

" Untersuchungen zur Organellespezifität des Proteintransports
in eukaryotischen Pflanzenzellen am Beispiel von Cytochrom c1 "

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



von

Anja Rödiger

geboren am 06.09.1979 in Karl-Marx-Stadt

Gutachter:

1. Prof. Dr. Ralf Bernd Klösgen
2. Prof. Dr. Sacha Baginsky
3. Prof. Dr. Thomas Börner

Halle (Saale), 31. Mai 2010

*In der Wissenschaft beginnt alles Neue damit,
dass jemand brummt »Hmmm... ist ja komisch.«*

Isaac Asimov

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	1
Zusammenfassung	5
Abkürzungsverzeichnis.....	7
Abbildungsverzeichnis.....	10
Tabellenverzeichnis.....	12
1 Einleitung	13
1.1 Endosymbiose bei Pflanzen.....	13
1.2 Mitochondrien und der mitochondrielle Proteintransport	15
1.3 Chloroplasten und der plastidäre Proteintransport	18
1.4 Dual Targeting.....	21
1.5 Cytochrom c1	24
1.6 Zielstellung	26
2 Material und Methoden	27
2.1 Material	27
2.1.1 Chemikalien	27
2.1.2 Größenstandards (Marker)	27
2.1.3 Nukleinsäuren und Oligonukleotide	27
2.1.4 Enzyme	28
2.1.5 Antibiotika	28
2.1.6 Antikörper.....	28
2.1.7 Bakterienstämme.....	29
2.1.8 Vektoren.....	29
2.1.9 cDNA-Klone	30
2.1.10 cDNA-Klone dieser Arbeit.....	30
2.1.11 Pflanzenmaterial	30
2.1.12 Geräte und Zubehör	31
2.2 Molekularbiologische Methoden	31
2.2.1 Standardmethoden	31
2.2.2 Molekularbiologische Kits	31
2.2.3 Herstellung der Plasmide zur Proteinsynthese.....	32
2.2.3.1 Klonierung von Reporterfusionen	32
2.2.3.2 Expression von Cytochrom c1.....	33
2.3 Proteinbiochemische Methoden.....	33
2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	33
2.3.2 Native Gelelektrophorese solubilisierter Membranproteine (BN-PAGE).....	34
2.3.3 Proteinfärbung	35

2.3.3.1	Coomassiefärbung und Autoradiographie	35
2.3.3.2	Coomassie-Colloidal-Färbung	35
2.3.4	ECL-Western Blot Analyse	35
2.3.5	Heterologe Expression von Proteinen	37
2.3.5.1	Analytische Proteinexpression	37
2.3.5.2	Präparative Proteinexpression	38
2.3.5.3	Reinigung heterologer His ₆ -Proteine durch Ni ²⁺ -NTA-Affinitätschromatographie	39
2.3.6	Antikörperproduktion	40
2.4	Methoden zur <i>in vitro</i> Analyse von Proteinen	40
2.4.1	Gemeinsame Präparation von Mitochondrien und Chloroplasten aus Erbse (<i>Pisum sativum</i> L.)	40
2.4.2	Fraktionierung von Mitochondrien	43
2.4.3	Fraktionierung von Chloroplasten	43
2.4.4	Solubilisierung organellärer Proteine	44
2.4.5	Gemeinsame Präparation von Mitochondrien und Chloroplasten aus Spinat (<i>Spinacia oleracea</i> L.)	45
2.4.6	Gemeinsame Präparation von Mitochondrien und Chloroplasten aus Kartoffel (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	46
2.4.7	<i>In vitro</i> Transkription	46
2.4.8	<i>In vitro</i> Translation	47
2.4.8.1	Translation mittels Reticulocytenlysat	47
2.4.8.2	Translation mittels Weizenkeimextrakt	47
2.4.9	<i>In vitro</i> Import	48
2.4.9.1	Standardansatz	49
2.4.9.2	Gemischter Ansatz	49
2.4.9.3	Ionophoren-Ansätze (Nigericin, Valinomycin)	50
2.4.9.4	Kompetitionsansätze	51
2.5	Methoden zur <i>in vivo</i> Analyse von Proteinen	51
2.5.1	Biolistische Transformation	51
2.5.2	Mikroskopie	52
2.6	Auswertung der Daten	53
2.6.1	Datenverarbeitung	53
2.6.2	Auswertung der mikroskopischen Bilder	53
3	Ergebnisse	55
3.1	Gemeinsame Präparation importkompetenter Mitochondrien und Chloroplasten aus Blattgewebe	55
3.1.1	Methodenetablierung	55
3.1.2	Identität und Reinheit der isolierten Organellen	56
3.1.3	Importkompetenz der isolierten Organellen	59
3.2	Gemischter Importansatz	62

3.2.1	Methode	62
3.2.2	Organellquantität <i>in vitro</i> vs. <i>in vivo</i>	64
3.2.3	Gemischter Import und Einzelimport im Vergleich	65
3.3	Vorhersage der subzellulären Lokalisierung von Cytochrom c1	67
3.4	Kontrollen für echten Organelltransport	68
3.4.1	Ionophore/Entkoppler	68
3.4.2	Retikulocytenlysate vs. Weizenkeimextrakt	72
3.5	Suborganelläre Lokalisierung	73
3.5.1	Methodenentwicklung	73
3.5.2	Import von Cytochrom c1 und anschließende Fraktionierung der Mitochondrien bzw. Chloroplasten	75
3.5.3	Stromaprozessierung	76
3.5.4	Assemblierungsverhalten	77
3.6	Kompetitionsexperimente	79
3.6.1	Kompetitor OEC33	80
3.6.2	Kompetitor FNR	82
3.6.3	Kompetitor Cytochrom c1	83
3.6.4	Kompetitionen im Vergleich	84
3.7	Mitochondrieller und chloroplastidärer Import von Cytochrom c1 im Vergleich	85
3.7.1	Einfluss der Menge an Translation	85
3.7.2	Stabilität der importierten Proteine innerhalb der Organellen	87
3.7.3	<i>In vitro</i> Zeitreihe	88
3.8	Physiologie	90
3.8.1	Organellen aus Spinat	90
3.8.2	Einfluss des Alters der Pflanzen	91
3.8.3	Cytochrom c1 Antikörper	94
3.9	Reporterfusionen von Cytochrom c1	98
3.9.1	Erstellen der Reporterfusionen	98
3.9.2	<i>In vitro</i> Transportverhalten der Reporterfusionen	100
3.10	Transiente Expression – <i>In vivo</i> Analysen	101
3.10.1	Transformation mit Cytochrom c1/Reporter-Fusionen	102
3.10.2	Co-Transformation mit FNR/ECFP	107
3.10.3	<i>In vivo</i> Zeitreihe	108
4	Diskussion	111
4.1	Experimenteller Ansatz	111
4.1.1	Mitochondrien und Chloroplasten können aus einem Ansatz präpariert werden	111
4.1.2	<i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Analysen sollten komplementierend durchgeführt werden	112
4.2	Mitochondrieller Import von Cytochrom c1 aus <i>Solanum tuberosum</i>	113
4.3	Cytochrom c1 wird ebenfalls in die Chloroplasten importiert	114
4.3.1	Der plastidäre Import basiert nicht auf <i>mis-targeting</i>	114
4.3.2	Cytochrom c1 verhält sich wie ein authentisches plastidäres Protein	115

4.4	Spezielle Eigenschaften von Cytochrom c1 als duales Protein.....	117
4.4.1	Mitochondrieller und plastidärer Transport von Cytochrom c1 im Vergleich.....	117
4.4.2	Cytochrom c1 wird in Mitochondrien und Chloroplasten unterschiedlich prozessiert	118
4.4.3	Cytochrom c1 ist im Stroma der Plastiden lokalisiert	118
4.4.4	Physiologische Aspekte beeinflussen den Transport.....	119
4.4.5	Weizenkeimextrakt hat einen inhibierenden Effekt auf den Import von Cytochrom c1.....	121
4.4.6	Das Transportsignal von Cytochrom c1 bedingt das <i>dual targeting</i>	122
4.5	Warum zeigt Cytochrom c1 <i>dual targeting</i> ?.....	123
4.6	Zusammenfassendes Modell zum Transport von Cytochrom c1	126
	Literaturverzeichnis	127
	Danksagung	138
	Publikationen	139
	Lebenslauf	140
	Erklärung	141

ZUSAMMENFASSUNG

Eine Methode zur gemeinsamen Präparation intakter Mitochondrien und Chloroplasten wurde für Organellen aus Erbsenkeimlingen etabliert. Durch die Isolierung der Mitochondrien und Chloroplasten aus demselben Ansatz ist die Vergleichbarkeit des Organelltransports von Vorläuferproteinen gewährleistet. Die Identität und Reinheit der präparierten Organellen konnte durch mikroskopische Untersuchungen sowie durch Western Analysen unter Verwendung spezifischer Antiseren gegen mitochondrielle bzw. chloroplastidäre Proteine gezeigt werden. Die Importkompetenz wurde zudem *in vitro* mit verschiedenen Vorläuferproteinen überprüft. Das Protokoll konnte ebenfalls für Mitochondrien und Chloroplasten aus Kartoffel und, mit einigen Modifizierungen, aus Spinat angewandt werden. Da *in vitro* Experimente mit isolierten Organellen zwangsläufig nicht alle Faktoren berücksichtigen können und beispielsweise den möglichen Einfluss des Cytosols auf den Proteintransport unbeachtet lassen, war es notwendig, ein komplementierendes *in vivo* System zur Analyse des Transportverhaltens kerncodierter Organellproteine einzusetzen. Die *in vivo* Transportexperimente wurden mittels biolistischer Transformationsmethode zur transienten Transformation von Pflanzengewebe durchgeführt.

Die Ergebnisse der Transportexperimente mit dem kerncodierten, mitochondrialen Cytochrom c1 waren durchaus unerwartet. Dieses Protein war eigentlich als Kontrollprotein für einen ausschließlich mitochondrialen Proteintransport vorgesehen.

Tatsächlich wird das Protein in den *in vitro* Transportversuchen mit isolierten Organellen aber nicht nur in Mitochondrien, sondern auch in Chloroplasten importiert. Dabei spielt es keine Rolle, ob die beiden Organellen dem Protein im Versuchsansatz getrennt oder gemischt angeboten werden. In den beiden Organellen wird Cytochrom c1 an jeweils unterschiedlichen Positionen prozessiert, sodass die in Mitochondrien bzw. Chloroplasten akkumulierenden Produkte eindeutig zu unterscheiden sind. Umfangreiche Versuchsreihen konnten unter anderem zeigen, dass der Transport von Cytochrom c1 in die Chloroplasten offenbar über die generelle Importmaschinerie für kerncodierte Chloroplastenproteine verläuft. Allerdings akkumuliert das Protein in den Chloroplasten in der Stromafraktion und eine Assemblierung in Proteinkomplexe konnte nicht nachgewiesen werden. Ob Cytochrom c1 überhaupt eine Funktion in Plastiden übernimmt oder dort nur eine Zeitlang toleriert wird, ist bislang noch völlig unbekannt.

