologischen Charakterisierung der putativen Kaliumkanäle wurden Messungen mittels der Patch-Clamp-Technik, zunächst in der 'Whole-Cell'-Konfiguration, an entsprechend infizierten Insektenzellen durchgeführt. Unter keiner der verwendeten Messbedingungen konnten spannungsaktivierbare Ströme durch die Zellmembranen der mit den beiden verschiedenen Baculoviren infizierten Insektenzellen registriert werden. Ströme, die auf das Vorhandensein von gleichrichtenden Ionenkanälen hindeuteten, konnten ebenfalls nicht detektiert werden. Konnten schon bei kleinen Membranspannungen Ströme gemessen werden, so handelte es sich in allen Fällen um Leckströme, da diese nicht selektiv waren und zu positiven wie negativen Potentialen gleich stark auftraten. Messungen in der 'Excised-Patch'-Konfiguration zeigten ebenfalls keine Kanalaktivität, die sich auf die rekombinanten Proteine zurückführen ließ.

Da der putative Chloroplasten-Kaliumkanal Ähnlichkeiten zu zyklisch-nukleotid-gesteuerten Ionenkanälen besitzt, wurden 'Whole-Cell'-Messungen mit cAMP und cGMP in der Pipettenlösung durchgeführt. Es konnten jedoch auch bei diesen Messungen keine durch das exprimierte Protein getragenen Ströme registriert werden. Bei Messungen in der 'Excised-Patch'-Konfiguration konnte auch nach Perfusion des Patches mit zyklischen Nukleotiden keine Kanalaktivität festgestellt werden.

Die Patch-Clamp-Messungen zeigten, dass nach der Expression der beiden Proteine in Insektenzellen keine aktiven Kanäle in der Plasmamembran zu finden waren. Ursache hierfür könnte ein fehlerhaftes Targeting sein, was im Falle des angenommenen Chloroplasten-Kaliumkanals sehr wahrscheinlich ist, da sich am N-Terminus keine Transitsequenz mehr befindet. Ein Oligonukleotid, welches für eine Signalsequenz codiert (beispielsweise aus einem *Drosophila*-Plasmamembranprotein), könnte, wenn es im selben Leseraster N-terminal des Zielgenes (anstelle des His-Tags) eingesetzt wird, dazu führen, dass das Protein zur Plasmamembran der Insektenzellen transportiert wird. Auf diese Weise könnte der putative Chloroplasten-Kaliumkanal einer elektrophysiologischen Charakterisierung mittels der Patch-Clamp-Technik zugänglich gemacht werden

Die Primärsequenz des putativen *Synechocystis*-Kaliumkanals wurde mittels des PSORT-WWW-interfaces (Human Genome Center, IMS, U. Tokyo) untersucht, um Hinweise auf die

zelluläre Lokalisation des Proteins zu erhalten. Das Genprodukt besitzt demnach keine N-terminale Signalsequenz (von Heijne, 1986; Nakai und Kanehisa, 1991), wird aber, wahrscheinlich aufgrund seiner Hydrophobizität, der inneren Membran zugeordnet. Allerdings werden bei diesen Voraussagen die Thylakoidmembranen in Cyanobakterien außer acht gelassen. Die Lokalisation des Proteins in *Synechocystis* und davon abgeleitete Voraussagen der Lokalisation in den Insektenzellen bleibt also sehr unsicher. Höchstwahrscheinlich wird das Genprodukt bei der heterologen Expression nicht als Plasmamembranprotein erkannt und verbleibt in inneren Membranen.

Es wurde zwar schon beschrieben, dass die Sortiermaschinerie der Insektenzellen durch große Mengen überexprimierten Proteins stark beeinträchtigt wird (Pajot-Auguy, 1995), und die Proteine deshalb nicht zur Plasmamembran transportiert werden können. Dieses ist aber als alleinige Ursache für die fehlende Kanalaktivität in der Membran unwahrscheinlich, da schon ca. 100 Proteine in der Plasmamembran ausreichen würden, um bei 'Whole-Cell'-Messungen einen Strom zu registrieren.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass das Protein funktionell in der Cytoplasma-Membran vorhanden ist, aber bisher noch nicht identifizierte Substanzen zur Aktivierung des putativen Kanals notwendig sind. Aufgrund seiner Ähnlichkeit zu einwärts-gleichrichtenden Kaliumkanälen und deren vielfältigen Regulationsmöglichkeiten könnten zum Beispiel second-Messenger oder eine Phosphorylierung bei der Aktivierung eine Rolle spielen.

4.1.3 Reinigung

Für weiterführende Experimente sollten die beiden putativen Kaliumkanäle solubilisiert und gereinigt werden. Die Proteine ließen sich unter Verwendung von nicht-ionischen Detergentien (TritonX-100 bzw. Dodecylmaltosid) aus den Membranen der Insektenzellen lösen, die Solubilisierungsausbeute lag in beiden Fällen bei ca. 30-50%. Da beide Genprodukte N-terminal mit sechs Histidinen fusioniert waren, wurde jeweils eine Reinigung mittels Ni-chelatierender Agarose durchgeführt. Die Ausbeuten waren unterschiedlich, der putative Chloroplasten-Kaliumkanal zeigte nur eine sehr schwache Bindung und konnte somit nicht in Mengen gereinigt werden, die eine weitere Charakterisierung zuließen. Wahrscheinlich war der His-Tag nur sehr eingeschränkt zugänglich, was an der Sekundärstruktur des Proteins in Kombination mit dem verwendeten Detergens (Dodecylmaltosid) liegen könnte. Solubilisierung mit einem anderen Detergens oder die Verlagerung des His-Tags an den C-Terminus könnte in diesem Fall Abhilfe schaffen. Eine Denaturierung mit Harnstoff könnte ebenfalls die Zugänglichkeit des His-Tags

verbessern, würde aber wahrscheinlich die Funktion des Proteins zu stark beeinträchtigen. Der putative *Synechocystis*-Kaliumkanal konnte nach Solubilisierung mit TritonX-100 gereinigt werden. Die Ausbeute der Reinigung war ausreichend für eine Rekonstitution in Liposome, die für weitere Experimente eingesetzt wurden.

4.1.4 Bilayer-Messungen

Der gereinigte und rekonstituierte putative *Synechocystis*-Kaliumkanal wurde mittels der Bilayer-Methode untersucht. Unter Standard-Messbedingungen (250 mM KCl *cis*, 20 mM KCl *trans*) zeigte sich jedoch keine Kanalaktivität, eine Erhöhung des Ionengradienten, der wichtig für die Fusion von Proteoliposomen mit der künstlichen Membran ist (Cohen *et al.*, 1980), zeigte keinen Erfolg.

Wichtig für die Fusion von Proteoliposomen mit dem Bilayer ist auch eine von Null verschiedene Offenwahrscheinlichkeit der in den Liposomen enthaltenen Poren, ohne ein angelegtes Membranpotential (Woodbury und Hall, 1988). Vom Kaliumkanal KcsA von *Streptomyces lividans* ist bekannt, dass er im sauren pH-Bereich öffnet, bei pH 7 aber geschlossen ist (Cuello *et al.*, 1998; Meuser, 2000). Um eine pH-Abhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit des putativen *Synechocystis*-Kanals zu untersuchen, wurden für weitere Messungen sowohl saure (pH 4) als auch basische (pH 9) Messpuffer verwendet. Diese veränderten Messbedingungen führten allerdings ebenfalls nicht zu einer Detektion von Kanälen.

Die elektrophysiologischen Messungen zeigten, dass nach Rekonstitution des putativen *Synechocystis*-Kaliumkanals kein aktives Protein in den Proteoliposomen vorhanden war. Möglicherweise liegt es zwar in seiner richtigen Konformation vor, ist aber dauernd geschlossen. Eventuell fehlt eine Substanz, die zur Aktivierung wichtig ist (siehe auch unter 4.1.2).

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass der putative Kanal nicht in seiner nativen Struktur in die Liposomen rekonstituiert wurde. Falls beispielsweise das Protein durch das verwendete Detergens partiell denaturiert wurde, könnte ein anderes Detergens Abhilfe schaffen.

4.2 Tic110

4.2.1 Grundlegende Eigenschaften und Sekundärstruktur

Tic110 zeigt keine Sequenzähnlichkeit zu bekannten, an der Translokation von Proteinen beteiligten Proteinen. Das Protein ist amphiphil, es enthält nur einen kleinen Anteil hydrophober AS (36%), dafür einen hohen Prozentsatz polare und geladener AS (23 bzw. 33%). Über die Sekundärstruktur gibt es bisher nur wenige Hinweise. Aufgrund der Sensitivität für Proteasen und der geringen Hydrophobizität wurde angenommen, dass das Protein eine sehr große, C-terminale Domäne besitzt, die im Stroma lokalisiert ist (Jackson *et al.*, 1998). Die N-terminalen 30-36 kDa des Proteins wurden als Membrananker mit ein oder zwei α -Helices vorgeschlagen, da dieser Bereich Protease-insensitiv ist und (im Vergleich zum übrigen Protein) eine höhere Hydrophobizität besitzen (Kessler und Blobel, 1996; Lübeck *et al.*, 1996).

Das im Rahmen dieser Arbeit aufgenommene CD-Spektrum an rekombinantem Tic110 zeigte hingegen, dass das Protein einen hohen Anteil (>50 %) an β -Faltblättern und nur einen geringen α -helikalen Anteil (<10 %) enthält. Dieses Ergebnis wird gestützt von einer Sekundärstrukturvorhersage, die bekannte Sekundärstrukturen von Proteinen in die Berechnung mit einbezieht (Gilbert, 1992). Diese sagt einen β -Faltblatt-Anteil von >80 % und einen α -helikalen Anteil von etwa 12 % voraus.

Die Daten aus dem CD-Spektrum und der Sekundärstrukturvorhersage legen nahe, dass der vermutete N-terminale Membrananker aus einer β -Faltblatt-Struktur oder einer gemischten Struktur aus β -Faltblättern und α -Helices besteht. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass es neben den bisher angenommenen Membranbereichen weitere kürzere transmembrane Durchgänge in Form von β -Faltblättern in der C-terminalen Domäne gibt.

Die β -Faltblätter könnten die Struktur eines β -Barrels ausbilden, der typischen Struktur von bakteriellen Porinen (Bainbridge *et al.*, 1998; Jap und Walian, 1996). Ein solches β -Barrel besteht in der Regel aus 16-18 antiparallelen β -Faltblättern und bildet eine sanduhrförmige Struktur mit einer Verengungszone in der Mitte. Es reichen aber auch nur acht β -Faltblätter aus, um eine β -Barrel-Pore zu bilden, wie zum Beispiel bei den Porinen OprF aus *Pseudomonas aeruginosa* (Nikaido *et al.*, 1991) und OmpA aus *E. coli* (Sugawara und Nikaido, 1992). Bezogen auf Tic110 könnten verschiedene Bereiche des Proteins an der Bildung einer solchen Pore beteiligt sein, es würde aber genügen, wenn nur der N-terminale Bereich zur Bildung der Pore beiträgt.

