

Membrantransport

Die äußere Chloroplastenmembran – kein passives Sieb für Metabolite!

BETTINA BÖLTER, FRANZ HAGN

FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE, PFLANZENWISSENSCHAFTEN, LMU MÜNCHEN,
PLANEGG-MARTINSRIED

BAYERISCHES NMR ZENTRUM (BNMRZ), DEPARTMENT OF BIOSCIENCE, TUM SCHOOL
OF NATURAL SCIENCES, TU MÜNCHEN, GARCHING

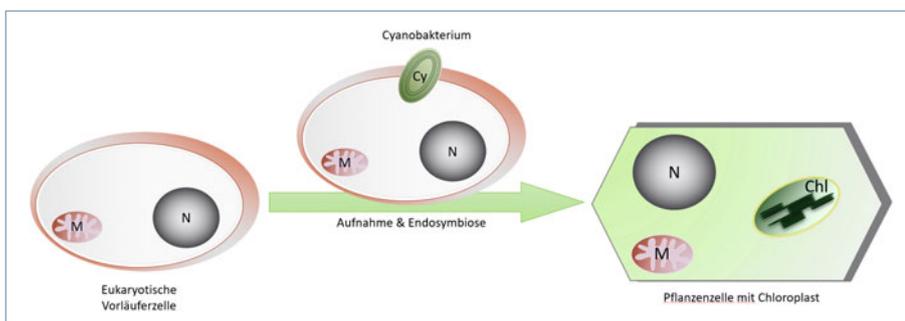
Chloroplasts are essential for energy production and metabolism in plants. Metabolites need to be transported across the two envelope membranes of the chloroplast. In contrast to the inner envelope, we know little about the properties of the outer envelope. We here summarize structural and functional insights on the prototype outer envelope channel OEP21 suggesting that these channels have a distinct level of selectivity, opposing the idea of acting as more simple and passive molecular sieves.

DOI: 10.1007/s12268-023-1983-y
© Die Autorinnen und Autoren 2023

■ Zu Beginn seiner Existenz bot Planet Erde ein völlig anderes Bild, als wir es heute kennen – kahl und lebensfeindlich. Die Entwicklung der oxygenen Photosynthese in den Vorläufern heutiger Cyanobakterien vor ca. 2,3 Milliarden Jahren [1] ermöglichte die Entstehung einer riesigen Diversität von sauerstoffabhängigen Organismen, die im Laufe der Evolution immer komplexer wurden.

Pflanzen begannen ihren Siegeszug über die Erde vor ca. einer Milliarde Jahren, als ein bereits eukaryotischer Urahn ein photosynthetisches Cyanobakterium aufnahm, und dieses über die Zeit in die Wirtszelle fest

integriert wurde. Am Ende dieses als Endosymbiose bezeichneten Prozesses stand der heutige Chloroplast (**Abb. 1**). Dieses neu erworbene Organell ist wie seine Vorfahren von zwei Membranen umgeben, der äußeren und der inneren Chloroplastenmembran. Um das Prinzip der Arbeitsteilung zwischen den Kompartimenten in einer Pflanzenzelle optimal zu nutzen, mussten diverse Transportprozesse über diese Membranen entwickelt werden. Zu diesem Zweck übernahm die Zelle teilweise bereits vorhandene cyanobakterielle Mechanismen und Proteine, zum Teil wurden neue, eukaryotische Elemente in den



▲ **Abb. 1:** Entstehung der photosynthetischen Eukaryoten. Eine eukaryotische Vorläuferzelle, die bereits Nucleus (N) und Mitochondrien (M) enthält, nimmt ein Cyanobakterium (Cy) auf. Dieses wird im Laufe der Evolution als Endosymbiont in den Organismus integriert und wird letztlich zum Chloroplasten, dem charakteristischen Organell aller photosynthetischen Eukaryoten.

Chloroplasten etabliert [2]. Der Transport von Metaboliten muss in beide Richtungen streng kontrolliert werden, um jederzeit dem Bedarf der Zelle sowie dem der gesamten Pflanze gerecht werden zu können. Lange hielt sich die Lehrmeinung, dass die Regulation von Transportprozessen ausschließlich an der inneren Membran erfolgt, während die äußere eine siebartige Struktur aufweist und den Durchtritt von Stoffen lediglich hinsichtlich ihrer Größe kontrolliert. Diese Ansicht begann sich vor einiger Zeit aufgrund neuer Erkenntnisse zu wandeln [3].