Gerade wegen dieser unerwarteten Ergebnisse in den *in vitro* Versuchen war es notwendig, die Transporteigenschaften von Cytochrom c1 auch *in vivo* zu überprüfen. Dazu wurden mehrere Reportergenkonstruktionen erstellt, die jeweils unterschiedliche Fusionsproteine aus Cytochrom c1 und EYFP codieren. Die Fusionsproteine wurden zunächst mit *in vitro* Transportexperimenten auf ihre Befähigung zum Organelltransport überprüft. Gerade das Ergebnis von c1(1-141)/EYFP (ein Fragment aus Präsequenz plus 64 Aminosäuren des reifen Proteins mit EYFP verknüpft) zeigt, dass das Transportsignal von Cytochrom c1 in der Lage ist, sogar Fremdproteine in beide Organellen zu dirigieren. Diese Fähigkeit des Transportsignals konnte schließlich auch in den komplementierenden *in vivo* Untersuchungen bestätigt werden. Nach biolistischer Transformation von Erbsenblättern findet sich das gelb fluoreszierende Protein sowohl in den Mitochondrien als auch in den Plastiden der transgenen Zellen, d.h. das Transportsignal von Cytochrom c1 ist offensichtlich in der Lage, mit den Proteintransportmaschinerien beider endosymbiontischer Organellen zu interagieren und den Transport des anhängenden Passagierproteins in beide Organellen zu vermitteln.

Um die tatsächliche subzelluläre Lokalisierung auch unabhängig von *in vitro* Transportversuchen bzw. Reporterproteinen bestimmen zu können, wurde ein Antiserum gegen Cytochrom c1 gewonnen. Erste Western Analysen deuten auf eine mitochondrielle und chloroplastidäre Lokalisierung dieses Proteins in verschiedenen Pflanzen hin.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

30/31 kDa Protein	Untereinheit des Komplex I der Atmungskette (mitochondriell)
75 kDa Protein	Untereinheit des Komplex I der Atmungskette (mitochondriell)
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Amp ^R	Resistenz gegen Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
CFoII	Untereinheit II des Fo-Teils der ATP-Synthase (plastidär)
COXII	Cytochrom Oxidase Untereinheit II (mitochondriell)
Cytc1	Cytochrom c1-Protein des Cytochrom bc1-Komplexes (mitochondriell)
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure (cDNA - komplementäre DNA)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EB	Extraktionspuffer
ECFP/ CFP	<i>Enhanced Cyan Fluorescent Protein</i>
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP/ GFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)-tetraessigsäure
EYFP/ YFP	<i>Enhanced Yellow Fluorescent Protein</i>
FNR	Ferredoxin-NADPH-Oxidoreduktase (plastidär)
GDC	H-Protein des Glycindecarboxylasekomplexes (mitochondriell)
GIP	<i>General import pore</i>
HEPES	N-2-Hydroxymethylenpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
His6	Hexa-Histidin-tag
Hsp	<i>Heat shock protein</i>
Hsp60	60 kDa Hsp (mitochondriell)
IB	<i>Inclusion bodies</i> (Einschlusskörper)
ldh	Isocitratdehydrogenase (mitochondriell)
IgG	Immunglobulin G
IM	<i>Inner membrane</i>
IMS	<i>Inter membrane space</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid

Kan ^r	Resistenz gegen Kanamycin
LB	Luria-Bertani Medium
CLSM	<i>Confocal laser scanning microscopy</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MPP	Mitochondrielle Matrix-Prozessierungspeptidase
OD _x	Optische Dichte bei der Wellenlänge x
OEC16	16 kDa Untereinheit des Wasserspaltungsapparates (plastidär)
OEC23	23 kDa Untereinheit des Wasserspaltungsapparates (plastidär)
OEC33	33 kDa Untereinheit des Wasserspaltungsapparates (plastidär)
OM	<i>Outer membrane</i>
p.a.	für die Analyse (<i>pro analysi</i>)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS; BN - <i>Blue Native</i>)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
pmf	<i>Protone motive force</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RB	Resuspensionspuffer
RNA	Ribonukleinsäure (mRNA - <i>messenger</i> (Boten-) RNA) tRNA
RT	Raumtemperatur
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec	Sekretorisch (<i>Secretory</i>)
SET	<i>Serielle Endosymbiontentheorie</i>
SPP	Stromale Prozessierungspeptidase
SRM	Sorbitolresuspensionsmedium
SRP	<i>Signal recognition particle</i>
SSU	<i>Small subunit of Rubisco</i> (plastidär)
TAT	<i>Twin arginine translocase</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tic	Protein des TIC-Komplexes
TIC	<i>Translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts</i>
Tim	Protein des TIM-Komplexes
TIM	<i>Translocon at the inner envelope membrane of mitochondria</i>
T _m	Schmelztemperatur (<i>melting temperature</i>)
Toc	Protein des TOC-Komplexes
TOC	<i>Translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts</i>
Toc33	33 kDa Rezeptoruntereinheit des TOC-Komplexes (plastidär)

Tom	Protein des TOM-Komplexes
TOM	<i>Translocon at the outer envelope membrane of mitochondria</i>
TPP	Thylakoidprozessierungspeptidase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	Volumen zu Volumen - Verhältnis
vs.	versus, lateinisch für: gegen, gegenübergestellt
w/v	Gewicht zu Volumen - Verhältnis
WB	Waschpuffer
Δ pH	Protonengradient
$\Delta\Psi$	Membranpotential (Psi)

Einbuchstaben- und (Dreibuchstaben-) Code der Aminosäuren

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

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1:	Proteintransport innerhalb von Pflanzenzellen	14
Abb. 1.2:	Transportsignale für eine duale Lokalisierung von Proteinen.....	21
Abb. 1.3:	Die mitochondrielle Atmungskette	24
Abb. 1.4:	Sequenz und Strukturelle Eigenschaften von Cytochrom c1 aus <i>Solanum tuberosum</i> ...	25
Abb. 2.1:	Klonierungsstrategie für die Reporterfusionen	32
Abb. 2.2:	Klonierung von Cytochrom c1 in den Expressionsvektor	33
Abb. 2.3:	Bearbeitung mikroskopischer Bilder	54
Abb. 3.1:	Parallelpräparation von Mitochondrien und Chloroplasten aus <i>Pisum sativum</i>	55
Abb. 3.2:	Mikroskopie der isolierten Organellen	57
Abb. 3.3:	Identität und Reinheit der präparierten Organellen aus <i>Pisum sativum</i>	58
Abb. 3.4:	Durchführung eines <i>in vitro</i> Imports.....	60
Abb. 3.5:	Import von <i>in vitro</i> translatierten Vorläuferproteinen in isolierte Organellen.....	61
Abb. 3.6:	Schematische Darstellung des gemischten <i>in vitro</i> Imports	63
Abb. 3.7:	Identität und Reinheit nach Reisolierung im Vergleich zu präparierten Organellen	64
Abb. 3.8:	Organellverhältnis <i>in vitro</i> vs. <i>in vivo</i>	65
Abb. 3.9:	Gemischter Import vs. Einzelimport.....	66
Abb. 3.10:	Verschiedene Vorhersageprogramme zur subzellulären Lokalisierung von Cytochrom c1 aus <i>Solanum tuberosum</i>	67
Abb. 3.11:	Der Einfluss von Ionophoren auf den Proteintransport.....	69
Abb. 3.12:	Der Einfluss von Ionophoren auf den <i>in vitro</i> Import von OEC23.....	70
Abb. 3.13:	Der Einfluss von Ionophoren auf den <i>in vitro</i> Import von Cytochrom c1	70
Abb. 3.14:	Quantifizierung der Ionophorensätze.....	71
Abb. 3.15:	Verschiedene Translationssysteme.....	72
Abb. 3.16:	Fraktionierung von Mitochondrien über Gefrier-Tau-Zyklen.....	74
Abb. 3.17:	Fraktionierung der Organellen nach Import.....	75
Abb. 3.18:	Stromaprozessierung.....	77
Abb. 3.19:	Assemblierungsverhalten von Cytochrom c1	78
Abb. 3.20:	Prinzip eines Konkurrenzexperimentes	79
Abb. 3.21:	Konkpetition des Imports von FNR mit OEC33	80
Abb. 3.22:	Konkpetition des Imports von OEC23 mit OEC33.....	81
Abb. 3.23:	Konkpetition des Imports von Cytochrom c1 mit OEC33	81
Abb. 3.24:	Überexprimierte FNR als Konkpetitor.....	82
Abb. 3.25:	Überexprimiertes Cytochrom c1 als Konkpetitor	83
Abb. 3.26:	Quantifizierung der Konkurrenzexperimente zum mitochondriellen Import	84
Abb. 3.27:	Quantifizierung der Konkurrenzexperimente zum chloroplastidären Import.....	84
Abb. 3.28:	Einfluss der Substratmenge.....	86

Abb. 3.29: Quantifizierung - Einfluss der Substratmenge	86
Abb. 3.30: Stabilität der Prozessierungsprodukte nach Import	87
Abb. 3.31: Quantifizierung - Stabilität der Prozessierungsprodukte nach Import	88
Abb. 3.32: Einfluss der Inkubationszeit auf die Importeffizienz	89
Abb. 3.33: Quantifizierung der Import-Zeitreihe	89
Abb. 3.34: Import von Cytochrom c1 in Spinatorganellen	90
Abb. 3.35: Effektivität des Imports von Cytochrom c1 in Mitochondrien und Chloroplasten	91
Abb. 3.36: Pflanzenmaterial für die Überprüfung des Alterseffektes auf den Import	92
Abb. 3.37: Einfluss des Alters auf die Importeffizienz	92
Abb. 3.38: Quantifizierung Alterseffekt	93
Abb. 3.39: Quantifizierung Alterseffekt	93
Abb. 3.40: Expression und Reinigung von Cytochrom c1	94
Abb. 3.41: Expression von Cyt c1-His6 in <i>E. coli</i>	95
Abb. 3.42: Fragmente der Massenspektrometrie	96
Abb. 3.43: Western-Analyse mit dem Antiserum gegen Cytochrom c1	97
Abb. 3.44: Übersicht der Cytochrom c1/Reporter-Fusionen	98
Abb. 3.45: Vektoren mit inseriertem Reporter zur Klonierung der Fusionen	99
Abb. 3.46: <i>In vitro</i> Import der Cytochrom c1-EYFP-Fusionen im Vergleich zum authentischen Cytochrom c1	100
Abb. 3.47: Prinzip der biolistischen Transformation	102
Abb. 3.48: Konfokale LSM – c1(1-77)/EYFP	103
Abb. 3.49: Konfokale LSM – c1(1-141)/EYFP	104
Abb. 3.50: Konfokale LSM – c1(1-141)/EYFP	105
Abb. 3.51: Konfokale LSM – c1(1-320)/EYFP	106
Abb. 3.52: Konfokale LSM – Co-Transformation mit c1(1-77)/EYFP und FNR/ECFP	107
Abb. 3.53: <i>In vivo</i> Zeitreihe von c1(1-77)/EYFP	109
Abb. 4.1: Schematische Darstellung des Transportes von Cytochrom c1 in die Organellen	126

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2.1: Baukasten zur Klonierung von Reporterfusionen.....	32
Tabelle 2.2: Mini-SDS-Gel (15 % AA).....	34
Tabelle 2.3: Midi-SDS-Gradientengel (10 – 17.5 % AA).....	34
Tabelle 2.4: BN-Gel.....	34
Tabelle 2.5: <i>in vitro</i> Transkriptionsansatz unter Nutzung des T3- bzw. des T7-Promotors.....	46
Tabelle 2.6: <i>in vitro</i> -Translationsansatz mit Reticulocytenlysät.....	47
Tabelle 2.7: <i>in vitro</i> -Translationsansatz mit Weizenkeimextrakt.....	48
Tabelle 2.8: Import-Mastermix.....	48
Tabelle 2.9: Standardimportansatz.....	49
Tabelle 2.10: Fließschema für die Durchführung des gemischten Importansatzes.....	50
Tabelle 2.11: Eingesetzte Ionophorenkonzentrationen.....	50
Tabelle 2.12: Eingesetzte Kompetitorproteine.....	51
Tabelle 2.13: Biolistische Transformation: Präzipitationsansatz.....	52

1 EINLEITUNG

1.1 Endosymbiose bei Pflanzen

Pflanzenzellen weisen viele Gemeinsamkeiten mit Zellen anderer eukaryontischer Organismen, wie Säugern und Pilzen, auf. Sie enthalten einen Zellkern, der den Hauptteil an genetischem Material enthält, sowie eine Vielzahl membranumschlossener Kompartimente, die Organellen. Daneben gibt es einige für Pflanzenzellen besondere Eigenschaften. Sie verfügen über zwei wichtige energieumwandelnde Organellen, Mitochondrien und Plastiden. Mitochondrien und Chloroplasten ähneln in ihrem Aufbau prokaryontischen Zellen. Sie besitzen eine eigene DNA, Ribosomen, die mit dem prokaryontischen Typ vergleichbar sind, sowie Faktoren für Transkription und Translation.