Typisch für Porine und Poren mit ähnlicher β -Barrel-Struktur, wie beispielsweise dem VDAC

aus Mitochondrien (Dolder *et al.*, 1999, Manella *et al.*, 1997; Guo *et al.*, 1995), ist auch eine für Membranproteine uncharakteristisch geringe Hydrophobizität mit einem hohen Anteil (>50%) an hydrophilen AS, wie sie auch das Tic110 aufweist. Bemerkenswert ist auch, dass diese und andere Poren mit vorausgesagter β -Barrel-Struktur, beispielsweise aus der äußeren Chloroplasten-Hüllmembran, keinerlei Sequenzähnlichkeiten auf Aminosäureebene zueinander aufweisen.

4.2.2 Leitwert und Porengröße

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das rekombinant in *E. coli* exprimierte Tic110 nach Rekonstitution in Liposomen eine Kationen-selektive Pore bildet, die sich mit dem Bilayer-System charakterisieren ließ. Der Leitwert des Einzelkanals beträgt 446 pS in 250 mM KCl. Er ist somit relativ groß, verglichen mit den Leitwerten typischer Kationen-selektiver Kanäle (Kalium-, Natrium- und Calcium-Kanäle), die Einzelkanalleitwerte von 10 bis 50 pS (bei Salzkonzentrationen von ca. 100 mM) aufweisen (Hille, 1992, Kap. 12). Nur die Kaliumkanäle der Maxi-K-Gruppe, deren Aktivierung Calcium- und spannungsabhängig ist, weisen einen ähnlich hohen Leitwert (200 pS in 100 mM KCl) auf (Peracchia, 1994, s. 79).

Der Leitwert von Tic110 ist vergleichbar mit denen von Porinen der äußeren Bakterien-Hüllmembran, beispielsweise OmpC von *E. coli* (410 pS in 300 mM KCl; Buehler *et al.*, 1991) und Omp32 von *Comamonas acidovorans* (ca. 300 pS in 300 mM; Mathes und Engelhardt, 1998). Weiterhin entspricht der gemessene Leitwert recht gut dem von Toc75 (452 pS in 250 mM KCl), der Proteinimportpore der äußeren Chloroplasten-Hüllmembran (Hinnah, 1999) und dem von OEP16 (330 pS in 250 mM KCl), einem Porin in derselben Membran (Steinkamp, 2000). Einen vergleichbaren Leitwert weist auch Tom40 auf (360 pS in 250 mM KCl), die Proteinimportpore in der äußeren Mitochondrien-Hüllmembran (Hill *et al.*, 1998).

Die Größe der durch Tic110 gebildeten Pore wurde mittels Leitwertmessungen in Anwesenheit von Nichtelektrolyten bestimmt. In der ursprünglich von Krasilnikov *et al.* (1992) entwickelten Methode ergibt sich aus den Daten ein einziger Porenradius, der unter der Annahme, dass die Pore aus nur einem Zylinder besteht, aus den gewonnenen Daten ermittelt wird. Dies ist aber eine zu grobe Vereinfachung, denn im Allgemeinen geht man davon aus, dass ein Kanal eine Verengungszone aufweist, die von zwei Vorhöfen flankiert wird (Hille, 1992). Für Tic110 erfolgte die Auswertung der Leitwertmessungen nach Smart *et al.* (1997), bei der diesem Umstand Rechnung getragen wird. Die Methode wurde dabei so erweitert, dass sich aus den Messdaten ansatzweise Rückschlüsse auf die Geometrie der vermessenen Pore ziehen lassen.

Der minimale Durchmesser (Verengungszone) von Tic110 beträgt demnach etwa 15 Angström, der maximale Durchmesser (entsprechend dem mittleren Durchmesser der Vorhöfe) beträgt ungefähr 34 Angström.

Die hier bestimmten Porenradien sind sicherlich nur sehr grobe Werte, denn der effektive Porenradius eines Kanals wird nicht nur von seiner Geometrie, sondern auch von den Ladungen und somit dem elektrischen Feld im Kanal bedingt (Chen und Eisenberg, 1993; Eisenberg, 1996). Es konnte sogar gezeigt werden, dass Änderungen am Ladungszustand eines Kanals Auswirkungen auf die Permeation von Nicht-Elektrolyten durch den Kanal hatten. Ursache hierfür ist wahrscheinlich eine Beeinflussung der Hydratation dieser Substanzen durch Ladungen in der Pore.

Der für Tic110 berechnete Porendurchmesser ist größer als der unspezifischer Porine, die einen Durchmesser von 9-10 Angström in der Verengungszone aufweisen (Jap und Walian, 1996). Die für Tic110 berechnete Porengröße steht aber in recht guter Übereinstimmung zu den Porendurchmessern von Proteinimportkanälen. So wurden minimaler und maximaler Porendurchmesser von Toc75 zu 18 bzw. 46 Angström berechnet (Hinnah, 1999). Für Tom40 wurde mit verschiedenen Methoden (Leitwertmessungen, Elektronenmikroskopie) ein Durchmesser von 22-26 Angström bestimmt (Hill *et al.*, 1998; Kunkele *et al.*, 1998). Der Durchmesser der Pore des sec61p-Komplexes des ER wurde elektronenmikroskopisch zu ca. 20 Angström bestimmt (Hanein *et al.*, 1996), er erhöht sich bei Durchtritt einer Polypeptidkette auf 40-60 Angström (Hamann *et al.*, 1997).

Aufgrund der Porengröße von Tic110 kann geschlossen werden, dass dieses Protein die Translokation von Präproteinen durch die innere Chloroplasten-Hüllmembran zulassen kann. Bei einem engsten Durchmesser von 15 Angström wäre es sogar noch möglich, den Durchtritt einer α -Helix (Durchmesser je nach Seitenketten 7-13 Angström) durch den Kanal zu ermöglichen.

4.2.3 Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit

Das rekombinante Tic110 zeigt eine hohe Offenwahrscheinlichkeit bei geringen Membranspannungen, die bei höheren positiven und negativen Potentialen abnimmt. Dieses entspricht der typischen Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit von Porinen in der äußeren Bakterienmembran (Bishop und Lea, 1994; Berrier *et al.*, 1997). Der Offenwahrscheinlichkeitsverlauf entspricht auch dem von Tom40 (Hill *et al.*, 1998), OEP16 (Steinkamp, 2000), und Toc75 (Hinnah, 1999). Es wird angenommen, dass im Falle vom OEP16 und Toc75 der Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit *in vivo* keine Bedeutung zukommt (Steinkamp,

2000; Hinnah, 1999). Generell wird davon ausgegangen, dass diese Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit eine artifizielle, intrinsische Eigenschaft von Poren des β -barrel-Typs ist (Bainbridge *et al.*, 1998).

Im Falle des Tic110 wäre eine Regulation über die Membranspannung denkbar, da über der inneren Membran eine Potentialdifferenz von 110-120 mV (negativ im Stroma) anliegt (Wu *et al.*, 1991). Die Membranspannung könnte beispielsweise zu einem Schließen des Proteins (direkt nach dessen Import in den Chloroplasten) bis zur Assemblierung des Komplexes führen und würde so einen Stromfluss über die innere Membran verhindern. Da sich die Membranspannung aber nicht in einem so weiten Bereich ändert, wie dieses zum Beispiel bei erregbaren Membranen von Nervenzellen der Fall ist, ist eine weitergehende Regulation von Tic110 über die Membranspannung unwahrscheinlich.

Außerdem ist Tic110 in einen Multi-Proteinkomplex eingebunden, der sich über beide Hüllmembranen erstreckt, wodurch eine Beeinflussung der Spannungsabhängigkeit durch die anderen Proteine und das zu translozierende Präprotein denkbar ist.

Weitere Komponenten des Tic-Komplexes, aber auch stromale Faktoren, könnten bei der Regulation der Offenwahrscheinlichkeit eine Rolle spielen. Beim Proteinimport in das Endoplasmatische Retikulum wird beispielsweise die sec61-Pore vor und zu Beginn der Proteintranslokation durch das lumenale Protein Bip verschlossen (Hamann *et al.*, 1998).

4.2.4 Selektivität

Die durch das rekombinante Tic110 konstituierte Pore ist selektiv für Kationen, wobei Kalium im Vergleich zu Chlorid etwa zehnmal besser geleitet wird. Im Vergleich zu Kaliumkanälen, die weitestgehend impermeabel für Anionen sind (Gaymard *et al.*, 1996; Czempinsky *et al.*, 1997; Meuser, 2000), ist diese Selektivität nicht sehr stark ausgeprägt, allerdings ist sie angesichts des großen Porendurchmessers auffällig. Bakterielle Porine, die vergleichbare Porengrößen haben, sind im Allgemeinen mäßig selektiv für eine Ionensorte (OmpF und LamB aus *E. coli* leiten beispielsweise Kationen ca. viermal besser als Anionen), allerdings wurden auch Porine mit außerordentlich hoher Selektivität beschrieben, so zum Beispiel OmpC und das Porin K^+ (beide *E. coli*), die Kationen 26 bzw. 15 mal besser leiten als Anionen (Benz *et al.*, 1985). Für das Chloroplasten-Porin OEP16 ist eine Selektivität von Kalium zu Chlorid von 15 beschrieben (Steinkamp, 2000).

Die Proteinimportporen Tom40 und Toc75 sind ebenfalls kationenselektive Poren, Tom40 leitet Kalium etwa acht mal besser als Chlorid, bei Toc75 liegt das Permeabilitätsverhältnis $P_{\text{K}}/P_{\text{Cl}}$

bei 14.

Generell wird die Selektivität gegenüber Kationen oder Anionen primär über elektrostatische Interaktionen zwischen den Ionen und geladenen Gruppen innerhalb des Kanals bestimmt (Laio und Torre, 1999). Beispielsweise kann durch Mutation dieser geladenen und/oder polaren AS-Reste eine Änderung der Selektivität der Pore erreicht werden (Bauer et al., 1989; Galzi et al., 1992). Bei im Vergleich zu den permeierenden Ionen sehr großen Poren wird die Selektivität aber durch andere Mechanismen vermittelt, als bei den klassischen Kanälen (beispielsweise den Kaliumkanälen (Doyle *et al.*, 1998)). Bei bakteriellen Porinen begünstigen die in der Pore gelegenen Ladungen offensichtlich unterschiedliche Durchtrittswege und somit verschiedene Permeabilitäten für Anionen bzw. Kationen (Schirmer und Phale, 1999).

Die während dieser Arbeit erhobenen Daten lassen keine Rückschlüsse zu, an welcher Stelle der durch Tic110 konstituierten Pore selektivitätsbestimmende Ladungen liegen. Mögliche Orte dieser Ladungen, die sich aus den für bakteriellen Porinen bekannten Strukturmerkmalen ergeben, sind sowohl die Verengungszone als auch der Rand der Pore (Cowan *et al.*, 1992; Jap und Walian, 1996; Karshikoff *et al.*, 1994)

Die Funktion der Kationen-Selektivität des Proteins *in vivo* könnte in einer Interaktion mit den Transitpeptiden liegen, die eine positive Nettoladung tragen (Von Heijne, 1989). Denkbar wäre ein Ablauf des Proteintransports über die Chloroplasten-Hüllmembran ähnlich dem, wie er für den Proteintransport in Mitochondrien postuliert wird. Laut dieser ‚Acid-Chain-Hypothese‘ (Komiya *et al.*, 1998; Schatz, 1997) werden die Präproteine durch Bindung an negativ geladene Bindungsstellen steigender Affinität (zum Stroma hin) über die Membranen transportiert. Dabei spielt neben Rezeptordomänen im Cytosol bzw. Intermembranraum auch die Pore (Tom40) selbst eine Rolle (Rapaport *et al.*, 1997). Da Tic110, wie Tom40, selektiv für Kationen ist, könnten in der Pore positionierte, negativ geladene Aminosäure-Seitenketten eine Rolle in der Weiterleitung der Präproteine über die innere Membran spielen.