Die Familie der Porine in Chloroplasten

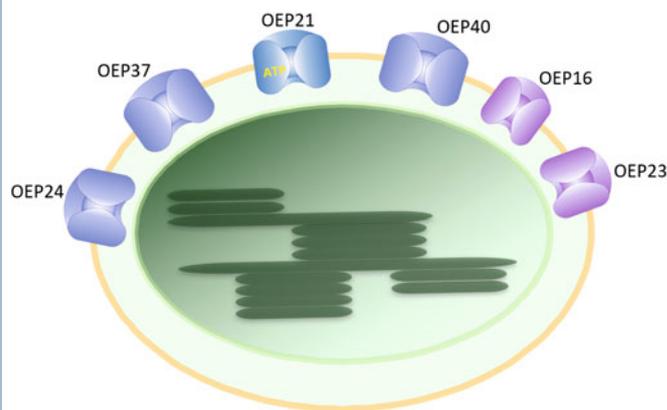
Schon in den bakteriellen Vorfahren der Chloroplasten sitzen in der äußeren Membran Kanalproteine, die als Porine bezeichnet werden [4]. Strukturelle Analoge finden sich auch in den rezenten pflanzlichen Organellen, die entsprechend ihrer Lokalisation OEPs genannt werden (*outer envelope proteins*). Typischerweise bestehen Porine aus 8-24 transmembranen β -Faltblatt Strängen, die eine Pore bzw. einen Kanal bilden (β -barrel) [5]. Die bakteriellen Vertreter der Porine werden in drei Klassen aufgeteilt: 1. Generelle Porine, die als unspezifische größen-selektive Poren fungieren, d. h. tatsächlich wie ein Sieb; 2. Substratspezifische Porine, die eine geringe Affinität zu ihrem Cargo aufweisen und 3. Liganden-regulierte energieabhängige Porine mit hoher Affinität zum Substrat [6, 7]. Schon in diesen ursprünglichen Organismen gibt es also stoffspezifische, regulierte Porenproteine in der äußeren Membran. In Chloroplasten findet sich dort eine relativ hohe Anzahl an verschiedenen Porinen und anderen Transportproteinen [8], die OEPs, deren Substratspezifität noch relativ unklar ist (**Abb. 2**). Die Menge der einzelnen OEPs (v. a. OEP16, OEP21, OEP23, OEP24, OEP37, OEP40) in der Membran scheint von der photosynthetischen Leistung der Pflanze abzuhängen. So sind in schnellwachsenden Pflanzen, wie z. B. dem Mais, die größeren Porine stärker vertreten als in langsamer wachsenden

Pflanzen, wie z. B. der Erbse [9]. Das am besten charakterisierte OEP ist OEP21.

OEP21 – ein Paradebeispiel für ein substratspezifisches und reguliertes Porin

Unsere Arbeit an OEP21, einem OEP mit 21 kDa Molekulargewicht, begann vor 25 Jahren. Zunächst wurde das Protein biochemisch und elektrophysiologisch charakterisiert. Die biochemischen Untersuchungen ergaben, dass OEP21 wie ein klassisches Porin Multimere in der Membran bilden kann und mittels eines spezifischen konservierten Aminosäuremotivs ATP zu binden vermag (**Abb. 3**). Die elektrophysiologischen Studien an heterolog exprimiertem Protein in artifizialen Lipiddoppelschichten zeigten, dass OEP21 einen Anionen-selektiven Kanal bildet, der in eine Richtung rektifizierend ist, d. h. eine präferierte Transportrichtung hat, und u. a. Triosephosphate (TP, Primärprodukt der Photosynthese) transportiert. Diese Eigenschaften werden durch die Anwesenheit von ATP beeinflusst [10, 11]. Die Daten

► **Abb. 2:** Die Porine in der äußeren Chloroplastenmembran. Schematische Darstellung der bisher identifizierten OEPs. Die β -barrel-Strukturen sind in Blautönen, die α -helikalen Proteine in violett dargestellt. Zahlen repräsentieren das Molekulargewicht.



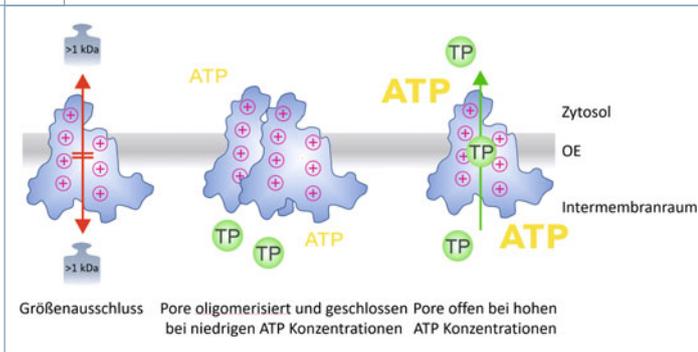
wiesen bereits damals darauf hin, dass OEP21 eine wichtige Rolle im Transport von primären Photosyntheseassimilaten spielt und abhängig von der Energieladung der Zelle und des Chloroplasten reguliert wird.