Es ist weitgehend akzeptiert, dass Mitochondrien und Plastiden Organellen endosymbiotischen Ursprungs sind (Margulis, 1970; Gray, 1999). Die serielle Endosymbiontentheorie (SET) besagt, dass Prokaryonten von einer Wirtszelle aufgenommen wurden, die vermutlich bereits einen Kern besaß (Lang et al., 1999), und als Zellorganellen integriert wurden. In Pflanzenzellen führten zwei unabhängige Endosymbioseereignisse zur Evolution dieser Organellen. Zuerst wurde ein aerobes Urpurpurbakterium (α -Proteobakterium) von der Wirtszelle aufgenommen und entwickelte sich zu den Mitochondrien. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde von dieser heterotrophen Wirtszelle ein photosynthetisch aktiver Prokaryot, ein Vorfahr heutiger Cyanobakterien, aufgenommen, woraus die Plastiden hervorgegangen sind. Mit der Integration der Organellen in die Wirtszelle verloren diese ihre Eigenständigkeit. Nach und nach ging der Großteil der genetischen Information der Endosymbionten verloren oder wurde in den Kern transferiert. Dennoch behielten die Organellen einen Teil ihrer genetischen Information (Gray et al., 1999; Leister, 2003), wodurch sie als semiautonome Systeme funktionieren. Die Umstrukturierung der Gene innerhalb der Wirtszelle ist als dynamischer Prozess zu betrachten, der bis heute andauert.

Als Folge dieses Prozesses entwickelten sich Mechanismen, um die kernkodierte organellären Proteine nach ihrer Synthese im Cytosol in das entsprechende Organell zurückzutransportieren (Abb. 1.1).

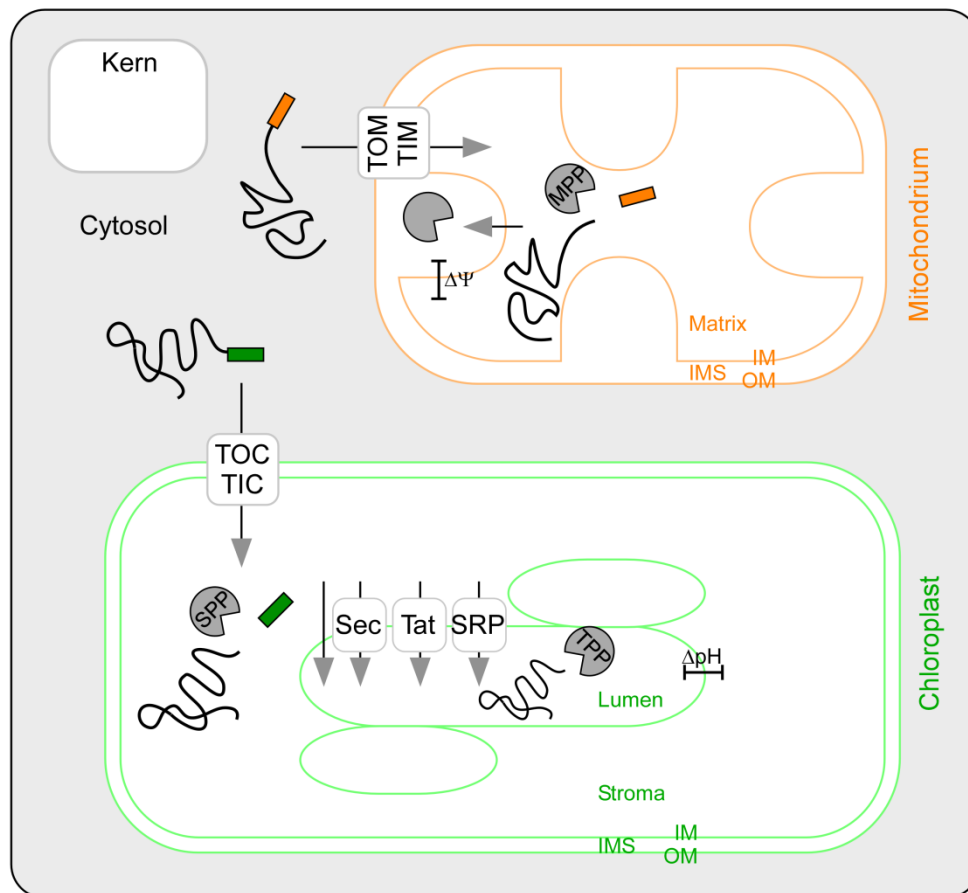


Abb. 1.1: Proteintransport innerhalb von Pflanzenzellen. Schematische Darstellung zum Transport kerncodierter Vorläuferproteine in die Mitochondrien und Chloroplasten. Eine detaillierte Beschreibung wird in den Abschnitten 1.2 und 1.3 gegeben.

[In der Abbildung wurden folgende Abkürzungen verwendet: IM – Innere Membran, IMS – Intermembranraum, MPP – mitochondrielle Matrix-Prozessierungspeptidase, OM – Äußere Membran, Sec – Sekretorischer Weg, SRP – SRP-abhängiger Weg, SPP – stromale Prozessierungspeptidase, Tat – $\Delta\text{pH}/\text{TAT}$ -abhängiger Weg, TIM/TOM – Translokone der inneren/äußeren mitochondrialen Membran, TIC/TOC – Translokone der inneren/äußeren chloroplastidären Membran, TPP – Thylakoidprozessierungspeptidase, ΔpH – Protonengradient, $\Delta\Psi$ – Membranpotential]

Für die intrazelluläre Sortierung verfügen die zu transportierenden Proteine über ein Transportsignal. Dieses Signal dient als Zieladresse für den entsprechenden Bestimmungsort. Im Cytosol werden die kerncodierten Proteine einschließlich des Transportsignals synthetisiert und als Vorläuferproteine bzw. *Precursor*-Proteine bezeichnet. Rezeptoren der Hüllmembranen der Organellen erkennen diese Signale und initiieren den weiteren Transport der Proteine. Wird das Transportsignal nach dem Import in das entsprechende Kompartiment abgespalten, bezeichnet man diesen Vorgang als Prozessierung. Die entstehenden reifen Proteine werden final entsprechend ihrer Funktion assembliert.

1.2 Mitochondrien und der mitochondrielle Proteintransport

Eine Pflanzenzelle besitzt im Durchschnitt mehrere Hundert Mitochondrien von ca. 1 µm Durchmesser. Die Form dieser Organellen kann stark variieren. Das Mitochondrium besteht aus zwei Hauptkompartimenten, dem Intermembranraum (IMS – *inter membrane space*) und der Matrix, die von zwei Membranen umschlossen sind, der äußeren (OM – *outer membrane*) und der inneren Membran (IM – *inner membrane*). Die OM enthält große Mengen des porenbildenden Proteins Porin, das die Membran permeabel für Proteine mit geringem Molekulargewicht (kleiner als 10 kDa) und Ionen macht. Die IM ist hoch impermeabel und Moleküle und Ionen müssen spezifische Translokatoren passieren. Die IM umfasst eine deutlich größere Oberfläche als die OM und bildet Einstülpungen, die *Cristae*, welche die Matrix einschließen. Elektronenmikroskopische Analysen zeigen, dass die *Cristae* mit der inneren Hüllmembran über tubuläre Strukturen, den sogenannten *cristae junctions*, verbunden sind (Frey and Mannella, 2000).

Kerncodierte mitochondrielle Proteine werden in zwei Hauptgruppen eingeordnet. Die Proteine der einen Gruppe, zu der viele hydrophobe Membranproteine zählen, werden ohne abspaltbare Verlängerung synthetisiert. Die in die Mitochondrien dirigierenden Zielsignale sind dabei über das gesamte Protein verteilt. Die zweite Gruppe von Proteinen wird im Cytosol mit einem N-terminalen Transportsignal (Präsequenz) synthetisiert, das in der mitochondriellen Matrix durch die mitochondrielle Prozessierungspeptidase (MPP) proteolytisch entfernt wird (Böhni et al., 1980). Obwohl es keine einheitliche Zielsequenz gibt, sind den mitochondriellen Präsequenzen bestimmte Merkmale gemein. Alle sind positiv geladen und können amphipathische α -Helices formen (von Heijne, 1986). Typische mitochondrielle Transportsignale haben eine Länge von 20-60 aa (Zhang and Glaser, 2002).

Die Hauptmaschinerie für den mitochondriellen Import von Vorläuferproteinen setzt sich aus drei oligomeren Membranproteinkomplexen zusammen, einem in der äußeren Hüllmembran und zwei weiteren in der inneren Hüllmembran (Truscott et al., 2003). Aufgrund ihrer Funktion werden sie als Translokasen bezeichnet. Die Translokase der äußeren Hüllmembran wird als TOM (*translocon at the outer envelope membrane of mitochondria*), die Translokasekomplexe der inneren Hüllmembran werden als TIM (*translocon at the inner envelope membrane of mitochondria*) bezeichnet. Die Proteintranslokasekomplexe der inneren und äußeren Membran zeigen Interaktionen

(Schleyer and Neupert, 1985; Pon et al., 1989). Der Proteinimport soll demnach an diesen Kontaktstellen zwischen den beiden Membranen stattfinden.

TOM und TIM Komplexe wurden zuerst in Hefe beschrieben und später auch in Mitochondrien von Säugern und Pflanzen identifiziert.

Der TOM-Komplex besteht aus Rezeptor-Untereinheiten, die mitochondrielle Vorläuferproteine erkennen und binden, und einer Kerntranslokase, die aus einem Protein besteht, das die *GIP* (*general import pore*) bildet, sowie einigen kleinen, fest assoziierten akzessorischen Untereinheiten.