4.2.5 Einfluss von Troe33 auf Tic110

Troe33 verursacht einen Block der durch Tic110 gebildeten Pore. Das Peptid wirkt schon im Konzentrationsbereich von wenigen 100 nM. Der Block ist abhängig von der angelegten Membranspannung und äußert sich in dem verstärkten Auftreten von Schaltereignissen. Dies ist typisch für einen mittelschnellen Block (Hille, 1992, Kap. 15), bei dem die blockierende Substanz Dissoziationskonstanten im ms-Bereich besitzt. Die auftretenden Schließ- bzw. Öffnungsereignisse würden dann jeweils einer Bindung bzw. Dissoziation des Peptids entsprechen.

Der Block tritt dann auf, wenn die Membranspannung so gerichtet ist, dass das Peptid in die Pore getrieben wird. Bei höheren Konzentrationen wird der blockierende Effekt stärker und setzt dann schon bei kleineren Membranpotentialen ein. Reduziert man die Membranspannung wieder auf den Ausgangswert (0 mV), so ist die Pore wieder geöffnet; der Block ist also vollständig reversibel.

Insgesamt ähnelt die Wirkung von Troe33 auf Tic110 der auf Toc75, die von Hinnah (1999) beschrieben wurde. Auch bezüglich dieses Proteins bewirkt das Präpeptid einen spannungsabhängigen Block, der bei Toc75 allerdings schon bei geringeren Konzentrationen (aber auch im nM-Bereich) einsetzt, und nicht vollständig reversibel ist.

Experimente mit Präpeptiden wurden auch bezüglich der Proteinimportpore der äußeren Mitochondrienmembran durchgeführt (Hill *et al.*, 1998). Hierbei bewirkte die Zugabe von Präpeptiden, allerdings im unteren μM -Bereich, das erhöhte Auftreten von Schalterereignissen (entsprechend einem verstärkten Schließen der Kanäle).

Die Art des Blocks von Tic110 legt nahe, dass das Peptid in der Kanalpore wirkt, da es nur dort dem elektrischen Feld über der Membran ausgesetzt ist (entsprechend dem Woodhull-Modell eines spannungsabhängigen Blocks (Hille, 1992, Kap. 15)). Es muss sich also durch dieses Feld bewegen, um seine Bindestelle zu erreichen, was sich in einer Spannungsabhängigkeit der Raten für Bindung und Ablösung niederschlägt. Anhand der für Tic110 ermittelten Porengröße ist auch das Eindringen von Troe33 in die Pore plausibel.

Allerdings kann eine allosterische Wirkung, also eine Bindung des Peptids an eine Bindestelle außerhalb der Pore, nicht ausgeschlossen werden. Wegen der Spannungsabhängigkeit des Blocks müsste diese Bindestelle aber in einer Art ‚Tasche‘, die in die Membran hineinreicht, lokalisiert sein.

Unklar ist, ob Troe33 nach seiner Dissoziation von der Bindestelle die Pore durchquert oder sie in die andere Richtung wieder verläßt. Ein Anzeichen für einen Transport wäre eine Verminderung des Blocks bei weiterer Erhöhung der Membranspannung (Hille, 1992, Kap. 15). Dieses wurde in den hier durchgeführten Experimenten nicht beobachtet. Allerdings setzt die Stabilität der künstlichen Membran hier den Experimenten eine natürliche Grenze, außerdem tritt bei höherer Membranspannung ein spannungsabhängiges Schließen der Poren auf, welches den Effekt des Blocks überlagert. Weiterhin wird der Block nur dann bei einer Spannungserhöhung wieder schwächer, wenn die blockierende Substanz die Pore schneller verläßt, als sie auf der anderen Seite eintritt.

Eine Klärung dieser Frage könnte auf biochemischem Wege, beispielsweise durch einen Proteintest in der *trans*-Kammer, erfolgen. Allerdings läge die Menge des transportierten

Proteins (bei angenommenen 10 Poren im Bilayer und einem Durchsatz von 100 Proteinen je s und Pore würden nach 1 Stunde ca. 0.05 pg transportiert) unterhalb der Nachweisgrenze gängiger Proteintests. Die Frage des Transports des verwendeten Peptids lässt sich also durch Messungen mit der Bilayer-Methode nicht beantworten.

Weiterhin nicht geklärt ist, ob Troe33 von beiden Seiten der Pore unterschiedlich stark wirkt. Es ist davon auszugehen, dass Tic110 nicht immer in derselben Orientierung in die Liposome rekonstituiert (und somit in den Bilayer inseriert) wird, da es vollständig denaturiert für die Rekonstitution verwendet wird. Ein Seitenunterschied bei der Wirkung des Peptids sollte sich also in einer unterschiedlich starken Ausprägung des Blocks bei verschiedenen Experimenten niederschlagen. Außergewöhnlich große Unterschiede zwischen einzelnen Messungen wurden bei den hier durchgeführten Experimenten nicht beobachtet, allerdings waren bei den Messungen immer mehrere Poren (>4) im Bilayer, was zu einer Mittelung der Peptideffekte auf das Protein führt. Weitere Experimente sind deshalb nötig, um hierüber Aufschluss zu geben.

Ebenfalls nicht geklärt ist die Art der Wechselwirkung von Troe33 mit Tic110. Da das Peptid bei pH 7 vier positive Ladungen trägt, könnte der Effekt aufgrund dieser Ladungen vermittelt werden. Allerdings könnte auch die Sekundärstruktur des Peptids (oder von Teilbereichen) Einfluss nehmen. Außerdem ist zu beachten, dass Troe33 auch noch eine Thylakoidzielsequenz enthält. Diese ist zwar für den Proteinimportkomplex der beiden Hüllmembranen ohne Belang, eine Wirkung dieses Abschnitts von Troe33 auf Tic110 kann aber nicht ausgeschlossen werden. Experimente mit Teilbereichen von Transitpeptiden oder mit durch Deletion mutierten Präpeptiden könnten hier weitere Erkenntnisse bringen. Für die Transitsequenz von Ferredoxin konnte zum Beispiel nachgewiesen werden, dass einzelne Teilbereiche der Sequenz verschiedene Rollen bei der Proteintranslokation spielen. So ist die N-terminale Domäne wichtig für die Bindung des Präproteins an den Toc-Komplex, während die weiter am C-Terminus der Präsequenz gelegenen AS eine Rolle bei der Interaktion mit dem Tic-Komplex spielen (Rensink *et al.*, 2000).

4.2.6 Mögliche Funktion von Tic110 *in vivo*

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Tic110 *in vitro* eine hydrophile, Kationen-selektive Pore konstituiert. Die Sekundärstrukturvorhersage, gestützt durch ein CD-Spektrum, sagt einen hohen Anteil an β -Faltblättern voraus. Tic110 könnte somit, im Gegensatz zu vorherigen Annahmen, eine Struktur ausbilden, die denen von bakteriellen Porinen bzw. denen von bisher charakterisierten, dem Proteinimport dienenden Poren, ähnelt. Die funktionellen Gemeinsamkeiten dieser Poren mit Tic110 stützen diese These.

Die *in vivo* Funktion von Tic110 könnte somit darin liegen, den Präproteinen ein hydrophile Umgebung zur Durchquerung der inneren Membran zu bieten. Die Selektivität für Kationen, hervorgerufen durch negative Ladungen in der Pore, könnte eine Rolle bei der Interaktion mit den positiv geladenen Präsequenzen und deren Weiterleitung über die Membran spielen. In Immunoprecipitationsexperimenten wurde Tic110 zusammen mit einem Präprotein und dem Chaperon cpn60 gefunden (Kessler und Blobel, 1996). Es wird zwar vermutet, dass die Interaktion des Präproteins mit Tic110 indirekt über das Chaperon erfolgt, eine direkte Interaktion wurde aber nicht ausgeschlossen.

Tic110 weist eine den Porinen ähnliche Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit auf, mit verstärktem Auftreten von Schließereignissen bei höheren Membranspannungen. Die über der inneren Chloroplasten-Hüllmembran anliegende Spannung könnte deshalb eine Rolle bei der Regulation dieses Proteins spielen.

Der Porendurchmesser von Tic110 ist groß genug, um den Durchtritt von noch teilweise gefalteten Proteinen zu erlauben. Es wird zwar davon ausgegangen, dass die Proteine vor dem Import in den Chloroplasten entfaltet werden (Schnell und Blobel, 1993; Endo *et al.*, 1994), allerdings konnte zumindest für ein kleineres Protein gezeigt werden, dass es im gefalteten Zustand über die Chloroplasten-Hüllmembranen transloziert wird (Clark und Theg, 1997).

Das rekombinante Tic110 wird, analog zu den Proteinimportporen Toc75 und Tom40, durch Präpeptide moduliert. Eine Wirkung findet schon bei geringen Konzentrationen (nM-Bereich) statt und kann somit als spezifisch bezeichnet werden. Da die eigentliche Erkennung der Transitsequenz der Präproteine durch den Toc-Komplex geschieht (Vothknecht und Soll, 2000), erscheint eine spezifische Interaktion von Komponenten des Tic-Komplexes mit dem Präpeptid auf den ersten Blick unnötig. Eine Erkennung der Präpeptide könnte aber eine Rolle bei der Interaktion zwischen den beiden Importkomplexen und bei der Weiterleitung der Proteine zum Tic-Komplex spielen. Es konnte gezeigt werden, dass in Anwesenheit eines Präproteins Tic und Toc-Komplex interagieren. Allerdings gibt es auch Hinweise auf eine Interaktion der beiden Komplexe ohne Präproteine, allerdings in geringerem Maße (Nielsen *et al.*, 1997).

In Patch-Clamp-Experimenten an isolierten Chloroplasten konnte ein Anionen-Kanal mit einem Leitwert von 50 pS (in 25/250 mM KCl) gefunden werden (van den Wijngaard und Vredenberg, 1997). Der Kanal wird der inneren Hüllmembran zugeordnet. Da seine Offenwahrscheinlichkeit durch Zugabe von Präproteinen ATP-abhängig reduziert wurde und der Kanal durch die Zugabe von Antikörpern gegen Tic110 schließt, wird diesem Kanal eine Rolle im Proteinimport und eine Assoziation mit Tic110 zugeschrieben (van den Wijngaard und Vredenberg, 1997; van den Wijngaard und Vredenberg, 1999).