Vor kurzem konnten wir nun durch die Strukturbestimmung mit NMR-Spektroskopie zeigen, dass OEP21 ein trichterförmiges β -barrel aus 12 β -Strängen mit einer stark positiv geladenen inneren Porenoberfläche bildet [12]. Diese strukturellen Details, sowie der ca. 1 nm große Durchmesser der OEP21-Pore stimmen mit den elektrophysiologischen Messungen gut überein, in denen der

Kanal als Anionen-selektiv charakterisiert wurde [10]. Ebenso konnte die nach außen rektifizierende Eigenschaft von OEP21 anhand der Struktur bestätigt werden, da die breitere Öffnung des Trichters zum Intermembranraum gerichtet ist, sodass TP aus dem Chloroplasten in Richtung Cytosol kanalisiert werden können. Eine systematische Analyse möglicher weiterer Substrate ergab, dass OEP21 Metabolite neben der negativen Ladung in erster Linie nach Größe diskriminiert. Moleküle mit einem Molekulargewicht größer als 1 kDa können die Pore nicht passieren [12]. Weitere Experimente bestätigten

Hier steht eine Anzeige.

 Springer



◀ **Abb. 3:** Struktur und Regulation von OEP21. Schematische Darstellung der Funktionalität der OEP21-Pore unter verschiedenen Bedingungen: Die Pore diskriminiert Metabolite > 1 kDa; OEP21 liegt bei geringen ATP-Konzentrationen als Oligomer mit geringer Transportaktivität vor; bei hohen ATP-Konzentrationen ist die Pore offen und Triosephosphat (TP) kann effizient vom Intermembranraum ins Cytosol transportiert werden. OE: *outer envelope*, äußere Membran.

die dynamische Oligomerisierung von OEP21 in der Membran, die funktionell zur Regulation der Transportaktivität beiträgt. Mit NMR-Experimenten und Molekulardynamik-Simulationen konnte der Bindungsmodus des Liganden ATP und des Substrats GAP (Glycerinaldehyd-3-phosphat, ein TP) sowie der Transportprozess des Substrats durch die Pore verfolgt werden: GAP durchquert den Kanal im Mikro- bis Millisekundenbereich mittels transientser Interaktionen mit den positiv geladenen Aminosäuren innerhalb der Pore – es hüpfert gleichsam von einer Stelle zur nächsten, bis es auf der anderen Membranseite ankommt und dort über ein dynamisches Strukturelement ins Cytosol entlassen wird.

Insgesamt konnten sämtliche vorherigen Daten bestätigt und ein aktualisiertes detailliertes Modell der Funktion von OEP21 in der äußeren Chloroplastenmembran erstellt werden. Die Bindung von ATP an OEP21 führt zur Stabilisierung der Pore und damit zur Erhaltung des aktiven Zustands, somit übernimmt das Nukleotid eine regulatorische Aufgabe. Physiologisch betrachtet ergibt sich folgendes Szenario: Unter Bedingungen der aktiven Photosynthese, wenn TP im Cytosol z. B. zur Saccharosesynthese schnell umgesetzt werden und eine hohe Energieladung vorliegt, ist OEP21 aktiv und transportiert GAP aus dem Organell. Wird die Verwertung der TP limitierend (z. B. nachts) und die ATP-Konzentration sinkt, wird die Pore geschlossen und somit der Export weiterer TPs verhindert. OEP21 lässt sich daher in die oben genannte zweite Klasse der Porine einordnen, die eine Spezifität für gewisse Substrate aufweisen. Zusätzlich zeichnet sich OEP21 durch Liganden-vermittelte Regulation aus, wenn auch energieunabhängig.

Offensichtlich ist der Fluss von Metaboliten zwischen Chloroplasten und umgebender Zelle nicht nur auf der Ebene der inneren Membran strikt reguliert, sondern auch die Porine in der äußeren Membran tragen entscheidend zur Erhaltung der zellulären Homöostase bei. Eine funktionelle Relevanz dieser einzelnen Transportproteine lässt sich auch über die relativ große Zahl verschiede-

ner Porine in der äußeren Membran ableiten. Aufgrund dieser Erkenntnisse erscheint die Hypothese, die äußere Chloroplastenmembran sei ein molekulares Sieb mit permanent offenen Poren, mehr als unwahrscheinlich.