Der TOM-Komplex in Hefe bildet ein 400 kDa großes Oligomer (Rapaport, 2002). Die Rezeptoruntereinheiten, Tom20, Tom70 und Tom22, sind in der OM verankert und besitzen unterschiedliche Proteinspezifitäten (Brix et al., 1997; Pfanner and Geissler, 2001). Vorläuferproteine, die eine Präsequenz besitzen, werden überwiegend vom Tom20-Rezeptor erkannt. Dagegen werden Proteine mit internen Transportsignalen bevorzugt am Tom70-Rezeptor gebunden (Wiedemann et al., 2001). In beiden Fällen werden die Vorläuferproteine danach zum Tom22-Rezeptor transferiert (van Wilpe et al., 1999). Im Anschluss werden die Proteine in die Importpore (GIP), die aus Tom40 gebildet wird, geleitet und dann über die äußere Mitochondrienmembran transportiert (Hill et al., 1998). Desweiteren befindet sich in der OM die SAM (*sorting and assembly machinery*), die aus Tom37 und Sam50 Untereinheiten gebildet wird. Diese ist für die Sortierung und Assemblierung von Proteinen der OM zuständig (Wiedemann et al., 2003; Kozjak et al., 2003).

Der TOM-Komplex in Pflanzen unterscheidet sich in vielerlei Hinsicht von seinem Gegenstück in Hefe. Er bildet einen kleineren Komplex von 230 kDa (Werhahn et al., 2001). Ein bemerkenswerter Unterschied ist das Fehlen eines Tom22 Rezeptors (Jänsch et al., 1998). Es konnte aber eine Untereinheit mit einem Molekulargewicht von ca. 8 kDa gefunden werden, die strukturelle Ähnlichkeiten mit Tom22 aufweist, der jedoch die Rezeptordomäne fehlt. Diese 8 kDa Untereinheit ist der wahrscheinlichste Ersatz für Tom22. Der Verlust der Rezeptordomäne könnte notwendig gewesen sein, um eine Bindung plastidärer Vorläuferproteine an den TOM-Komplex zu vermeiden (Macasev et al., 2000). Der TOM-Komplex in *Solanum tuberosum* enthält kein Protein, das nachweislich Tom70 entsprechen würde (Jänsch et al., 1998; Werhahn et al., 2001). Allerdings existieren im Genom von *Arabidopsis thaliana* sechs potentielle Homologe zu Tom70 (Lister et al., 2003). Desweiteren ist Tom20 in Pflanzen über den C-terminus in der OM verankert und nicht, wie bei Hefe und Säugern, über den N-terminus (Werhahn et al., 2001). Außerdem werden nahezu alle TOM-Untereinheiten von mehreren Genen kodiert. Isoformen von Rezeptorproteinen könnten auf unterschiedliche Substratspezifitäten hindeuten (Werhahn

et al., 2001). Ein homologes Protein zu Tom37 der SAM ist in *Arabidopsis thaliana* ebenfalls zu finden (Chew et al., 2004). Bemerkenswert ist zudem, dass die OM von *Arabidopsis thaliana* ein Protein enthält, das eine 67 %ige Sequenzidentität mit der Toc64 Translokase der äußeren Hüllmembran von Chloroplasten aufweist (Chew et al., 2004).

Der Transport von Vorläuferproteinen über die IM wird in Hefe über zwei verschiedene Translokasekomplexe vermittelt, TIM23 und TIM22 (Jensen and Dunn, 2002). Die Präsequenz-Translokase (TIM23) transportiert Vorläuferproteine mit N-terminalen Präsequenzen. Dieser Transport ist abhängig von einem Membranpotential (Truscott et al., 2001). Außerdem ist das ATP-abhängige mtHsp70-Protein beteiligt, welches als Importmotor betrachtet wird (Kang et al., 1990; Zhang et al., 1999). Nach dem Transport in die Matrix erfolgt die Prozessierung durch die MPP und das reife Protein kann mit Hilfe von Chaperonen in seine native Konformation gelangen (z.B. Cruciat et al., 1999). Der Proteininsertions-Komplex (TIM22) vermittelt den Import von Vorläuferproteinen mit internen Transportsignalen. Dieser Komplex integriert die polytopen Membranproteine in die innere Membran. Für diesen Vorgang ist ebenfalls ein Membranpotential nötig (Kovermann et al., 2002). Desweiteren kann die Integration von Vorläuferproteinen in die IM auch aus der Matrix über den OXA1-Komplex (*oxidase assembly*) erfolgen (Hell et al., 1998; Hamel et al., 1997).

Im Genom von *Arabidopsis thaliana* existieren jeweils mehrere Homologe zu den TIM23 Untereinheiten. Die Isoenzyme werden in Abhängigkeit von Gewebe und Entwicklung unterschiedlich exprimiert (Murcha et al., 2003). Auch für TIM22 konnten mögliche Homologe in *Arabidopsis thaliana* identifiziert werden (Murcha et al., 2007).

Nach dem Import in die Matrix wird das Transportsignal des Vorläuferproteins abgespalten. Diese Prozessierung erfolgt durch die MPP. Die MPP aus Hefe und Tieren liegt löslich in der Matrix vor. Im Gegensatz dazu ist die pflanzliche MPP in den membranständigen Cytochrom-bc1-Komplex der Atmungskette integriert (Braun and Schmitz, 1995; Glaser and Dessi, 1999). In Mitochondrien existieren neben der MPP noch weitere Prozessierungspeptidasen: die IMP (*inner membrane protease*) und die MIP (*mitochondrial intermediate peptidase*) (Gakh et al., 2002). Viele für den IMS bestimmte Vorläuferproteine haben zweigeteilte Transportsignale. Nach der Prozessierung durch die MPP werden intramitochondrielle Sortierungssignale durch die IMP abgespalten (Schneider et al., 1991). Für die meisten mitochondrialen Vorläuferproteine der Matrix und der inneren Membran ist eine Prozessierung durch die MPP ausreichend. Eine Ausnahme bilden Oktapeptid-haltige Proteine, die zwei Prozessierungsschritte benötigen. Diese werden nacheinander durch die MPP und die MIP, die ebenfalls in der Matrix lokalisiert ist, prozessiert (Kalousek et al.,

1992). Sowohl für die IMP als auch für die MIP konnten Homologe in *Arabidopsis thaliana* gefunden werden, wobei die IMP Homologie zur Prozessierungspeptidase der Thylakoide aufweist (Gakh et al., 2002).

1.3 Chloroplasten und der plastidäre Proteintransport

Chloroplasten bilden das zweitgrößte Kompartiment der Pflanzenzelle und nehmen ca. 16 % des Gesamtvolumens der Zelle ein. Chloroplasten sind üblicherweise linsenförmig mit einem Durchmesser von ca. 5-8 µm und einer Länge von ca. 1 µm. Sie sind von zwei Hüllmembranen umschlossen, der äußeren (OM) und der inneren (IM). Die äußere Membran ist permeabel für Moleküle bis 10 kDa, aber nicht für Makromoleküle, wie größere Proteine und Nukleinsäuren. Die innere Membran ist eine Permeabilitätsbarriere und Moleküle können sie nur über spezifische Translokatoren passieren. Chloroplasten besitzen außerdem ein internes Membransystem, die Thylakoide. Die Membranen umschließen also drei verschiedene Kompartimente, den Intermembranraum (IMS), das Stroma und das Thylakoidlumen.

Der Transport von Vorläuferproteinen über die beiden Hüllmembranen wird durch Proteintranslokasekomplexe gewährleistet, den TOC-Komplex (*translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts*) und den TIC-Komplex (*translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts*).

Der TOC-Komplex der äußeren Hüllmembran besteht aus der Transportpore Toc75 und den beiden Rezeptorproteinen Toc159 und Toc34 (Kouranov and Schnell, 1997; Becker et al., 2004a), sowie dem Toc64 und dem Toc12-Protein. Toc64 ist ein integrales Membranprotein mit einer Cytosol-exponierten Domäne, welche als Andockstelle für cytosolische Chaperone fungieren kann, die mit Vorläuferproteinen interagieren können (Sohrt and Soll, 2000). Toc64 besitzt außerdem eine in den Intermembranraum gerichtete Domäne. Für diese wird, zusammen mit Hsp70, Toc12 und Tic22, eine Beteiligung am Transport der Vorläuferproteine durch den Intermembranraum angenommen (Qbadou et al., 2007). Toc12 ist möglicherweise für die Aktivierung der ATPase Aktivität von Hsp70 zuständig (Becker et al., 2004b). Für einige Vorläuferproteine wurden Interaktionen mit den cytosolischen 14-3-3-Proteinen und Hsp70 nachgewiesen, dem sogenannten *guidance*-Komplex (May and Soll, 2000). In einem ersten energieunabhängigen Schritt erfolgt die Bindung der Vorläuferproteine an die Toc-Rezeptorproteine (Perry and Keegstra, 1994; Ma

et al., 1996). Für die anschließende Translokation wird Energie in Form von GTP und ATP benötigt (Olsen and Keegstra, 1992).

Der weitere Transport erfolgt über den TIC-Komplex, welcher mit dem TOC-Komplex interagiert (Schnell and Blobel, 1993). Mehrere am TIC-Komplex beteiligte Proteine wurden identifiziert (Tic110, Tic40, Tic55, Tic62, Tic32, Tic22 und Tic20), wobei die genauen Funktionen dieser Untereinheiten beim Import nicht vollständig geklärt sind. Es gibt Hinweise darauf, dass sowohl Tic110 als auch Tic20 Teil des Translokationskanals sind (Lübeck et al., 1996; Heins et al., 2002). Für Tic40, ein integrales Membranprotein, ist eine Funktion bei der Bindung von Chaperonen auf der stromalen Seite der Translokase wahrscheinlich (Chou et al., 2003). Molekulare Chaperone sind Hsp93 und Cpn60, die unter ATP-Verbrauch zur Translokation des Vorläuferproteins beitragen (Kessler and Blobel, 1996). Das lösliche Tic22 ist im Intermembranraum lokalisiert und interagiert mit Vorläuferproteinen (Kouranov and Schnell, 1997; Kouranov et al., 1998). Die mit dem TIC-Komplex assoziierten Proteine (Tic55, Tic62, Tic32) sind Redoxkomponenten (Caliebe et al., 1997; Kückler et al., 2002; Hörmann et al., 2004) und vermutlich an der Regulation des Proteintransports beteiligt (Kessler and Schnell, 2006).

Kerncodierte plastidäre Proteine werden, wie auch mitochondrielle Proteine, mit organell-dirigierenden Signalen im Cytosol synthetisiert. Eine N-terminale Verlängerung des Proteins wird dabei als Transitpeptid bezeichnet. Typische chloroplastidäre Transportsignale sind 30-80 aa lang. Man unterscheidet zwischen einfachen und zusammengesetzten Transitpeptiden. Einfache Transitpeptide dirigieren das Protein nur bis in das Stroma der Chloroplasten und werden nach erfolgtem Import durch die stromale Prozessierungspeptidase (SPP) proteolytisch entfernt (Richter et al., 2005). Eine weitere Sortierung wird durch Signale innerhalb des reifen Proteins vermittelt. Zusammengesetzte Transitpeptide bestehen aus einer stromadirigierenden und einer thylakoiddirigierenden Sequenz. Beim Proteinimport werden beide Teile üblicherweise nacheinander abgespalten. Der stromadirigierende Teil wird nach dem Transport ins Stroma durch die SPP proteolytisch entfernt (Robinson and Klösgen, 1994). Dabei entsteht ein Transportintermediat, welches nur noch das thylakoiddirigierende Signalpeptid enthält. Dieser Teil wird wiederum nach dem Transport in die Thylakoide durch die Thylakoidprozessierungspeptidase (TPP) entfernt (Kirwin et al., 1987; Kirwin et al., 1988).