Bei den Messungen an dem rekombinanten Tic110 konnte ein solcher Anionenkanal nicht detektiert werden. Möglicherweise ist der mit Tic110 assoziierte Anionenkanal in den während dieser Arbeit durchgeführten Experimenten nicht funktionell oder wird nicht von Tic110 selbst, sondern von anderen Proteinimportkomponenten gebildet. Diese Befunde deuten auf eine größere Diskrepanz zwischen der Funktion des nativen und rekombinanten Tic110 hin. Auf diesen Sachverhalt wird bei der Diskussion der an isolierten inneren Chloroplasten-Hüllmembranen gewonnenen Ergebnisse (siehe unter 4.3.2.3) weiter eingegangen.

4.3 Kanäle in der inneren Chloroplasten-Hüllmembran

Um Ionenkanäle in der inneren Chloroplasten-Hüllmembran zu identifizieren und zu charakterisieren, wurde die Bilayer-Technik angewendet. Bei den zunächst mit den isolierten Membranen durchgeführten Experimenten konnten Kanalproteine in die künstliche Membran inkorporiert werden, die Stabilität des Bilayers war aber unzureichend. Erst die Fusion der inneren Hüllmembranen mit Azolektin-Liposomen führte zu ausreichend stabilen Bilayern nach der Applikation der Proteoliposome. Ursache für die beobachteten Instabilitäten könnte die Lipidzusammensetzung der inneren Hüllmembran sein. Diese enthält hauptsächlich Galactolipide, aber, im Vergleich zur äußeren Membran, kein Phosphatidylcholin (Douce und Joyard, 1990), welches der Hauptbestandteil des in dieser Arbeit für die Herstellung der Bilayer verwendeten Azolektins ist. Möglich ist auch, dass der vergleichsweise hohe Proteingehalt der inneren Membran (ca. 1 mg Protein je mg Lipid) für die instabilen Bilayer verantwortlich ist. Der höhere Lipidgehalt der Proteoliposome nach der Fusion mit Azolektin könnte somit zu stabileren Bilayern bei den Messungen führen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen zeigten, dass die innere Chloroplasten-Hüllmembran eine größere Zahl von Poren mit unterschiedlicher Selektivität für Anionen und Kationen enthält. Die genauere elektrophysiologische Charakterisierung wurde auf die Kationen-selektiven Kanäle beschränkt.

Relativ häufig war eine Inkorporation von mehreren Kanälen unterschiedlichen Typs in den Bilayer zu beobachten. Eine Unterscheidung dieser Kanäle war in diesen Fällen nur schwer möglich, deshalb wurden nur Messungen an Bilayern durchgeführt, die einzelne Kanäle oder Kanäle desselben Typs enthielten.

Es konnten während der hier durchgeführten Messungen zwei Kationen-selektive Kanäle (CIMCC1 und CIMCC2) charakterisiert werden. CIMCC1 war am häufigsten zu detektieren und scheint somit einen größeren Teil der Kanalpopulation der inneren Membran auszumachen. Dagegen war CIMCC2 seltener zu sehen, eine Charakterisierung konnte aber trotzdem durchgeführt werden. Die Leitwerte beider Kanäle lagen im Bereich von 600-700 pS in 250 mM KCl. Kationen-selektive Kanäle mit größeren Leitwerten (> 1 nS), wie sie für die Chloroplasten-Hüllmembran beschrieben wurden (Heiber *et al.*, 1995; Pottosin, 1992) konnten bei den hier durchgeführten Messungen nicht registriert werden.

Aufgrund ihrer grundlegenden Eigenschaften (Selektivität, Leitwert(e) und spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit) unterscheiden sich die beiden hier untersuchten Kanäle deutlich von bisher publizierten, in elektrophysiologischen Experimenten charakterisierten Kationen-

selektiven Poren in der Chloroplasten-Hüllmembran, weshalb es sich um bisher noch nicht beschriebene Kanalproteine handelt.

Neben CIMCC1/2 konnte noch ein weiterer Kationen-Kanal registriert werden, wobei es sich aufgrund von Selektivität und Leitwert wahrscheinlich um den von Heiber *et al.* (1995) und Mi *et al.* (1994) beschriebenen Kaliumkanal handelt. Da der Kanal aber nur selten (bzw. nur selten als alleiniger Kanal im Bilayer) zu registrieren war, wurde zunächst auf eine genauere Charakterisierung verzichtet.

4.3.1 Charakterisierung von CIMCC1

4.3.1.1 Grundlegende Eigenschaften

Der Kanal besitzt einen Hauptleitwert von 680 pS und einen etwa halb so großen Unterleitwert von 330 pS (beides in 250 mM KCl bestimmt). Der Kanal leitet Kalium 3.5 mal besser als Chlorid und ist somit als mäßig Kationen-selektiv zu bezeichnen. Aufgrund der Selektivität ist er in etwa vergleichbar mit einem in Patch-Clamp-Experimenten gefundenen, Porin-ähnlichen Kanal (Pottosin, 1992); ein Kationen-Kanal mit den hier bestimmten Leitwerten ist aber bisher für die Chloroplasten-Hüllmembran noch nicht beschrieben worden. Aufgrund des hohen Hauptleitwerts, der vergleichbar ist mit den Leitwerten von bakteriellen Porinen und ähnlichen Poren, ist ein Durchmesser der durch den Kanal gebildeten Pore von mehr als 1 nm anzunehmen.

Die Offenwahrscheinlichkeit von CIMCC1 ist in einem weiten Bereich unabhängig von der angelegten Membranspannung. Allerdings trat bei den hier durchgeführten Messungen eine recht große Streuung der Messwerte auf. Dieses ist mit den tendentiell instabilen Bilayern zu erklären. So waren längere Messungen (> 1 min), vor allem bei höheren Membranpotentialen, nicht möglich. Die Offenwahrscheinlichkeit bei höheren Spannungen (> 60 mV) konnte daher nicht bestimmt werden, auch war es nicht möglich, aus den registrierten Daten die Wahrscheinlichkeiten zu bestimmen, mit denen der Kanal jeweils einen der beiden Offenzustände einnimmt.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass der Kanal bei Spannungen zwischen -60 und +60 mV eine in etwa konstante Offenwahrscheinlichkeit von 70 % besitzt. Im Gegensatz hierzu ist für die bisher beschriebenen Kationen-Kanäle der Chloroplasten-Hüllmembran (mit Ausnahme des Kaliumkanals) eine maximale Offenwahrscheinlichkeit bei kleinen Membranpotentialen (< +/- 30 mV) und ein verstärktes Schließen der Kanäle bei höheren Spannungen beschrieben (Heiber *et al.*, 1995; Pottosin, 1992).

4.3.1.2 Effekt von Präpeptiden auf CIMCC1

Da ein Schwerpunkt dieser Arbeit in der Charakterisierung von Komponenten des Proteinimportapparates lag, wurde überprüft, ob der Kanal durch das Präpeptid Troe33 beeinflussbar ist. Die Experimente zeigten, dass Troe33 im Konzentrationsbereich von mehreren 100 nM nur eine sehr schwache Wirkung auf CIMCC1 hatte. Diese äußerte sich in einer geringfügigen Abnahme des Gesamtstromes bei höheren Membranspannungen und Präpeptid-Konzentrationen.

4.3.1.3 Mögliche Rolle des Kanals *in vivo*

Da CIMCC1 durch Präpeptide nicht nennenswert beeinflusst wird, ist eine Beteiligung dieser Pore am Import von Präproteinen in den Chloroplasten nicht anzunehmen. Wahrscheinlicher ist eine Funktion dieses Kanals beim Transport von niedermolekularen Substanzen (Ionen, Metabolite) über die Membran.

Der Protonenfluss aus dem Stroma über die innere Hüllmembran ist gekoppelt an einen Kaliumstrom (Huber und Maury, 1980; Maury *et al.*, 1981; Wu und Berkowitz, 1991; Wu und Berkowitz, 1992). Aufgrund seiner Selektivität besteht zwar die Möglichkeit, dass CIMCC1 am Transport von Kalium über die innere Membran beteiligt ist, dieses ist aber wegen der Existenz eines spezifischen Kanals für Kalium (Heiber *et al.* 1995; Mi *et al.* 1994) in dieser Membran wenig wahrscheinlich. Eine Identität von CIMCC1 mit dem beschriebenen Kaliumkanal kann, wegen des deutlich größeren Leitwerts und der sehr viel schwächeren Selektivität für Kalium, ausgeschlossen werden. Weiterhin ist es unwahrscheinlich, dass es sich bei CIMCC1 um einen Calciumkanal handelt. Calcium-Transport über die innere Chloroplasten-Hüllmembran wurde zwar nachgewiesen und wird wahrscheinlich durch einen Ionenkanal mit den dafür typischen Eigenschaften vermittelt (Roh *et al.*, 1998); Calciumkanäle besitzen aber eine viel geringere Anionen-Leitfähigkeit und einen sehr viel kleineren Einzelkanalleitwert (8-25 pS; Hille, 1992 Kap. 4) als der hier charakterisierte Kanal.

Das in der äußeren Hüllmembran lokalisierte Protein OEP16 ist ein Kationen-selektiver Kanal, welcher einen Leitwert von 330 pS (in 250 mM KCl) besitzt. Wegen seiner Permeabilität für Aminosäuren wird ihm eine Rolle beim Transport dieser Substanzen zugesprochen (Pohlmeyer *et al.*, 1997). Aufgrund der Kationen-Selektivität und des in etwa mit OEP16 vergleichbaren Leitwertes könnte eine mögliche Funktion von CIMCC1 im Transport von Aminosäuren in den Chloroplasten liegen. Bisher sind in der inneren Membran nur ein Glutamin/Glutamat- und ein Glutamat/Malat-Antiporter beschrieben (Flügge, 1998). Weitere Transportsysteme für Amino-

säuren über die innere Hüllmembran wurden zwar bisher noch nicht nachgewiesen, unbestritten ist aber sowohl die Aufnahme als auch der Export von weiteren Aminosäuren über die Chloroplasten-Membranen (Neuhaus und Wagner, 2000; Flügge, 1998). Von Schwarz *et al.* (1994) ist nachgewiesen worden, dass Translokatoren (in diesem Fall der Triosephosphat-Phosphattranslokator) auch als Ionenkanal fungieren können. Deshalb besteht die Möglichkeit, dass CIMCC1 identisch mit einem der schon beschriebenen AS-Antiporter (für Glutamat/Malat bzw Glutamin/Glutamat) ist. Im Falle des Glutamat/Malat-Antiporters ist eine Funktion als Kationenkanal, aufgrund der ausschließlich anionischen Substrate, allerdings sehr unwahrscheinlich.

Aufgrund seiner mäßigen Ionenselektivität könnte auch vermutet werden, dass CIMCC1 am Transport von neutralen Zuckern (Glucose und Maltose) über der inneren Hüllmembran beteiligt ist. Die Porengröße des Kanals wäre für einen Durchtritt dieser Substanzen sicherlich ausreichend. Zucker-Transporter konnten zwar im Chloroplasten auf molekularer Ebene nur ansatzweise charakterisiert werden (Schäfer *et al.*, 1977), ein diffusionsgetriebener Transport von Glucose und Maltose über die innere Membran wurde aber nachgewiesen (Schäfer *et al.*, 1977; Herold *et al.*, 1981; Rost *et al.*, 1997).