Ausblick

Wie die verschiedenen Transportproteine zur funktionalen Eigenschaft der äußeren Membran beitragen und ob es Redundanzen in ihrem Substratrepertoire gibt, muss in künftigen Studien gezeigt werden. Für die Klärung dieser fundamentalen Fragen ist das Zusammenspiel von Strukturbiologie und biochemischen und funktionellen Studien in Pflanzen essenziell. Es würde nicht überraschen, wenn sich die äußere Hüllmembran als komplexere und reguliertere Barriere für Metabolite erweisen würde als gedacht. ■

Literatur

- [1] Gould SB, Waller RF, McFadden GI (2008) Plastid Evolution. *Annual Review of Plant Biology* 59: 491–517
- [2] Heins L, Soll J (1998) Chloroplast biogenesis: mixing the prokaryotic and the eukaryotic? *Curr Biol* 8: R215–217
- [3] Soll J, Bölder B, Wagner R, Honnath SC (2000)...response: the chloroplast outer envelope: a molecular sieve? *Trends Plant Sci* 5: 137–138
- [4] Benz R (1988) Structure and Function of Porins from Gram-Negative Bacteria. *Ann Rev Microbiol* 42: 359–393
- [5] Duy D, Soll J, Philipp K (2007) Solute channels of the outer membrane: from bacteria to chloroplasts. *Biol Chem* 388: 879–889
- [6] Klebba PE, Newton SMC (1998) Mechanisms of solute transport through outer membrane porins: burning down the house. *Curr Opin Microbiol* 1: 238–247
- [7] Vergalli J, Bodrenki IV, Masi M et al. (2020) Porins and small-molecule translocation across the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* 18: 164–176

- [8] Barth MA, Soll J, Akbaş Ş (2022) Prokaryotic and eukaryotic traits support the biological role of the chloroplast outer envelope. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1869: 119224
- [9] Bräutigam A, Hoffmann-Benning S, Weber APM (2008) Comparative Proteomics of Chloroplast Envelopes from C3 and C4 Plants Reveals Specific Adaptations of the Plastid Envelope to C4 Photosynthesis and Candidate Proteins Required for Maintaining C4 Metabolite Fluxes. *Plant Physiol* 148: 568–579
- [10] Bölder B, Soll J, Hill K et al. (1999) A rectifying ATP-regulated solute channel in the chloroplast outer envelope from pea. *EMBO J* 18: 5505–5516
- [11] Hemmler R, Becker T, Schleiff E et al. (2006) Molecular properties of OEP21, an ATP-regulated anion-selective solute channel from the outer chloroplast membrane. *J Biol Chem* 281: 12020–12029
- [12] Günzel U, Klöpffer K, Häusler E et al. (2023) Structural basis of metabolite transport by the chloroplast outer envelope channel OEP21. *Nat Struct Mol Biol* 30: 761–769

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadressen:

PD Dr. Bettina Bölder
 Fakultät für Biologie, Pflanzenwissenschaften
 Ludwigs-Maximilians-Universität München
 Großhadernerstraße 2-4
 D-82152 Planegg-Martinsried
 bettina.boelter@lmu.de

Prof. Dr. Franz Hagn
 Professur für Strukturelle Membranbiochemie
 School of Natural Sciences, Dept. Bioscience
 Technische Universität München
 Ernst-Otto-Fischer-Straße 2
 D-85748 Garching b. München
 franz.hagn@tum.de

AUTORINNEN UND AUTOREN



Bettina Bölder

Biologiestudium an der Universität Kiel. 2000 Promotion bei Prof. Dr. J. Soll. 2001–2003 Postdoc am Max-Planck-Institut für Biochemie bei Prof. Dr. F. U. Hartl, Martinsried. 2003–2004 Leitung der Molekularen Diagnostik am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Lübeck. 2004–2010 Akademische Rätin an der LMU München. 2010 Habilitation. Seit 2010 Akademische Oberrätin an der LMU München.



Franz Hagn

Biochemiestudium. 2009 Promotion, bei Prof. Dr. H. Kessler. 2009–2014 PostDoc, an der Harvard Medical School, Boston, MA, USA. 2014–2020 Rudolf-Mössbauer Assistant Professor an TU München. 2015–2020 Helmholtz Young Investigators Gruppenleiter, Institut für Strukturbiologie, Helmholtz Zentrum München. Seit 2020 Professor im Department of Bioscience an der TU München sowie Gruppenleiter „Membranprotein NMR“, Institut für Strukturbiologie am Helmholtz Zentrum München.