Die plastidären Signalpeptide, d.h. die thylakoiddirigierenden Teile der Transitpeptide, weisen eine weitgehend einheitliche Struktur auf. Sie bestehen aus einem positiv geladenen N-Terminus, einer hydrophoben Kernregion und einem polaren C-Terminus (von

Heijne, 1985; von Heijne et al., 1989). Die polare Region endet meist mit einem Ala-X-Ala – Motiv, welches die Erkennungsstelle für die TPP darstellt. Diese Struktur ähnelt denen der bakteriellen Signalpeptide, die für den Transport von Proteinen in den periplasmatischen Raum verantwortlich sind.

Bis heute sind vier verschiedene Wege für den Transport von Proteinen über die Thylakoidmembran bekannt (Cline and Henry, 1996; Klösgen, 1997; Gutensohn et al., 2006). Dabei wird zwischen dem Sec-abhängigen (*secretory*), dem SRP-abhängigen (*signal recognition particle*), dem $\Delta\text{pH/TAT}$ -abhängigen (*twin arginine translocation*) und dem spontanen Transportweg unterschieden. Über welchen der vier Wege ein Protein transportiert wird entscheidet die Struktur des Signalpeptides (Henry et al., 1994; Robinson et al., 1994). Mit Ausnahme des spontanen Weges ist bei den Transportwegen immer ein Transportkomplex (Translokase) in der Thylakoidmembran beteiligt.

Der spontane Weg basiert auf der spontanen Integration von Proteinen in die Thylakoidmembran und ist unabhängig von stromalen Faktoren, Nukleosidtriphosphaten, einem Protonengradienten oder membrangebundenen Rezeptoren (Michl et al., 1994; Robinson et al., 1996).

Charakteristisch für den SRP-abhängigen Weg ist die Abhängigkeit von GTP und stromalen Komponenten, die eine Homologie zu eukaryontischen Signalerkennungspartikeln (SRP, *signal recognition particle*) aufweisen (Franklin and Hoffman, 1993). Ein mutmaßlicher cpSRP-Rezeptor konnte im Stroma der Chloroplasten nachgewiesen werden. Die Integration des Transportsubstrates erfolgt allerdings nur unter Beteiligung von Alb3, einem Homologen des Oxa1p in Mitochondrien (Moore et al., 2000).

Über den Sec-abhängigen Weg werden hauptsächlich hydrophile, luminaire Proteine transportiert, die sich dabei im ungefalteten Zustand befinden (Schatz and Dobberstein, 1996). Auch hier ist der Transport von Nukleosidtriphosphaten (in diesem Fall ATP) und von mindestens einer Stromakomponente abhängig (Robinson et al., 1994). Ein Protonengradient ist nicht essentiell, erhöht jedoch die Transporteffizienz (Mant et al., 1995).

Der $\Delta\text{pH/TAT}$ -abhängige Weg unterscheidet sich grundlegend von den anderen drei Transportwegen (Asai et al., 1999; Mori et al., 1999). Er benötigt weder stromale Faktoren, noch ATP oder andere Nukleosidtriphosphate. Essentiell ist dagegen ein Protonengradient (Mould and Robinson, 1991; Cline et al., 1992; Klösgen et al., 1992). Eine weitere wichtige Eigenschaft des $\Delta\text{pH/TAT}$ -abhängigen Transportweges ist die Fähigkeit gefaltete Proteine zu transportieren (Clark and Theg, 1997; Marques et al., 2003).

1.4 Dual Targeting

Die Lokalisierung von Proteinen innerhalb der Zelle wird durch deren Proteinsequenz, insbesondere der Transportsignale, festgelegt. Die Mehrzahl der Proteine besitzt nur einen Zielort. Dennoch gibt es auch Proteine mit mehreren Lokalisierungen. Man unterscheidet dabei Proteine mit mehr als zwei Lokalisierungen (*multiple targeting*) und Proteine mit dualer Lokalisierung (*dual targeting*) (Small et al., 1998; Silva-Filho, 2003; Millar et al., 2006).

Neben dualen Proteinen, die in Mitochondrien und Chloroplasten zu finden sind, wurde auch *dual targeting* von Proteinen z.B. in Mitochondrien und Endoplasmatischem Reticulum (Zhao et al., 2003) oder in Chloroplasten und Peroxisomen (Wimmer et al., 1997) beschrieben. Allerdings ist die überwiegende Zahl der bekannten dualen Proteine in den Mitochondrien und Plastiden lokalisiert. Die für diese Arbeit interessanten Proteine sind eben diejenigen, die sowohl in die Mitochondrien, als auch in die Plastiden transportiert werden können.

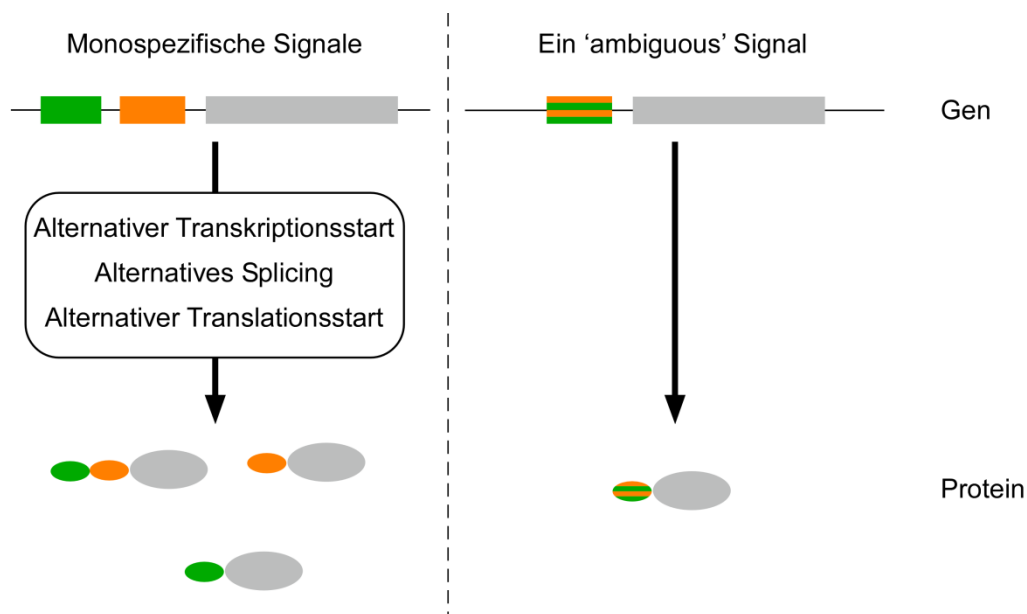


Abb. 1.2: Transportsignale für eine duale Lokalisierung von Proteinen. Die duale Lokalisierung wird entweder durch zusammengesetzte (wobei monospezifische Signale entstehen) oder durch gemischte (*ambiguous*) Transportsignale vermittelt.

Grundsätzlich kann *dual targeting* durch zwei Mechanismen erreicht werden (Karniely and Pines, 2005; Peeters and Small, 2001) (Abb. 1.2). In einigen Fällen tragen die Gene dabei die Information für zwei aufeinanderfolgende Transportsignale unterschiedlicher Spezifität. Durch transkriptionelle und/oder posttranskriptionelle Regulationsmechanismen können so ausgehend vom gleichen Gen verschiedene Vorläuferproteine mit unterschiedlicher

Organellspezifität gebildet werden. Als mögliche Mechanismen sind alternative Initiation der Transkription (Obara et al., 2002), alternatives *Splicing* oder alternative Initiation der Translation (Watanabe et al., 2001; Christensen et al., 2005) beschrieben worden.

Die für diese Arbeit interessante Klasse von Proteinen mit doppelter Lokalisierung trägt dagegen gemischte (*ambiguous*) Transportsignale, die beide endosymbiontische Organellen als Ziel aufweisen (Rudhe et al., 2002b). Hier wird im Cytosol immer das gleiche Vorläuferprotein gebildet, das dann allerdings sowohl von den mitochondrialen als auch von den plastidären Importapparaten als Substrat erkannt werden kann, so dass es zum Transport in beide Organellen kommt.

Dual targeting wurde erstmals für die Glutathionreduktase aus *Pisum sativum* berichtet (Creissen et al., 1995). Seither konnte *dual targeting* für eine Reihe von Proteinen beschrieben werden (Peeters and Small, 2001; Silva-Filho, 2003; Mackenzie, 2005). Bis heute sind etwa 50 Proteine bekannt, die *dual targeting* zeigen.

In den meisten Fällen sind die *dual targeting*-Eigenschaften dieser Proteine zufällig gefunden worden, nur für einige Aminoacyl-tRNA-Synthetasen wurden sie aufgrund fehlender Redundanz der jeweiligen Kerngene postuliert (Small et al., 1999). Neben solchen *housekeeping*-Proteinen, die für die Replikation und Expression der Organellgenome in beiden Organellen notwendig sind, zeigen aber auch einige Proteine aus dem Redoxstoffwechsel und der Porphyrinbiosynthese (z.B. Creissen et al., 1995; Watanabe et al., 2001), die beide in die Signalkette zwischen Kern und Chloroplast eingebunden sind (z.B. Rodermeil, 2001), die Fähigkeit zum *dual targeting*.

Obwohl bereits 1995 das erste Protein beschrieben wurde, das *dual targeting* zeigt, ist immer noch relativ wenig über den Mechanismus dieses Phänomens sowie Ähnlichkeiten oder Unterschiede zu monospezifischen Proteinen bekannt.

Für die Erkennung gemischter Transportsignale durch organelläre Rezeptoren sind zwei Mechanismen vorstellbar (Peeters and Small, 2001). Einerseits könnten diese Signale durch einen Rezeptor erkannt werden, welcher in beiden Organellen vorhanden ist. Dann müsste es eigene Rezeptoren für duale Proteine an der Oberfläche der Organellen geben. Andererseits ist es möglich, dass gemischte Transportsignale Eigenschaften von mitochondrialen und plastidären Signalen tragen und daher von den bekannten Importapparaten beider Organellen erkannt werden.

Bestimmte Eigenschaften der gemischten Transportsignale konnten über den Vergleich mit klassischen mitochondrialen oder chloroplastidären Transportsignalen (Peeters and Small, 2001) und über Mutationsanalysen bestimmt werden (Pujol et al., 2007). So sind Arginine sowie die zweite N-terminale Aminosäure, häufig Alanin, wichtig. Ein niedriger Anteil

negativ geladener Aminosäuren (Aspartat und Glutamat) und ein höherer Anteil an Arginin und Serin wurden ebenfalls festgestellt. Dies trifft auch auf klassische mitochondrielle oder chloroplastidäre Transportsignale zu. Dennoch sind sie durchschnittlich hydrophober als die klassischen Transportsignale, da der Anteil an Phenylalanin und Leucin erhöht ist. Es stellte sich heraus, dass gemischte Transportsignale Eigenschaften zeigen, die zwischen denen mitochondrialer Präsequenzen und plastidärer Transitpeptide liegen bzw. Merkmale beider aufweisen. Der Transportweg dualer Proteine unterscheidet sich demnach vermutlich nicht von dem anderer Vorläuferproteine der Organellen.