Für die hier beschriebenen möglichen Funktionen von CIMCC1 *in vivo* ist eine Regulation des Kanals unerlässlich, damit neben dem eigentlichen Metabolit-Transport keine unspezifische Ionenleitung stattfindet. Denkbar wäre hier die Interaktion mit regulatorischen Proteinen (löslich oder membranassoziiert), die im Stroma oder Intermembranraum lokalisiert sind. Möglich wäre außerdem, dass eine spezifische Bindung der zu transportierenden Substrate eine Permeation anderer Moleküle verhindert.

Weitere Experimente mit potentiell zu transportierenden Metaboliten sind nötig, um die Funktion von CIMCC1 und dessen Regulation *in vivo* weiter aufzuklären.

4.3.2 Charakterisierung von CIMCC2

4.3.2.1 Grundlegende Eigenschaften

Der Kanal besitzt nur einen Hauptleitwert von 600 pS, ein Unterleitwert wurde nicht beobachtet. CIMCC2 leitet Kalium 5.3 mal besser als Chlorid und ist somit selektiv für Kationen. Diese Selektivität ist etwas ausgeprägter als die von CIMCC1, der Leitwert im Vergleich etwas geringer als der CIMCC1-Hauptleitwert. Die Offenwahrscheinlichkeit von CIMCC2 konnte nicht quantitativ bestimmt werden, da für diesen Kanal wegen der Instabilitäten der Bilayer keine ausreichende Anzahl längerer Messungen vorlag. Qualitativ ist der Kanal bei kleinen Membranspannungen hauptsächlich geöffnet und schließt bei Erhöhung des Membranpotentials. Dieses

Schaltverhalten ähnelt dem von Porin-ähnlichen Kationen-Kanälen der Chloroplasten-Hüllmembran (Heiber *et al.*, 1995; Pottosin, 1992). Allerdings ist der Leitwert von CIMCC2 geringer als der dieser Kanäle und die Kationen-Selektivität ist stärker ausgeprägt.

4.3.2.2 Effekt von Präpeptiden auf CIMCC2

Troe33 verursacht einen Block von CIMCC2, der sich schon im Konzentrationsbereich von wenigen 100 nM auswirkt. Der Block ist abhängig von der angelegten Membranspannung und äußert sich in dem verstärkten Auftreten von Schaltereignissen. Er tritt dann auf, wenn die Membranspannung so gerichtet ist, dass das Peptid in den Kanal getrieben wird. Reduziert man die Membranspannung auf den Ausgangswert (0 mV), so ist die Pore wieder geöffnet; der Block ist somit vollständig reversibel.

Dieser Effekt von Troe33 auf CIMCC2 ähnelt der Wirkung auf Tic110, wie unter 3.3.3.4 beschrieben. Der Effekt auf CIMCC2 ist aber viel stärker ausgeprägt, da sich der Gesamtstrom schon bei geringerer Konzentration stärker reduziert und außerdem der Kanal schon bei geringeren positiven Spannungen fast komplett geschlossen ist. Auch hier ist, aufgrund der Spannungsabhängigkeit des Blocks, eine Bindung des Peptids in der Kanalpore wahrscheinlich. Die Größe der Pore von CIMCC2 ist wahrscheinlich vergleichbar, wenn nicht sogar größer, als die von Tic110, was sich aus Vergleichen der Leitwerte der beiden Poren ergibt.

Für die Frage nach der Permeation des Präpeptides durch CIMCC2 gilt das für Tic110 unter 4.2.5 gesagte. Ob Troe33 auf beide Seiten der Pore unterschiedlich stark wirkt, kann aufgrund der hier erhobenen Daten nicht ermittelt werden. Hierzu – und auch bezüglich der genaueren Präpeptidwirkung auf CIMCC2 – sind noch weitere Experimente nötig (siehe auch Diskussion Tic110 unter 4.2.6).

4.3.2.3 Mögliche Bedeutung des Kanals *in vivo*

Aufgrund der spezifischen Interaktion von CIMCC2 mit chloroplastidären Präpeptiden ist eine Beteiligung dieser Pore am Proteinimport in den Chloroplasten wahrscheinlich. Die aus dem Leitwert abgeschätzte Größe der Kanalpore ist ausreichend, um den Durchtritt von Präproteinen ermöglichen. Da CIMCC2 bei höheren positiven bzw. negativen Membranspannungen schließt, wäre eine Regulation mittels des Potentials über der inneren Hüllmembran, wie schon für Tic110 angenommen, denkbar (siehe 4.2.3).

Insgesamt bestehen auffällige funktionelle Ähnlichkeiten zwischen CIMCC2 und dem rekombinanten Tic110. Beide Proteine sind Kationen-selektive Poren mit großem Leitwert und Porin-

ähnlicher Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit. Das langsame Schaltverhalten mit seltenem Flickern ist bei beiden Poren sehr ähnlich, weiterhin werden beide Kanäle spannungsabhängig durch ein Präpeptid blockiert. Andererseits bestehen auch eindeutige Unterschiede, so ist der Leitwert von CIMCC2 ca. 30 % größer als der von Tic110, das Protein ist weniger selektiv für Kalium und stärker durch die Präpeptide blockierbar.

Diese funktionellen Unterschiede zwischen Tic110 und CIMCC2 könnten darin begründet sein, dass das hier verwendete Tic110 rekombinant exprimiert ist, während es sich bei CIMCC2 um ein natives Protein handelt. Weiterhin könnten bei den Messungen an CIMCC2 noch andere Komponenten des Tic-Komplexes bzw. Lipide der inneren Membran im Bilayer vorhanden sein und Einfluss auf die Kanaleigenschaften des Proteins nehmen.

Bei Patch-Clamp-Messungen an Chloroplasten (van den Wijngaard und Vredenberg, 1997; van den Wijngaard und Vredenberg, 1999) wurde ein mit Tic110 assoziierter Anionenkanal mit kleinem Leitwert gefunden, der ebenfalls durch Präpeptide blockierbar ist (siehe auch 4.2.6). Bei diesen Messungen wurden Ströme über eine Sandwich-artige Struktur beider Hüllmembranen registriert. Es ist wahrscheinlich, dass bei diesen Messungen mehrere Komponenten des Tic- und auch des Toc-Komplexes involviert waren, möglicherweise wird der Anionenkanal nicht primär von Tic110, sondern von anderen Komponenten, die am Proteinimport beteiligt sind, gebildet.

Aufgrund der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse ist es daher wahrscheinlicher, dass es sich bei dem Kationen-selektiven CIMCC2 um die native Form des Tic110 handelt.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei angenommene Kaliumkanäle heterolog exprimiert und untersucht. Außerdem wurde die elektrophysiologische Charakterisierung des am Proteinimport beteiligten Proteins Tic110 durchgeführt. Ergänzt wurden diese Experimente durch eine elektrophysiologische Charakterisierung von Ionenkanälen in der inneren Chloroplasten-Hüllmembran.

Sowohl in *Synechocystis* sp. PCC 6803 als auch in *Arabidopsis thaliana* konnten zwei Gene identifiziert werden, die wahrscheinlich Kaliumkanäle codieren. Das Genprodukt aus *Arabidopsis* ist wahrscheinlich im Chloroplasten lokalisiert und besitzt sechs putative transmembrane Durchgänge. Es ähnelt strukturell den Kaliumkanälen AKT1 und KAT1. Der potentielle *Synechocystis*-Kanal besitzt aufgrund von Sekundärstrukturvorhersagen Ähnlichkeit mit dem Kaliumkanal KcsA aus *Streptomyces lividans* und eukaryontischen Kanälen der IRK-Familie.

Beide Proteine wurden als His-Tag Fusionsproteine in Baculovirus-infizierten Sf21-Insektenzellen überexprimiert und konnten in der Membranfraktion der Zellen nachgewiesen werden. Patch-Clamp-Messungen in der 'Whole-Cell' und 'Excised-Patch' Konfiguration an den Insektenzellen zeigten, dass keine funktionellen Kanäle in der Plasmamembran lokalisiert waren. Beide Kanäle konnten mittels nicht-ionischer Detergentien solubilisiert werden, aber nur der *Synechocystis*-Kanal konnte mittels Ni-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Nach Rekonstitution des Proteins in Azolektin-Liposomen zeigte sich bei Messungen im Bilayer-System jedoch keine Kanalaktivität. Ursache hierfür ist wahrscheinlich eine zu geringe Offenwahrscheinlichkeit des Proteins oder eine nicht funktionelle Rekonstitution.

Weiterhin wurden bei elektrophysiologischen Messungen mit der Bilayer-Methode Ionenkanäle in der isolierten inneren Hüllmembran von Chloroplasten untersucht. Es konnte die Existenz eines Kaliumkanals bestätigt sowie zwei bisher unbekannte Kanäle (CIMCC1 und CIMCC2) charakterisiert werden. CIMCC1 ist mäßig selektiv für Kationen ($P_K/P_{Cl} = 3.5$), besitzt einen Haupt- und einen Unterleitwert von 680 bzw. 330 pS (in 250 mM KCl) und eine spannungsunabhängige Offenwahrscheinlichkeit von 70 %. Der Kanal könnte aufgrund seiner Eigenschaften am Transport von Aminosäuren über die innere Chloroplasten-Hüllmembran beteiligt sein.

CIMCC2 ist Kationen-selektiv ($P_K/P_{Cl} = 5.3$), besitzt einen Leitwert von 600 pS (in 250 mM KCl) und schließt bei höheren positiven bzw. negativen Membranpotentialen. Der Kanal ist durch wenige 100 nM des Präpeptids Troe33 blockierbar, weshalb er eine Rolle im Import von Proteinen in den Chloroplasten spielen könnte.

Ferner konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass das Protein Tic110 nach heterologer Expression in *E. coli* und Rekonstitution in Liposome eine hydrophile Pore bildet, deren Eigenschaften denen von Proteinimportkanälen in der äußeren Membran von Chloroplasten und Mitochondrien ähnelt. Aufgrund einer Sekundärstrukturvorhersage und des CD-Spektrums ist, im Gegensatz zu vorherigen Annahmen, eine von β -Faltblättern dominierte Sekundärstruktur wahrscheinlich. Der durch Tic110 gebildete Kanal ist Kationen-selektiv, hat einen Leitwert von 446 pS in 250 mM KCl und einen Porendurchmesser zwischen 15 und 34 Angström. Die spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit ist maximal bei kleinen Membranpotentialen und nimmt zu höheren positiven und negativen Spannungen hin ab. Weiterhin ist der Kanal durch geringe Konzentrationen des Präpeptids Troe33 (ca. 100 nM) spezifisch hemmbar.

Tic110 besitzt funktionell eine starke Ähnlichkeit mit CIMCC2 in der inneren Hüllmembran, was nahelegt, dass es sich hierbei um die gleichen Proteine handelt.

