

Doctoral Thesis ETH No. 15980

**The role of a putative arginine finger and
guanine nucleotides in homo- and heterodimerization
of two GTPases involved in protein import into chloroplasts**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH
for the degree of
Doctor of Sciences

presented by
PETRA WEIBEL
dipl. Natw. ETH, Swiss Federal Institute of Technology Zürich

born 16.04.1975

citizen of
Hochdorf/LU and Jonschwil/SG

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. N. Amrhein, examiner
Prof. Dr. A. Helenius, co-examiner
Prof. Dr. F. Kessler, co-examiner

2005

Abstract

The vast majority of the chloroplast proteins is synthesized in the cytosol with an N-terminal transit peptide and has to be posttranslationally imported into chloroplasts. This import is facilitated by import machineries at the outer and inner chloroplast membrane, termed the Toc- (translocon at the outer chloroplast membrane) and the Tic- (translocon at the inner chloroplast membrane) complex, respectively. The trimeric Toc-complex at the outer chloroplast membrane consists of Toc34 and Toc159, two integral membrane GTP binding proteins involved in preprotein recognition and binding, and Toc75, forming part of the protein-conducting channel through the outer chloroplast membrane.

The three-dimensional structure of Toc34 from pea, psToc34, has been recently solved, revealing new insights into the function of psToc34. In the crystal, psToc34 formed dimers with bound GDP, resembling a GTPase with its corresponding GAP (GTPase activating protein). It has been hypothesized that one monomer functions as GAP for the other monomer in the pea Toc34 dimer, suggesting that dimerization and GTP hydrolysis are functionally related. Furthermore, the location of Arg133 at the interface of the pea Toc34 dimer suggests that this residue functions as arginine finger. An arginine finger is inserted by many GAPs into the active site of their corresponding GTPase, thereby activating GTP hydrolysis.

To examine the arginine finger hypothesis, we mutated the putative arginine finger (Arg130) of the *Arabidopsis* ortholog of psToc34, atToc33, to alanine (atToc33 R130A). As Arg130 was found not to be required for GTP hydrolysis, Arg130 does not appear to be an arginine finger. Moreover, GTP hydrolysis by atToc33 wt is slow in comparison to the rate of GTP hydrolysis by activated GTPases, suggesting that one monomer does not function as GAP for the other monomer in the atToc33 dimer. Instead, Arg130 appears to be essential for atToc33 homodimerization. Moreover, it was shown that Arg130 is involved in heterodimerization of atToc33 and atToc159.

The crystal structure of the psToc34 homodimer suggests that psToc34 homodimerizes preferentially in the GDP bound form. Homodimerization of atToc33, the *Arabidopsis* ortholog of psToc34, was indeed found to be favoured in presence of GDP.

Toc159 does not only exist in an integral membrane form, but also in a soluble, cytosolic form. Similar to SR α forming the receptor for SRP54 at the ER membrane, Toc34 appears to function as receptor for soluble Toc159. Furthermore, the interaction between Toc34 and Toc159 is essential for chloroplast biogenesis *in vivo* and therefore likely plays a crucial role during protein import into chloroplasts.

It is still under debate which guanine nucleotide is bound to the two GTPases when they interact. We provide evidence that the heterodimerization between atToc33 and atToc159 is favoured in presence of GDP, suggesting that GTP hydrolysis is a prerequisite for this interaction.

Zusammenfassung

Die grosse Mehrheit der Chloroplasten-Proteine wird im Cytosol mit einem N-terminalen Transitpeptid synthetisiert und anschliessend posttranslational in die Chloroplasten importiert. Dieser Import wird durch Import-Maschinerien in der äusseren und inneren Chloroplasten-Membran bewerkstelligt, die Toc-, respektive Tic-Komplex genannt werden. Der trimere Toc-Komplex besteht aus drei Komponenten: Toc34 und Toc159, zwei GTP-bindende Membran-Proteine, die an Erkennung und Bindung der Vorläuferproteine beteiligt sind, und Toc75, ein Protein das einen Teil des Kanals in der äusseren Chloroplasten-Membran bildet durch den die Vorläuferproteine transportiert werden.

Die kürzlich publizierte Kristall-Struktur von Toc34 aus Erbsen lieferte neue Erkenntnisse bezüglich der Funktion von psToc34. PsToc34 liegt in den Kristallen als Dimer vor, das GDP gebunden hat. Weil dieses psToc34 Dimer einem GTPase/GAP (GTPase aktivierendes Protein)-Komplex sehr ähnlich ist, wurde vermutet, dass im psToc34 Dimer ein Monomer als GAP für das andere Monomer dient. Das impliziert, dass Dimerisierung und GTPase Aktivität miteinander verknüpft sind. Des Weiteren hat die Position eines Arginin-Restes (Arg133) im psToc34 Dimer zur Spekulation geführt, dass dieser Arginin-Rest ein Arginin-Finger sein könnte. Solche Arginin-Finger finden sich in vielen GAPs. Sie ragen ins aktive Zentrum der dazugehörigen GTPase und tragen so zur Beschleunigung der GTP-Hydrolyse bei.

Um diese Arginin-Finger Hypothese zu überprüfen, haben wir den vermeintlichen Arginin-Finger (Arg130) von atToc33, dem zu psToc34 orthologen Protein in *Arabidopsis*, zu einem Alanin mutiert. Es wurde nachgewiesen, dass Arg130 nicht für die GTP-Hydrolyse benötigt wird. Deshalb scheint Arg130 kein Arginin-Finger zu sein. Zusätzlich war die GTP-Hydrolyse von atToc33 wt zu langsam im Vergleich zu anderen aktivierten GTPasen, was gezeigt hat, dass im atToc33 Dimer nicht ein Monomer als GAP für das andere Monomer dient.

Im Gegensatz dazu scheint der mutmassliche Arginin-Finger für die Dimerisierung von atToc33 essentiell zu sein. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass Arg130 an der Heterodimerisierung zwischen atToc33 und atToc159 beteiligt ist.

Wie die Kristall-Struktur gezeigt hat, homodimerisiert psToc34 bevorzugt in GDP-gebundener Form. AtToc33, das orthologe *Arabidopsis* Protein zu psToc34, bildet Homodimere ebenfalls bevorzugt in GDP-gebundener Form.

Toc159 kommt nicht nur in Membran-gebundener Form, sondern auch in löslicher Form im Cytosol vor. Es wurde gezeigt, dass Toc34 der Rezeptor für die lösliche Form von Toc159 ist. Eine analoge Situation findet sich an der ER-Membran, wo SR α als Rezeptor für SRP (Signalerkennungs-Partikel) dient. Die Interaktion zwischen Toc34 und Toc159 ist essentiell für die Chloroplastenbiogenese *in vivo* und scheint deshalb eine sehr wichtige Rolle im Import von Vorläuferproteinen in Chloroplasten zu spielen. Wir zeigen, dass atToc33 und atToc159 bevorzugt in GDP-gebundener Form interagieren. Dies weist darauf hin, dass vermutlich die GTP-Hydrolyse eine Voraussetzung für eine stabile Interaktion zwischen atToc33 und atToc159 ist.