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass der reife (*mature*) Teil eines Proteins entscheidenden Einfluss auf das *Targeting* haben kann. So kann das Transportsignal der *Pisum sativum* Glutathionreduktase das GFP (*green fluorescent protein*) als Passagier nur in die Plastiden lenken (Chew et al., 2003b). Ein rein plastidäres Protein, die kleine Untereinheit der RubisCO (SSU), als Passagier wird nur in die Plastiden, ein rein mitochondrielles Protein, die Alternative Oxidase (AOX), nur in die Mitochondrien transportiert (Rudhe et al., 2002a). Dagegen kann das Transportsignal der *Arabidopsis thaliana* Asparaginyl-tRNA-Synthetase diese Passagiere sowohl in die Mitochondrien als auch die Plastiden lenken (Peeters et al., 2000; Chew and Whelan, 2003). Andererseits kann das Transportsignal der Glutathionreduktase ein anderes mitochondrielles Protein, eine Untereinheit der mitochondrialen ATP-Synthase (F_{AD}), in beide Organellen dirigieren (Rudhe et al., 2002a). Anders als bei monospezifischen Proteinen, bei denen der reife Teil einen Einfluss auf die Effizienz des Imports bewirken kann, kann bei dualen Proteinen der reife Teil offenbar den Import in eines der beiden Organellen komplett unterdrücken.

Es gibt keinen direkten experimentellen Beweis für eine aktive Sortierung dualer Proteine oder eine Regulation der Verteilung zwischen den Organellen. Allerdings sprechen einige Beobachtungen dafür, dass die Sortierung nicht nur ein passiver Vorgang ist.

Als Grund oder Ursache für *dual targeting* wäre die Koordinierung von Prozessen innerhalb der Zelle denkbar. *Dual targeting* erhöht nicht die Anzahl der Proteine in der Zelle, sondern bietet die Möglichkeit, die Funktion(en) eines Proteins zu erweitern. Bei bestimmten Genfamilien, wie den *Arabidopsis thaliana* tRNA-Synthetasen (Duchêne et al., 2005), ist *dual targeting* in die Mitochondrien und Chloroplasten sogar eher die Regel als die Ausnahme.

Obwohl die Zahl bekannter dualer Proteine relativ klein in Bezug auf das gesamte Proteom ist, repräsentiert diese vermutlich nur die Spitze des Eisbergs. Das Phänomen *dual targeting* wirft interessante Fragen nach der interorganellären Kommunikation auf. Man

kann beispielsweise vermuten, dass die Zelle diese dualen Proteine je nach Bedarf auf die beiden Organellen verteilen und auf diese Weise durch Aktivierung bzw. Inaktivierung bestimmter organellgebundener Stoffwechselwege auf wechselnde Zellzustände reagieren kann. Dies würde der Zelle die Möglichkeit eröffnen, durch gezielten Proteintransport die beiden Organellen in ihrer Aktivität aufeinander abzustimmen.

1.5 Cytochrom c1

Erst durch den Import von Vorläuferproteinen in das entsprechende Organell und deren Assemblierung wird beispielsweise die Atmungskette in den Mitochondrien vollständig gebildet. Zu den dabei notwendigen Proteinkomplexen zählt der Cytochrom bc1-Komplex (Abb. 1.3). Der Cytochrom bc1-Komplex wird auch als Komplex III oder Ubichinon-Cytochrom-c-Oxidoreduktase bezeichnet. Die Aufgabe dieses Komplexes besteht darin, die Elektronenübertragung zwischen Elektronen-Carriermolekülen zu katalysieren, d.h. den Elektronentransfer vom Ubichinol (UQH_2) zum Cytochrom c. Gleichzeitig werden Protonen aus der Mitochondrienmatrix in den Intermembranraum transportiert, um so zum für die ATP-Synthese erforderlichen pH-Gradienten beizutragen.

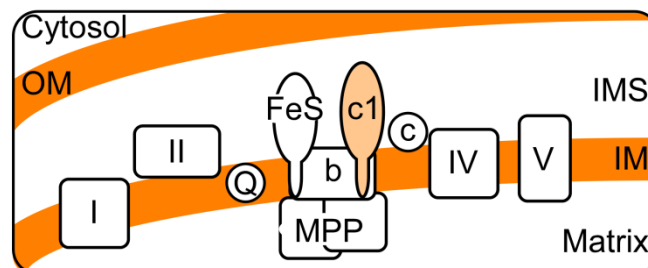


Abb. 1.3: Die mitochondrielle Atmungskette. Schematische Darstellung des Cytochrom bc1-Komplexes als Bestandteil der Elektronentransportkette der oxidativen Phosphorylierung in der inneren Membran der Mitochondrien.

Dabei codiert die mitochondrielle DNA nur für eine Untereinheit des Komplexes III, das Cytochrom b, die anderen Untereinheiten sind kerncodiert. Der funktionelle Kern des Komplexes besteht aus 3 Untereinheiten: Cytochrom b mit zwei Häm-Gruppen, Rieske-Eisen-Schwefel-Protein mit einem $2\text{Fe}-2\text{S}$ -Zentrum und Cytochrom c1 mit einem Häm. Cytochrom c1 ist die Komponente des Komplexes, die den Transfer der Elektronen vom Rieske-Protein zum Cytochrom c koordiniert. Das Vorläuferprotein von Cytochrom c1 ist 320 Aminosäuren lang (Abb. 1.4), das entspricht einem Molekulargewicht von ca. 35 kDa.

Die ersten 77 Aminosäuren bilden das Transportsignal (Präsequenz), das nach dem Import in die Mitochondrien abgespalten wird. Das entstehende reife Protein hat ein Molekulargewicht von ca. 27 kDa. Cytochrom c1 ist ein Protein des Intermembranraums, das über eine, am C-Terminus des Proteins befindliche, transmembrane Domäne in der inneren mitochondrialen Membran verankert ist.

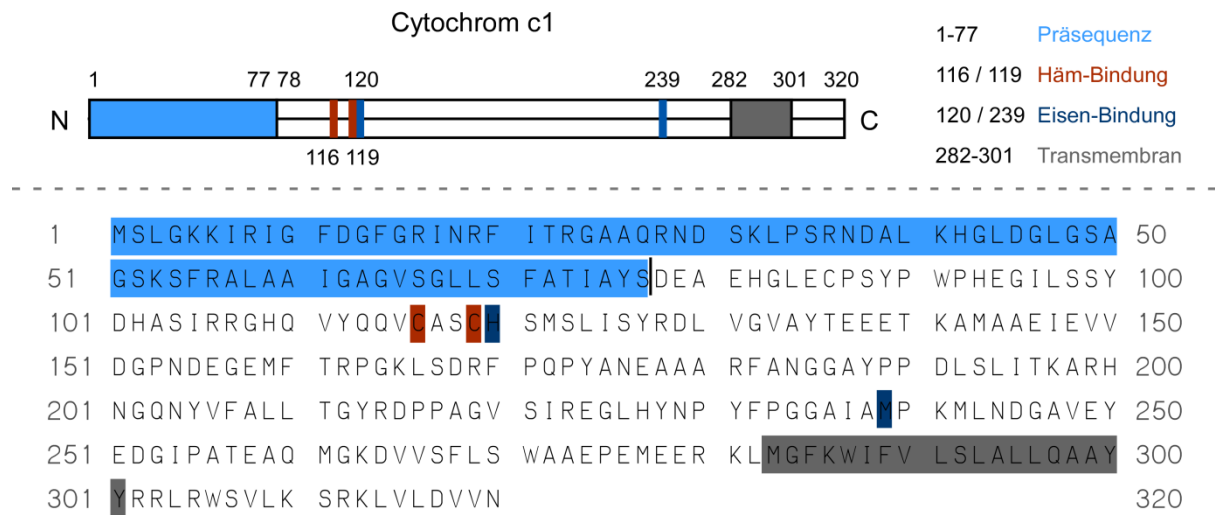


Abb. 1.4: Sequenz und Strukturelle Eigenschaften von Cytochrom c1 aus *Solanum tuberosum* (nach Braun et al., 1992). Die angegebenen Zahlen entsprechen der Position der jeweiligen Aminosäure.

1.6 Zielstellung

Grundsätzlich sollte das experimentelle Vorgehen bei der Analyse des Transportverhaltens kerncodierter Organellproteine im Hinblick auf eine mögliche duale Lokalisierung etabliert werden. Grundlage für die *in vitro* Analyse von Proteintransportvorgängen ist eine geeignete Methode zur Präparation importkompetenter Organellen. Zunächst sollte daher eine geeignete Methode gefunden werden, um sowohl Mitochondrien als auch Chloroplasten aus ein und demselben Gewebe zu erhalten. Darauf aufbauend lassen sich *in vitro* Studien zum Transportverhalten von Proteinen mittels Importexperimenten mit isolierten Mitochondrien und Chloroplasten durchführen. Dabei sollte auch die Lokalisierung innerhalb der Organellen untersucht werden. Die *in vitro* Experimente sollten außerdem mittels transienter Expression geeigneter Reporterproteinfusionen *in vivo* ergänzt werden. *In vitro* Proteintransportstudien komplementiert durch *in vivo* Analysen, sowie der immunologische Nachweis der Lokalisierung ergeben das umfassendste Bild für das Transportverhalten eines Proteins. Der Fokus lag hierbei auf dem Cytochrom c1 Protein aus *Solanum tuberosum*, das sich als geeignetes Substrat erwies. Es sollte in der vorliegenden Arbeit eine Analyse der Transporteigenschaften von Cytochrom c1 durchgeführt werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien in p.a. Qualität wurden, wenn nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen: Biomol (Hamburg), Difco-Laboratories (Detroit, USA), Duchefa (Haarlem, Niederlande), ICN Biochemicals GmbH (Meckenheim), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (München).

Radiochemikalien (³⁵S-Methionin) wurden von GE-Healthcare (Freiburg) bezogen.

2.1.2 Größenstandards (Marker)

Anwendung	Bezeichnung	Firma
DNA-Marker:	1 Kb DNA Ladder	Gibco BRL / Invitrogen
	HyperLadder I	Bioline
Protein-Marker:	DaltonMark® VII- L Standard	Sigma-Aldrich
	HMW Native Marker	GE-Healthcare
	PageRuler™ Prestained	Fermentas
	SDS-6B	Sigma-Aldrich

2.1.3 Nukleinsäuren und Oligonukleotide

Die Nukleotide/Oligonukleotide wurden von MWG Biotech (Martinsried), die RNA-Cap-Strukturanaloga von New England Biolabs (Frankfurt am Main) und Desoxyribonukleotide und Ribonukleotide von Roche (Mannheim) bezogen.