Ausgehend von diesen Eigenschaften ist es wahrscheinlich, dass Tic110 die Proteinimportpore der inneren Chloroplasten-Hüllmembran darstellt.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

- Akita, M., E. Nielsen, and K. Keegstra. 1997. Identification of protein transport complexes in the chloroplast envelope membranes via chemical cross-linking. *Journal of Cell Biology* 136:983-994.
- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Anderson, J.A., S.S. Huprikar, L.V. Kochian, W.J. Lucas, and R.F. Gaber. 1992. Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89:3736-3740.
- Andrade, M.A., P. Chacon, J.J. Merelo, and F. Moran. 1993. Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Eng* 6:383-390.
- Armstrong, C.M. and B. Hille. 1998. Voltage-gated ion channels and electrical excitability. *Neuron* 20:371-380.
- Bainbridge, G., I. Gokce, and J.H. Lakey. 1998. Voltage gating is a fundamental feature of porin and toxin b-barrel membrane channels. *FEBS Lett.* 431:305-308.
- Bauer, J., K. Chen, A. Hiltbunner, E. Wehrli, M. Eugster, D.J. Schnell, and F. Kessler. 2000. The major protein import receptor of plastids is essential for chloroplast biogenesis. *Nature* 403:203-207.
- Bauer, K., M. Struyvé, D. Bosch, R. Benz, and J. Tommassen. 1989. One single lysine residue is responsible for the special interaction between polyphosphate and the outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 264:16393-16398.
- Benz, R., A. Schmid, and R.E. Hancock. 1985. Ion selectivity of gram-negative bacterial porins. *Journal of Bacteriology* 162:722-727.
- Berkowitz, G.A. and J.S. Peters. 1993. Chloroplast inner-envelope ATPase acts as a primary H⁺ pump. *Plant Physiol.* 102:261-267.
- Berrier, C., M. Besnard, and A. Ghazi. 1997. Electrophysiological characteristics of the PhoE porin channel from *Escherichia coli* - implications for the possible existence of a superfamily of ion channels. *Journal of Membrane Biology* 156:105-115.
- Birnboim, H.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-1523.
- Bishop, N.D. and E.J.A. Lea. 1994. Characterisation of the porin of *Rhodobacter capsulatus* 37b4 in planar lipid bilayers. *FEBS Letters* 349:69-74.

- Bölter, B., J. Soll, K. Hill, R. Hemmler, and R. Wagner. 1999. A rectifying ATP regulated solute channel in the chloroplastic outer envelope from pea. *EMBO J* 18:5505-5516.
- Breitwieser, G.E. 1996. Mechanisms of K⁺ channel regulation. *J. Membr. Biol.* 152:1-11.
- Bruce, B.D. 1998. The role of lipids in plastid protein transport [Review]. *Plant Molecular Biology* 38:223-246.
- Bruggemann, A., L.A. Pardo, W. Stuhmer, and O. Pongs. 1993. Ether-a-go-go encodes a voltage-gated channel permeable to K⁺ and Ca²⁺ and modulated by cAMP. *Nature* 365:445-448.
- Buehler, L.K., S. Kusumoto, H. Zhang, and J.P. Rosenbusch. 1991. Plasticity of Escherichia coli porin channels. Dependence of their conductance on strain and lipid environment. *J Biol. Chem.* 266:24446-24450.
- Caliebe, A., R. Grimm, G. Kaiser, J. Lubeck, J. Soll, and L. Heins. 1997. The chloroplastic protein import machinery contains a Rieske-type iron-sulfur cluster and a mononuclear iron-binding protein. *EMBO Journal* 16:7342-7350.
- Chen, D.P. and R.S. Eisenberg. 1993. Charges, currents, and potentials in ionic channels of one conformation. *Biophys. J.* 64:1405-1421.
- Clark, S.A. and S.M. Theg. 1997. A folded protein can be transported across the chloroplast envelope and thylakoid membranes. *Molecular Biology of the Cell* 8:923-934.
- Cohen, F.S., J. Zimmerberg, and A. Finkelstein. 1980. Fusion of phospholipid vesicles with planar lipid bilayers membranes II. Incorporation of a vesicular membrane marker into the planar membrane. *J. Gen. Physiol.* 75:251-270.
- Cohen, F.S., W.D. Niles, and M.H. Akabas. 1989. Fusion of phospholipid vesicles with a planar membrane depends on the membrane permeability of the solute used to create the osmotic pressure. *J. Gen. Physiol.* 93:201-210.
- Cowan, S.W., T. Schirmer, G. Rummel, M. Steiert, R. Ghosh, R.A. Pauptit, J.N. Jansonius, and J.P. Rosenbusch. 1992. Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* 358:727-733.
- Cuello, L.G., J.G. Romero, D.M. Cortes, and E. Perozo. 1998. pH-dependent gating in the Streptomyces lividans K⁺ channel. *Biochemistry* 37:3229-3236.
- Czempinski, K., S. Zimmermann, T. Ehrhardt, and B. Müller-Röber. 1997. New structure and function in plant K⁺ channels: KCO1, an outward rectifier with a steep Ca²⁺ dependency. *EMBO J.* 16:2565-2575.
- Czempinski, K., S. Zimmermann, and B. Müller-Röber. 1999. Molecular mechanisms and regulation of plant ion channels. *J. Exp. Bot.* 50:955-966.
- Dabney-Smith, C., P.W. van den Wijngaard, Y. Treece, W.J. Vredenberg, and B.D. Bruce. 1999. The C terminus of a chloroplast precursor modulates its interaction with the translocation apparatus and PIRAC. *J. Biol. Chem.* 274:32351-32359.

- Dalmas,B., G.J.Hunter, and W.H.Bannister. 1994. Prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra using artificial neural network techniques. *Biochem Mol. Biol. Int.* 34:17-26.
- Dolder,M., K.Zeth, P.Tittmann, H.Gross, W.Welte, and T.Wallimann. 1999. Crystallization of the Human, Mitochondrial Voltage-Dependent Anion- Selective Channel in the Presence of Phospholipids. *J Struct. Biol.* 127:64-71.
- Douce,R. and J.Joyard. 1990. Biochemistry and function of the plastid envelope. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6:173-216.
- Doyle,D.A., C.J.Morais, R.A.Pfuetzner, A.Kuo, J.M.Gulbis, S.L.Cohen, B.T.Chait, and R.MacKinnon. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280:69-77.
- Eisenberg,R.S. 1996. Computing the fields in proteins and channels. *J. Membr. Biol.* 150:1-25.
- Emanuelsson,O., H.Nielsen, S.Brunak, and G.von Heijne. 2000. Predicting subcellular localization of proteins based on their N- terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* 300:1005-1016.
- Endo,T., M.Kawakami, A.Goto, T.America, P.J.Weisbeek, and M.Nakai. 1994. Chloroplast protein import. Chloroplast envelopes and thylakoids have different abilities to unfold proteins. *Eur. J. Biochem.* 225:403-409.
- Flügge,U.I. and G.Hinz. 1986. Energy dependence of protein translocation into chloroplasts. *Eur. J. Biochem* 160:563-570.
- Flügge,U.I. and R.Benz. 1984. Pore-forming activity in the outer membrane of the chloroplast envelope. *FEBS Letters* 169,1:85-89.
- Fuks,B. and F.Homble. 1995. A voltage-dependent porin-like channel in the inner envelope membrane of plant chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 270:9947-9952.
- Galzi,J., L.A.Devillers-Theiry, N.Hussy, S.Bertrand, J.P.Changeuz, and D.Bertand. 1992. Mutations in the channel domain of a neuronal nicotinic receptor convert ion selectivity from cationic to anionic. *Nature* 359:500-505.
- Gaymard,F., M.Cerutti, C.Horeau, G.Lemaillet, S.Urbach, M.Ravallec, G.Devauchelle, H.Sentenac, and J.B.Thibaud. 1996. The baculovirus/insect cell system as an alternative to *Xenopus* oocytes. First characterization of the AKT1 K⁺ channel from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 271:22863-22870.
- Gilbert,R.J. 1992. Protein structure prediction from predicted residue properties utilizing a digital encoding algorithm. *J. Mol. Graph.* 10:112-119.
- Gray,M.W. 1992. The Endosymbiont Hypothesis revisited. *Int. Rev. Cytol.* 141:233-357.
- Guo,X.W., P.R.Smith, P.Cognon, D.d'Arcangelis, E.Dolginova, and C.A.Mannella. 1995. Molecular design of the voltage-dependent, anion-selective channel in the mitochondrial outer membrane. *J. Struct. Biol.* 114:41-59.
- Hamman,B.D., J.C.Chen, E.E.Johnson, and A.E.Johnson. 1997. The aqueous pore through the translo-

- con has a diameter of 40-60 angstrom during cotranslational protein translocation at the er membrane. *Cell* 89:535-544.
- Hanahan,D. 1983. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-580.
- Hanein,D., K.E.S.Matlack, B.Jungnickel, K.Plath, K.U.Kalies, K.R.Miller, T.A.Rapoport, and C.W.Akey. 1996. Oligomeric rings of the sec61p complex induced by ligands required for protein translocation. *Cell* 87:721-732.
- Hashimoto,A., W.F.Ettinger, Y.Yamamoto, and S.M.Theg. 1997. Assembly of newly imported oxygen-evolving complex subunits in isolated chloroplasts - sites of assembly and mechanism of binding. *Plant Cell* 9:441-452.
- Heginbotham,L., Z.Lu, T.Abramson, and R.MacKinnon. 1994. Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys. J.* 66:1061-1067.
- Heiber,T., T.Steinkamp, S.Hinnah, M.Schwarz, U.I.Flugge, A.Weber, and R.Wagner. 1995. Ion channels in the chloroplast envelope membrane. *Biochemistry* 34:15906-15917.
- Heins,L., I.Collinson, and J.Soll. 1998. The protein translocation apparatus of chloroplast envelopes [Review]. *Trends in Plant Science* 3:56-61.
- Herold,A., R.Leegood, P.H.McNeil, and H.W.Heldt. 1981. Accumulation of maltose during photosynthesis in protoplasts isolated from spinach leaves treated with mannose. *Plant Physiol.* 67:85-88.
- Hill,K., K.Model, M.T.Ryan, K.Dietmeier, F.Martin, R.Wagner, and N.Pfanner. 1998. Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins. *Nature* 395:516-521.
- Hille,B. 1992. Ion channels of excitable membranes. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Hinnah,S.C., K.Hill, R.Wagner, T.Schlicher, and J.Soll. 1997. Reconstitution of a chloroplast protein import channel. *EMBO J.* 16:7351-7360.
- Hinnah, S. C. 1999. Elektrophysiologische Charakterisierung der Proteinimportpore Toc75 und ihres phylogenetischen Vorgängers, Syntoc75. Dissertation
- Hirsch,S., E.Muckel, F.Heemeyer, G.von Heijne, and J.Soll. 1994. A Receptor Component of the Chloroplast Protein Translocation Machinery. *Science* 266:1989-1992.
- Hofmann,K. and W.Stoffel. 1993. TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem.* 347:166.
- Hoshi,T. 1995. Regulation of voltage dependence of the KAT1 channel by intracellular factors. *J. Gen. Physiol* 105:309-328.
- Huber,S.C. and J.Maury. 1980. Effects of Magnesium on intact chloroplast. I. Evidence of activation of (sodium) potassium/proton exchange across the chloroplast envelope. *Plant Physiol.* 65:350-354.