Bezeichnung	Sequenz (5' ⇒ 3')	°C [T _m]
SP6-Primer	ATT TAG GTG ACA CTA TAG	43,7°C
T3-Primer	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG	52,8°C
T7-Primer	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	49,9°C
T7-terminator-Primer	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G	55,5°C
pUC/M13, Forward	GGT TTT CCC AGT CAC GAC GTT G	63,0°C
pUC/M13, Reverse	CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC C	59,1°C
pRT100m-35S-for	ATG ACG CAC AAT CCC ACT ATC C	60,4°C
pRT100m-PolA-rev	TGC TCA ACA CAT GAG CGA AAC C	61,0°C
5'BamHI_FNR	GGG ATC CAT GAC CAC CGC TGT CAC CGC	73,9°C
3'NcoI_FNR	CGC CAT GGC CCT GAT GGG TCC CAT TT	72,6°C

5'BamHI_cytc1	GGG ATC CAT GAG TTT AGG GAA GAA GAT	62,3°C
3'NcoI_cytc1	GCC ATG GCA GAA TAA GCA ATT GTT GCA A	62,3°C
3'EagI_cytc1	GCG GCC GGT TGA CAA CAT CAA GAA C	66,3°C
st.cytc1_5'NdeI	CCA TAT GAG TTT AGG GAA GAA GAT C	56,1°C
st.cytc1_3'XhoI	GCT CGA GGT TGA CAA CAT CAA G	59,5°C

2.1.4 Enzyme

	Firma
DNase	Roche (Mannheim)
Lysozym	Serva
Restriktionsendonukleasen	Fermentas (St. Leon-Rot) New England Biolabs (Frankfurt am Main)
Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP)	United States Biochemical
T3-RNA-Polymerase	Stratagene
T4-DNA-Ligase	Roche (Mannheim)
T7-RNA-Polymerase	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
Taq DNA-Polymerase	Biomaster
Thermolysin	Sigma-Aldrich
Trypsin	Sigma-Aldrich

2.1.5 Antibiotika

Mit Ausnahme des Chloramphenicols (in Ethanol gelöst) wurden alle Antibiotika in bidestilliertem Wasser gelöst und die Stammlösungen sterilfiltriert.

	Stammlösung	Arbeitskonzentration	Firma
Ampicillin (Amp)	50 mg/ml	100 µg/ml	Serva
Chloramphenicol (Cam)	34 mg/ml	34 µg/ml	Sigma-Aldrich
Kanamycin (Kan)	50 mg/ml	50 µg/ml	Serva

2.1.6 Antikörper

Alle nachfolgenden Antikörper sind polyklonal und wurden in Kaninchen produziert.

Nur αPenta-His ist ein monoklonaler Antikörper aus Maus-Hybridomzellen.

Die angegebenen Molekulargewichte beziehen sich jeweils auf das reife Protein.

Antikörper	Ursprung Immunogen	Verdünnung	kDa	Herkunft
α75kDa	Neurospora	1 : 3.000	75	U. Schulte (α6405)
α30/31kDa	Neurospora	1 : 3.000	30/31	U. Schulte (α6696)
αCFoll	Spinat	1 : 2.000	17	Berghöfer
αCOXII	Peptid	1 : 5.000	30	Agrisera
αCyt1	Kartoffel	1 : 500 / 1 : 1.000	27	diese Arbeit

α FNR	Spinat	1 : 5.000	34	Berghöfer
α GDC	Spinat	1 : 5.000	17	Agrisera (α GDC-H)
α Hsp60	Hefe	1 : 2.000	60	T. Langer
α ldh	Peptid	1 : 5.000	45	Agrisera
α OEC23	Spinat	1 : 5.000	23	J. Berghöfer
α OEC33	Spinat	1 : 5.000	33	J. Berghöfer
α Penta-His	-	1 : 1.000	-	Qiagen
α SSU		1 : 5.000	14	U. I. Flügge
α Toc159	Arabidopsis	1 : 3.000	230	B. Hust
α Toc33	Arabidopsis	1 : 250	33	A. Voigt

Als sekundäre Antikörper wurden eingesetzt:

<i>Anti-Mouse IgG–Peroxidase antibody produced in rabbit</i>	1 : 30.000	Sigma-Aldrich
<i>Anti-Rabbit IgG–Peroxidase antibody produced in goat</i>	1 : 30.000	Sigma-Aldrich

2.1.7 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> - Stamm	Genotyp	Referenz
DH5 α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, hsdR17(<i>r_K⁻ m_K⁺</i>), λ -	Hanahan, 1983
TOP10	F ⁻ mcrA Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> nupG recA1 araD139 Δ (<i>ara-leu</i>)7697 galE15 galK16 rpsL(Str ^R) endA1 λ ⁻	Invitrogen
BL21 DE3	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) λ (DE3 [<i>lacI lacUV5-T7</i> gene 1 ind1 sam7 nin5])	Novagen
Rosetta(DE3)pLysS	Δ (<i>ara-leu</i>)7697 Δ <i>lacX74</i> Δ <i>phoA</i> PvuII <i>phoR</i> araD139 <i>ahpC</i> galE galK rpsL (DE3) F ⁺ [<i>lac⁺ lacI^q pro</i>] gor522:: <i>Tn10</i> <i>trxB</i> pLysSRARE (Cam ^R , Str ^R , Tet ^R)	Novagen

2.1.8 Vektoren

Vektor	Resistenz	Referenz
pBAT	Amp ^R	Annweiler et al., 1991
pBSC KS+	Amp ^R	Stratagene
pCR®2.1-TOPO®	Amp ^R / Kan ^R	Invitrogen
pECFP-N1	Kan ^R	Clontech
pEGFP-N2	Kan ^R	Clontech
pET26b	Kan ^R	Novagen
pEYFP-N1	Kan ^R	Clontech
pGEM®-T Easy	Amp ^R	Promega
pRT100mod (pRT- Ω /Not/Asc)	Amp ^R	Töpfer et al., 1987; Überlacker and Werr, 1996

2.1.9 cDNA-Klone

Klon	ID	Ursprungsorganismus	Vektor	Promotor	Referenz
Cytochrom c1	CYCL (P25076)	Kartoffel	pBSC KS+	T7	Braun et al., 1992
mito. Rieske	FES1 (P37841)	Kartoffel	pBSC KS+	T3	Emmermann et al., 1994
FNR	PETH (P00455)	Spinat	pBAT	T3	Jansen et al., 1988
OEC33	PSBO (P12359)	Spinat	pBAT	T3	Tyagi et al., 1987
OEC23	PSBP (P12302)	Spinat	pBAT	T3	Jansen et al., 1987
CFoll	ATPG (P31853)	Spinat	pBAT	T3	Herrmann et al., 1993

2.1.10 cDNA-Klone dieser Arbeit

Vektor	Insert		Anwendung
pET26b	c1	(<i>Solanum tuberosum</i> Cyt1)	Expression
pBAT	EYFP		<i>in vitro</i> Import
pBAT	ECFP		<i>in vitro</i> Import
pRT100mod	EYFP		<i>in vivo</i> Analyse
pRT100mod	ECFP		<i>in vivo</i> Analyse
pBAT	c1(1-77)/EYFP	(Cyt1 Aminosäure 1-77)	<i>in vitro</i> Import
pBAT	c1(1-141)/EYFP	(Cyt1 Aminosäure 1-141)	<i>in vitro</i> Import
pBAT	c1(1-320)/EYFP	(Cyt1 Aminosäure 1-320)	<i>in vitro</i> Import
pRT100mod	c1(1-77)/EYFP	(Cyt1 Aminosäure 1-77)	<i>in vivo</i> Analyse
pRT100mod	c1(1-141)/EYFP	(Cyt1 Aminosäure 1-141)	<i>in vivo</i> Analyse
pRT100mod	c1(1-320)/EYFP	(Cyt1 Aminosäure 1-320)	<i>in vivo</i> Analyse
pRT100mod	FNR/ECFP	(FNR Aminosäure 1-55)	<i>in vivo</i> Analyse

2.1.11 Pflanzenmaterial

Pisum sativum

Die Erbsen (*Pisum sativum* L., Var. *Feltham First*) wurden auf Erde unter Langtagbedingungen (16 h Licht/ 8 h Dunkelheit) bei einer Temperatur von ca. 20 °C kultiviert. Geerntet wurden 7-13 Tage alte Keimlinge.

Spinacia oleracea

Der verwendete Spinat (*Spinacia oleracea* L., Sorte Lina) wurde als hydroponische Kultur in Nährlösung angezogen. Die Lösung wurde mittels Aquariumpumpen ständig belüftet. Die Anzucht erfolgte in Klimakammern unter Kurztagbedingungen (8 h Licht/ 16 h Dunkelheit) und einer Temperatur von ca. 20 °C. Geerntet wurden 3-4 Monate alte Pflanzen.

Nährsalzlösung:	6 mM KNO ₃	Spuren:	46 µM H ₃ BO ₃
	4 mM Ca(NO ₃) ₂		9 µM MnCl ₂ × 4 H ₂ O
	2 mM MgSO ₄		0,77 µM ZnSO ₄ × 7 H ₂ O
	2 mM KH ₂ PO ₄		0,32 µM CuSO ₄ × 5 H ₂ O
			0,12 µM Na ₂ MoO ₄
			0,04 mM Fe-EDTA

Solanum tuberosum

Die Kartoffeln (*Solanum tuberosum* L., Var. *Desiree*) wurden nach der Keimung auf Erde unter Langtagbedingungen (16 h Licht/ 8 h Dunkelheit) bei einer Temperatur von ca. 20 °C angezogen. Geerntet wurden 2-3 Wochen alte Pflanzen.

2.1.12 Geräte und Zubehör

Mikroskope:	Konfokales LaserScanning Mikroskop (CLSM) (Zeiss LSM 510)
	Laser: Argon; Anregung: EYFP: 514 nm, ECFP: 458 nm; HeNe; Anregung: Chlorophyll: 633 nm
	Zeiss Axioskop 2 (HBO-100-Lichtquelle; Filterset: AHF F31-017)
	Kamera: Zeiss AxioCam HRc
Phosphoimager:	Fujifilm BAS-System mit dem Phosphofluoroimager Fujifilm FLA-3000

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Standardmethoden

Molekularbiologische Methoden wurden, sofern nicht separat aufgeführt, nach den Protokollen von Sambrook and Russell, 2001 durchgeführt.

2.2.2 Molekularbiologische Kits

Anwendung	Produktname	Firma
Isolierung von Plasmid-DNA (Miniprep)	NucleoSpin®Plasmid	Macherey-Nagel
Isolierung von Plasmid-DNA (Midiprep)	NucleoBond®PC 100	Macherey-Nagel
Reinigung von DNA-Fragmenten	NucleoSpin® Extract	Macherey-Nagel
Sequenzierung von DNA	ABI PRISM® dRhodamine BigDye® Terminator v1.1Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems

Ligation von PCR Produkten pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Promega Systems
 TOPO TA Cloning® K4510-22 Invitrogen

2.2.3 Herstellung der Plasmide zur Proteinsynthese

2.2.3.1 Klonierung von Reporterfusionen

Für die Klonierung verschiedener Reporterfusionen wurde ein Baukastensystem erstellt (Tabelle 2.1; Abb. 2.1). Dazu wurden die cDNAs der Reporterproteine (alternativ EGFP, ECFP oder EYFP), zwischen der BamHI- und der XbaI-Schnittstelle, aus den Originalvektoren sowohl in den pBAT-Vektor als auch in den pRT100mod-Vektor kloniert. So können verschiedene Transportsignale bzw. Volllängenproteine in gleicher Weise, zwischen der BamHI- und der NcoI-Schnittstelle, vor dem Reporter eingefügt werden. Dadurch werden in den *in vitro* und *in vivo* Analysen die gleichen Fusionen eingesetzt.