- Jackson, D.T., J.E. Froehlich, and K. Keegstra. 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.
- Jan, L.Y. and Y.N. Jan. 1997. Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Annu Rev Neurosci.* 20:91-123.
- Jap, B.K. and P.J. Walian. 1996. Structure and functional mechanism of porins [review]. *Physiological Reviews* 76:1073-1088.
- Karshikoff, A., V. Spassov, S.W. Cowan, R. Ladenstein, and T. Schirmer. 1994. Electrostatic properties of two porin channels from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 240:372-384.
- Kessler, F., G. Blobel, H.A. Pathel, and D.J. Schnell. 1994. Identification of Two GTP-Binding Proteins in the Chloroplast Protein Import Machinery. *Science* 266:1035-1039.
- Kessler, F. and G. Blobel. 1996. Interaction of the protein import and folding machineries in the chloroplast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:7684-7689.
- Klaiber, K., N. Williams, T.M. Roberts, D.M. Papazian, L.Y. Jan, and C. Miller. 1990. Functional expression of Shaker K⁺ channels in a baculovirus-infected insect cell line. *Neuron* 5:221-226.
- Ko, K. and Z.W. Ko. 1992. Carboxyl-terminal sequences can influence the in vitro import and intraorganellar targeting of chloroplast protein precursors. *J. Biol. Chem.* 267:13910-13916.
- Komiya, T., S. Rospert, C. Koehler, R. Looser, G. Schatz, and K. Mihara. 1998. Interaction of mitochondrial targeting signals with acidic receptor domains along the protein import pathway: evidence for the acid chain hypothesis. *EMBO J.* 17:3886-3898.
- Kouranov, A. and D.J. Schnell. 1997. Analysis of the interactions of preproteins with the import machinery over the course of protein import into chloroplasts. *Journal of Cell Biology* 139:1677-1685.
- Kouranov, A., X.J. Chen, B. Fuks, and D.J. Schnell. 1998. Tic20 and Tic22 are new components of the protein import apparatus at the chloroplast inner envelope membrane. *Journal of Cell Biology* 143:991-1002.
- Krasilnikov, O.V., R.Z. Sabirov, V.I. Ternovsky, P.G. Merzlyak, and J.N. Muratkhodjaev. 1992. A simple method for the determination of the pore radius of ion channels in planar lipid bilayer membranes. *FEMS Microbiology Immunology* 105:93-100.
- Krasilnikov, O.V., J.B. Da Cruz, L.N. Yuldasheva, W.A. Varanda, and R.A. Nogueira. 1998. A novel approach to study the geometry of the water lumen of ion channels: colicin Ia channels in planar lipid bilayers. *J Membr. Biol.* 161:83-92.
- Kreimer, G., M. Melkonian, and E. Latzko. 1985. An electrogenic uniport mediates light-dependent Ca²⁺-uptake by intact chloroplasts. *FEBS Lett.* 180:253-258.
- Kunkele, K.P., S. Heins, M. Dembowski, F.E. Nargang, R. Benz, M. Thieffry, J. Walz, R. Lill, S. Nussberger, and W. Neupert. 1998. The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria.

- dria. *Cell* 93:1009-1019.
- Kyte, J. and R.F. Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157:105-132.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lubeck, J., J. Soll, M. Akita, E. Nielsen, and K. Keegstra. 1996. Topology of IEP110, a component of the chloroplastic protein import machinery present in the inner envelope membrane. *EMBO Journal* 15:4230-4238.
- Lubeck, J., L. Heins, and J. Soll. 1997. Protein import into chloroplasts [review]. *Physiologia Plantarum* 100:53-64.
- Luckow, V.A., S.C. Lee, G.F. Barry, and P.O. Olins. 1993. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J. Virol.* 67:4566-4579.
- Mannella, C.A. 1997. Minireview: On the structure and gating mechanism of the mitochondrial channel, VDAC. *J. Bioenerg. Biomembr.* 29:525-531.
- Mathes, A. and H. Engelhardt. 1998. Nonlinear and asymmetric open channel characteristics of an ion-selective porin in planar membranes. *Biophys. J.* 75:1255-1262.
- Maury, J., S.C. Huber, and D.E. Moreland. 1981. Effects of Magnesium on intact chloroplast. II. Cation specificity and involvement of the envelope ATPase in (sodium) potassium/proton exchange across the chloroplast envelope. *Plant Physiol.* 69:719-728.
- Meuser, D. 2000. Elektrophysiologische Charakterisierung des Kaliumkanals KcsA aus *Streptomyces lividans*. Dissertation
- Mi, F., J.S. Peters, and G.A. Berkowitz. 1994. Characterization of a chloroplast inner envelope K⁺ channel. *Plant Physiol* 105:955-964.
- Miroux, B. and J.E. Walker. 1996. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.* 260:289-298.
- Mueller, P., D. Rudin, R. Tien, and W.C. Westcott. 1963. Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution. *J. Phys. Chem.* 67:534-535.
- Nakai, K. and M. Kanehisa. 1991. Expert system for predicting protein localization sites in gram-negative bacteria. *Proteins* 11:95-110.
- Nakamura, R.L., J.A. Anderson, and R.F. Gaber. 1997. Determination of key structural requirements of a K⁺ channel pore. *J. Biol. Chem.* 272:1011-1018.
- Navarro, B., M.E. Kennedy, B. Velimirovic, D. Bhat, A.S. Peterson, and D.E. Clapham. 1996. Nonselective and G betagamma-insensitive weaver K⁺ channels. *Science* 272:1950-1953.

- Neuhaus, H.E. and R. Wagner. 2000. Solute pores, ion channels, and metabolite transporters in the outer and inner envelope membrane of higher plant plastids. *BBA* 1465:307-323.
- Nielsen, E., M. Akita, J. Davila-Aponte, and K. Keegstra. 1997. Stable association of chloroplastic precursors with protein translocation complexes that contain proteins from both envelope membranes and a stromal hsp 100 molecular chaperone. *EMBO Journal* 16:935-946.
- Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak, and G. von Heijne. 1997. A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Int. J. Neural Syst.* 8:581-599.
- Nikaido, H., K. Nikaido, and S. Harayama. 1991. Identification and characterization of porins in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 266:770-779.
- Novagen. 1995. pET System Manual.
- Olsen, L.J., S.M. Theg, B.R. Selman, and K. Keegstra. 1989. ATP is required for the binding of precursor proteins to chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 264:6724-6729.
- Pajot-Augy, E., Couture, L., Bozon, V., Remy, J.J., Biache, G., Severini, M., Huet, J.C., Pernollet, J.C., and Salesse, R. (1995). High-level expression of recombinant porcine LH receptor in baculovirus-infected insect cells or caterpillars. *J. Mol. Endocrinol.* 14: 51-66.
- Peracchia, C. 1994. Handbook of membrane channels. Molecular and cellular physiology. Academic Press.
- Pilon, M., H. Wienk, W. Sips, M. de Swaaf, I. Talboom, R. van't Hof, G. de Korte-Kool, R. Demel, P.J. Weisbeek, and B. de Kruijff. 1995. Functional Domains of the Ferredoxin Transit Sequence Involved in Chloroplast Import. *J. Biol. Chem.* 270:3882-3893.
- Pohlmeyer, K., J. Soll, T. Steinkamp, S.C. Hinnah, and R. Wagner. 1997. Isolation and characterization of an amino acid-selective channel protein present in the chloroplastic outer envelope membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:9504-9509.
- Pohlmeyer, K., J. Soll, R. Grimm, K. Hill, and R. Wagner. 1998. A high-conductance solute channel in the chloroplastic outer envelope from pea. *Plant Cell* 10:1207-1216.
- Pottosin, I.I. 1992. Single channel recording in the chloroplast envelope. *FEBS Letters* 308:87-90.
- Rapaport, D., W. Neupert, and R. Lill. 1997. Mitochondrial protein import - Tom40 plays a major role in targeting and translocation of preproteins by forming a specific binding site for the presequence. *Journal of Biological Chemistry* 272:18725-18731.
- Rensink, W.A., M. Pilon, and P. Weisbeek. 1998. Domains of a transit sequence required for in vivo import in *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant Physiol.* 118:691-699.
- Rensink, W.A., D.J. Schnell, and P.J. Weisbeek. 2000. The transit sequence of ferredoxin contains different domains for translocation across the outer and inner membrane of the chloroplast envelope. *J Biol. Chem.* 275:10265-10271.

- Reumann,S. and K.Keegstra. 1999. The endosymbiotic origin of the protein import machinery of chloroplast envelope membranes [Review]. *Trends in Plant Science* 4:302-307.
- Rigaud,J.L., B.Pitard, and D.Levy. 1995. Reconstitution of membrane proteins into liposomes:application to energy-transducing membrane proteins. *BBA* 1231:223-246.
- Roh,M.H., R.Shingles, M.J.Cleveland, and R.E.McCarty. 1998. Direct measurement of calcium transport across chloroplast inner-envelope vesicles. *Plant Physiol.* 118:1447-1454.
- Rost,S., C.Frank, and E.Beck. 1997. The chloroplast envelope is permeable for maltose but not for maltodextrins. *BBA* 1291:221-227.
- Saiki,R.K., D.H.Gelfand, S.Stoffel, S.J.Scharf, R.Higuchi, G.T.Horn, K.B.Mullis, and H.A.Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
- Sambrook,J., E.Fritsch, and T.Maniatis. 1990. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schatz,G. and B.Dobberstein. 1996. Common principles of protein translocation across membranes. *Science* 271:1519-1526.
- Schatz,G. 1997. Just follow the acid chain. *Nature* 388:121-122.
- Schäfer,G., U.Heber, and H.W.Heldt. 1977. Glucose transport into spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* 67:286-289.
- Schindler,C., R.Hracky, and J.Soll. 1987. Protein transport into chloroplasts: ATP is a prerequisite. *Z. Naturforsch.* 42c:103-108.
- Schnell,D.J. and G.Blobel. 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., G.Blobel, K.Keegstra, F.Kessler, K.Ko, and J.Soll. 1997. A consensus nomenclature for the protein-import components of the chloroplast envelope. *Trends in Cell biology* 7:303-304.
- Schrempf,H., O.Schmidt, R.Kummerlen, S.C.Hinnah, D.Muller, M.Betzler, T.Steinkamp, and R.Wagner. 1995. A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*. *EMBO J.* 14:5170-5178.
- Schroeder,J.I. and S.Hagiwara. 1989. Cytosolic Calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *vicia faba* guard cells. *Nature* 338:427-430.
- Schwarz,M., A.Gross, T.Steinkamp, U.I.Flügge, and R.Wagner. 1994. Ion channel properties of the reconstituted chloroplast triosephosphate translocator. *J. Biol. Chem.* 269:29481-29489.
- Seedorf,M. and J.Soll. 1995. Copper chloride, an inhibitor of protein import into chloroplasts. *FEBS Letters* 367:19-22.
- Sentenac,H., N.Bonneaud, M.Minet, F.Lacroute, J.M.Salmon, F.Gaymard, and C.Grignon. 1992. Clon-

- ing and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science* 256:663-665.
- Shingles,R. and R.E.McCarty. 1994. Direct measurements of ATP-dependent proton concentration changes and characterisation of a K⁺-stimulated ATPase in pea chloroplasts inner envelope vesicles. *Plant Physiol* 106:731-737.
- Shingles,R. and R.E.McCarty. 1995. Production of membrane vesicles by extrusion: size distribution, enzyme activity, and orientation of plasma membrane and chloroplast inner- envelope membrane vesicles. *Anal. Biochem.* 229:92-98.
- Smart,O.S., J.Breed, G.R.Smith, and M.S.P.Sansom. 1997. A novel method for structure-based prediction of ion channel conductance properties. *Biophys. J.* 72:1109-1126.
- Sohrt,K. and J.Soll. 2000. Toc64, a new component of the protein translocon of chloroplasts. *J. Cell Biol.* 148:1213-1221.
- Soll,J. 1985. Phosphoproteins and protein-kinase activity in isolated envelopes of pea (*Pisum sativum* L.) chloroplasts. *Planta* 166:394-400.
- Stahl,T., C.Glockmann, J.Soll, and L.Heins. 1999. Tic40, a new "old" subunit of the chloroplast protein import translocon. *J Biol. Chem.* 274:37467-37472.
- Stauffer,K.A., N.M.Kumar, N.B.Gilula, and N.Unwin. 1991. Isolation and purification of gap junction channels. *J. Cell Biol.* 115:141-150.
- Steinkamp, T. 2000. Elektrophysiologische Charakterisierung von OEP16, einem porenbildenden Protein der äußeren Chloroplastenhüllmembran. Dissertation
- Studier,F.W., A.H.Rosenberg, J.J.Dunn, and J.W.Dubendorff. 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185:60-89.
- Sugawara,E. and H.Nikaido. 1992. Pore-forming activity of OmpA protein of Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* 267:2507-2511.
- Sveshnikova,N., J.Soll, and E.Schleiff. 2000. Toc34 is a preprotein receptor regulated by GTP and phosphorylation [In Process Citation]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:4973-4978.
- Theg,S.M. 1989. Internal ATP is the only energy requirement for the translocation of precursor proteins across chloroplastic membranes. *J. Biol. Chem.* 264:6730-6736.
- Tranel,P.J., J.E.Froehlich, A.Goyal, and K.Keegstra. 1995. A component of the chloroplastic protein import apparatus is targeted to the outer envelope membrane via a novel pathway. *EMBO Journal* 14:2436-2446.
- van den Wijngaard,P.W. and W.J.Vredenberg. 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. and W.J.Vredenberg. 1999. The envelope anion channel involved in chloroplast protein import is associated with Tic110. *J. Biol. Chem.* 274:25201-25204.

- Voges,D. and B.K.Jap. 1998. Recombinant expression, purification and characterization of Kch, a putative Escherichia coli potassium channel protein. *FEBS Lett.* 429:104-108.
- von Heijne,G. 1986. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.* 14:4683-4690.
- von Heijne,G., J.Steppuhn, and R.G.Herrman. 1989. Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur. J. Biochem.* 180:535-545.
- von Heijne,G. and K.Nishikawa. 1991. Chloroplast transit peptides. The perfect random coil? *FEBS Lett.* 271:1-3.
- Vothknecht,U.C. and J.Soll. 2000. Protein import: the hitchhikers guide into chloroplasts. *Biol. Chem.* 381:887-897.
- Waagemann,K. and J.Soll. 1991. Characterization of the protein import apparatus in isolated outer envelopes of chloroplasts. *Plant Journal* 1:149-158.
- Waagemann,K., S.Eichacker, and J.Soll. 1992. Outer Envelope Membranes from Chloroplasts Are Isolated as Right- Side-Out Vesicles. *Planta* 187:89-94.
- Waagemann,K. and J.Soll. 1996. Phosphorylation of the transit sequence of chloroplast precursor proteins. *Journal of Biological Chemistry* 271:6545-6554.
- Woodbury,D.J. and J.E.Hall. 1988. Role of channels in the fusion of vesicles with a planar bilayer. *Biophys. J.* 54:1053-1063.
- Wu,W.H., J.S.Peters, and G.A.Berkowitz. 1991. Surface Charge-Mediated Effects of Mg^{2+} on K^+ Flux Across the Chloroplast Envelope Are Associated with Regulation of Stromal pH and Photosynthesis. *Plant Physiol.* 97:580-587.
- Wu,W.H. and G.A.Berkowitz. 1991. Lidocaine and ATPase Inhibitor Interaction with the Chloroplast Envelope. *Plant Physiol.* 97:1551-1557.
- Wu,W.H. and G.A.Berkowitz. 1992. Stromal pH and Photosynthesis Are Affected by Electroneutral K^+ and H^+ Exchange Through Chloroplast Envelope Ion Channels. *Plant Physiol.* 98:666-672.
- Young,M.E., K.Keegstra, and J.E.Froehlich. 1999. GTP promotes the formation of early-import intermediates but is not required during the translocation step of protein import into chloroplasts. *Plant Physiol* 121:237-244.
- Zimmerberg,J., F.S.Cohen, and A.Finkelstein. 1980. Fusion of phospholipid vesicles with planar phospholipid bilayer membranes I. Discharge of vesicular contents across the planar membrane. *J. Gen. Physiol.* 75:241-250.
- Zimmermann,S. and H.Sentenac. 1999. Plant ion channels: from molecular structures to physiological functions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2:477-482.

6.2 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

Abb. 1.1	Übersicht über die Transportsysteme der Chloroplasten-Hüllmembranen	1
Abb. 1.2	Darstellung der verschiedenen Strukturklassen der Kaliumkanäle	7
Abb. 2.1.	Vereinfachtes Ersatzschaltbild der Messanordnung.....	23
Abb. 2.2.	Querschnitt durch die Bilayer-Messkammer	25
Abb. 3.1	Schematischer AS-Sequenzvergleich	34
Abb. 3.2	Hydrophathieprofil des putativen Chloroplasten-Kaliumkanals	34
Abb. 3.3	Expression des putativen Chloroplasten-Kaliumkanals	35
Abb. 3.4	Schematischer AS-Sequenzvergleich	37
Abb. 3.5	Hydrophathieprofil des putativen Synechocystis-Kaliumkanals.....	39
Abb. 3.6	Klonierung von sll0993 in Expressionsvektoren.....	40
Abb. 3.7	Expression des putativen Synechocystis-Kaliumkanals	41
Abb. 3.8	Reinigung des putativen Synechocystis-Kaliumkanals.....	42
Abb. 3.9	CD-Spektrum und Analyse des rekombinanten Tic110	44
Abb. 3.10	Beispielspuren des Stromes durch mehrere Kopien von Tic110.....	45
Abb. 3.11	Strom-Spannungs-Diagramm und Selektivität von Tic110	46
Abb. 3.12	Offenwahrscheinlichkeit des durch Tic110 gebildeten Kanals	46
Abb. 3.13	Größenbestimmung der durch Tic110 gebildeten Pore.....	47
Abb. 3.14	Effekt von Troe33 auf Tic110	48
Abb. 3.15	SDS-Gelelektrophorese der inneren Chloroplasten-Hüllmembran	49
Abb. 3.16	Ströme durch den Kaliumkanal der inneren Chloroplasten-Hüllmembran .	50
Abb. 3.17	Stromverlauf durch CIMCC1 bei verschiedenen Membranspannungen.....	51
Abb. 3.18	Strom-Spannungs-Diagramm von CIMCC1	51
Abb. 3.19	Strom-Spannungs-Diagramm bei asymmetrischen Pufferbedingungen.....	52
Abb. 3.20	Wahrscheinlichkeit des Geschlossen-Zustands von CIMCC1	52
Abb. 3.21	Beispielspuren des Stromes durch mehrere Kopien von CIMCC2	54
Abb. 3.22	Strom-Spannungs-Diagramm und Selektivität von CIMCC2	55
Abb. 3.23	Effekt von Troe33 auf CIMCC2.....	55

Tabellen

Tab. 2.1.	Hydrodynamische Radien der PEGs	30
Tab. 3.1	Allgemeine Eigenschaften des vermuteten Chloroplasten-Kaliumkanals ..	33
Tab. 3.2	Allgemeine Eigenschaften des vermuteten Synechocystis-Kaliumkanals ..	38
Tab. 3.3	Allgemeine Eigenschaften von Tic110	43

6.3 Abkürzungsverzeichnis

% v/v	Volumenprozente
% w/v	Gewichtsprozente
3-PGA	3-Phosphoglycerat
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AcNPV	Autographica californica nuclear polyhedrosis virus
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure (-reste)
ATP	Adenosintriphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cAMP	zyklisches-Adenosin-Monophosphat
CD	Circulardichroismus
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	zyklisches-Guanosin-Monophosphat
CIAP	Calf intestine alkaline phosphatase
cmc	Kritische Mizellenkonzentration
cNMP	zyklisches-Nukleosid-Monophosphat
Cpn	chaperonin
C-Terminus	Carboxy-Terminus
dATP	2'-desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycolbis [2-Aminoethylether]-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Reticulum
E_{rev}	Umkehrpotential
G	Guanin
GFP	Green fluorescent Protein
GHK	Goldman-Hodgkin-Katz
GIP	general import pathway (über die Chloroplastenhüllmembranen)
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl] piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure]
His-Tag	Histidin-tag
HRP	Meerrettichperoxidase

Hsp	heat shock cognate protein
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kDA	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
Mega9	Nonanoyl-N-methylglucamide
MG	Molekulargewicht
Mops	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	messenger-RNA
N-Terminus	Amino-Terminus
OEP	Outer envelope Protein
OD	Optische Dichte
P	Porenregion (bei Kaliumkanälen)
p.i.	nach Infektion
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PEG	Polyethylenglycol
Pi	anorganisches Phosphat
PEP	Phosphoenolpyruvat
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur (20°C, 293K)
Rubisco	Ribulose 1,5-bisphosphat-Carboxylase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	'Sodium-dodecyl-sulphate' Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sec	secretion
Sf21	Sfodoptera frugiperda Zelllinie 21
T	Thymin
T4-PNK	Ploynukleotidkinase des Phagen T4
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TCA	Trichloressigsäure
Tic	'translocase of the inner chloroplastic membrane'
TM	Transmembrane Domäne
Toc	'translocase of the outer chloroplastic membrane'
TOC	Two pore outwardly rectifying Channel
Tom	'translocase of the outer mitochondrial membrane'
TWIK	Tandem of P Domains in a weak inward rectifying K ⁺ Channel
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
Troe33	Transitpeptid des 33kDa Proteins des 'oxygen evolving complex'
u	Unit
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultra-Violett

6.4 Publikationen

Gottmann, K., A. Mehrle, G. Gisselmann, and H. Hatt. 1997. Presynaptic control of subunit composition of NMDA receptors mediating synaptic plasticity. *J. Neurosci.* 17:2766-2774.

Mehrle, A., L. Heinz, M. Kuchler, J. Soll and R. Wagner. Tic110 constitutes the protein translocation pore of the inner chloroplast membrane. In preparation.

Kurzmitteilungen

A. Mehrle, H. Lill and R. Wagner. 1997. Proposed potassium channels in *Synechocystis*: from *E. coli* via chloroplasts to *Drosophila*. 6th Photosynthesis Workshop 'Nordwest', Bielefeld.