Tabelle 2.1: Baukasten zur Klonierung von Reporterfusionen

Originalvektor	<i>In vitro</i> Analyse	<i>In vivo</i> Analyse
pEGFP-N2	pBAT + EGFP	pRT100mod + EGFP
pEYFP-N1	pBAT + EYFP	pRT100mod + EYFP
pECFP-N1	pBAT + ECFP	pRT100mod + ECFP

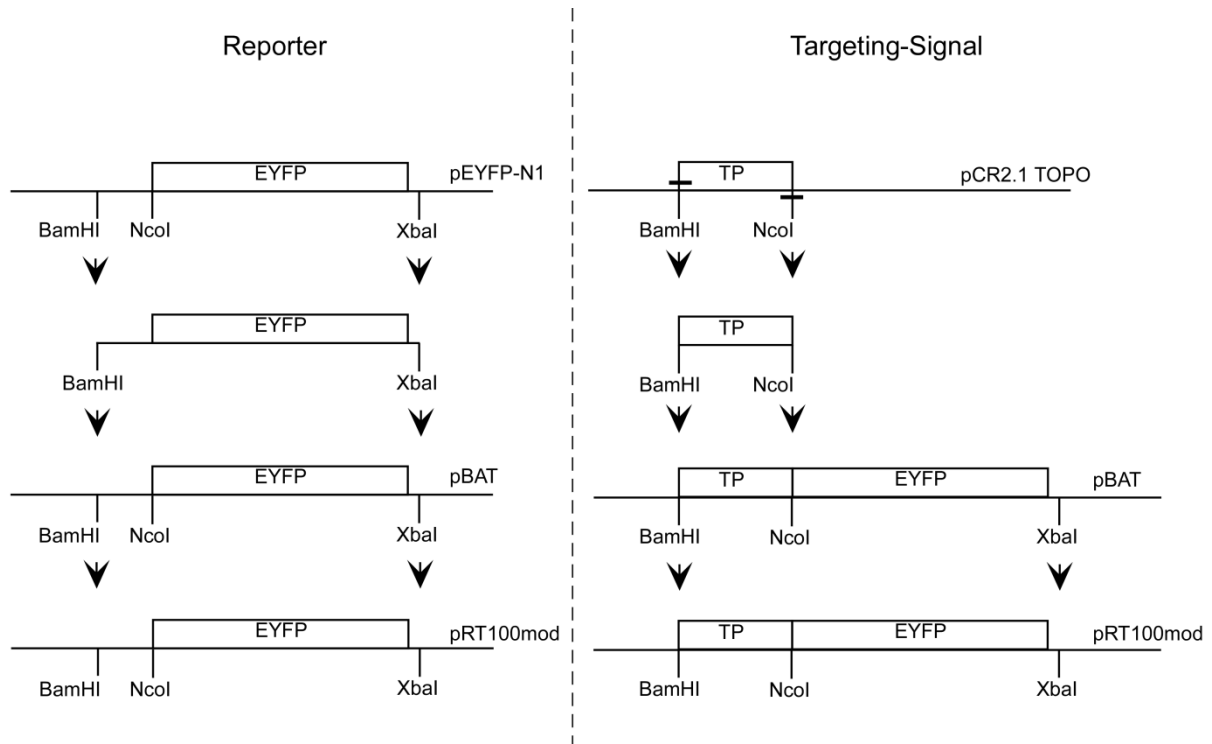


Abb. 2.1: Klonierungsstrategie für die Reporterfusionen.

2.2.3.2 Expression von Cytochrom c1

Für Expression von Cytochrom c1 aus *Solanum tuberosum* in *E. coli* wurde die cDNA aus dem Ursprungsvektor (pBS) über den pCR 2.1 TOPO-Vektor final in den pET26b-Expressionsvektor kloniert (Abb. 2.2). Die notwendigen Schnittstellen wurden durch Verwendung geeigneter PCR-Primer bei der Amplifizierung der DNA generiert. Dabei wurde das Stop-Codon von Cytochrom c1 durch eine XhoI-Schnittstelle ersetzt.

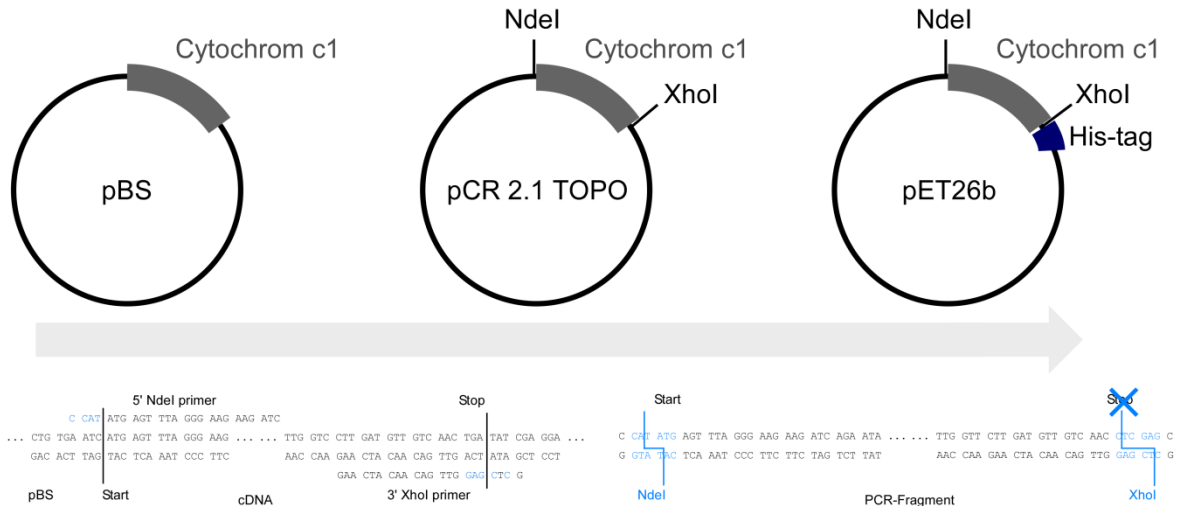


Abb. 2.2: Klonierung von Cytochrom c1 in den Expressionsvektor.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

4x Laemmli-Puffer	0,25 M	Tris-HCl pH 6,8
	8 % (w/v)	SDS
	40 % (w/v)	Glycerin
	20 % (w/v)	β-Mercaptoethanol
	0,016 % (w/v)	Bromphenolblau
30 %ige Acrylamidlösung	29,2 % (w/v)	Acrylamid (AA)
	0,8 % (w/v)	Methylenbisacrylamid

Die SDS-PAGE wurde basierend auf der Methode von Laemmli, 1970 durchgeführt. Dabei wurden zwei verschiedene Arten von Gelen verwendet (Mini-SDS-Gel und Midi-SDS-Gradientengel).

Tabelle 2.2: Mini-SDS-Gel (15 % AA): (für 100×80×1 mm Gelgröße, ausreichend für zwei Gele)

	Trenngel (15 %)	Sammelgel (5 %)
H ₂ O	4 ml	3,6 ml
30 % Acrylamid	7,5 ml	0,5 ml
Trenngelpuffer (2 M Tris-HCl pH 8,8)	3 ml	-
Sammelgelpuffer (1 M Tris-HCl pH 6,8)	-	0,8 ml
10 % SDS	150 µl	50 µl
10 % APS	50 µl	17 µl
TEMED	7,5 µl	5 µl

Tabelle 2.3: Midi-SDS-Gradientengel (10 – 17.5 % AA): (für 200×200×1,5 mm Gelgröße)

Trenngel:	10%	17,5%	Sammelgel
H ₂ O	9,8 ml	-	6,95 ml
30 % Acrylamid	8,0 ml	14,0 ml	1,65 ml
80 % Saccharose	1,4 ml	5,2 ml	-
Trenngelpuffer (2 M Tris-HCl pH 8,8)	4,5 ml	4,5 ml	-
Sammelgelpuffer (1 M Tris-HCl pH 6,8)	-	-	1,25 ml
10 % SDS	240 µl	240 µl	100 µl
10 % APS		100 µl	80 µl
TEMED		10 µl	8 µl

2.3.2 Native Gelelektrophorese solubilisierter Membranproteine (BN-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinkomplexen, die zuvor solubilisiert wurden, kam ein natives Gelsystem zum Einsatz (Schägger and von Jagow, 1991; Schägger et al., 1994).

Tabelle 2.4: BN-Gel (für 200×200×1 mm Gelgröße)

Trenngel:	5 %	12 %	Sammelgel
H ₂ O	7,52 ml	2,1 ml	7,7 ml
0,5 M Bistris, pH 7,0	1,8 ml	1,5 ml	1,5 ml
30 % Acrylamid	3 ml	6 ml	1,95 ml
2 M ε-Aminocaprinsäure	4,5 ml	3,75 ml	3,75 ml
87,5 % Glycerin	1,07 ml	1,6 ml	-
10 % APS	100 µl	50 µl	100 µl
TEMED	10 µl	5 µl	10 µl
Total	18 ml	15 ml	15 ml

Elektrophoresepuffer: 50 mM Tricin, 15 mM Bistris pH 7,0

Der Kathodenpuffer enthielt zusätzlich 0,01 % (w/v) Coomassie G-250 (50 mg/ 500 ml). Die Elektrophorese wurde über Nacht bei 100 V im Kühlraum durchgeführt. Die aufgetragenen Proben wurden entsprechend 2.4.4 präpariert.

2.3.3 Proteinfärbung

2.3.3.1 Coomassiefärbung und Autoradiographie

Färbelösung	1 g	Coomassie Brillant Blau R250
	0,25 g	Coomassie Brillant Blau G250
	210 ml	Ethanol
	25 ml	Methanol
	50 ml	Essigsäure
	215 ml	H ₂ O
Entfärbelösung	45 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Essigsäure
	45 % (v/v)	H ₂ O

Die SDS-Gele wurden für etwa 30 min bei 50 °C gefärbt und anschließend zunächst bei gleicher Temperatur entfärbt. Die weitere Entfärbung erfolgte bei Raumtemperatur für mindestens 1 h. Die Gele wurden dann für 2 h bei 80 °C getrocknet. Danach konnten sie über Nacht oder mehrere Tage auf Phospho-Imagerplatten exponiert werden. Die Auswertung der Autoradiographie erfolgte mittels Phosphoimager.

2.3.3.2 Coomassie-Colloidal-Färbung

Die Coomassie-Colloidal-Färbung von PAA-Gelelen wurde entsprechend des Protokolls von Neuhoff et al., 1988 durchgeführt.

2.3.4 ECL-Western Blot Analyse

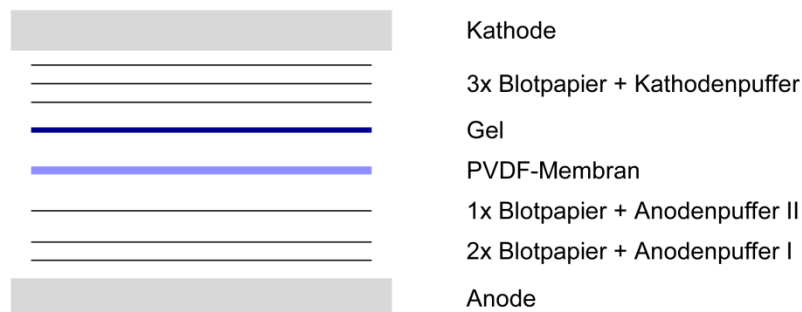
Die Western Analysen wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Kathodenpuffer	25 mM	Tris
pH 9,4	40 mM	ε-Aminocapronsäure
	10 %	Methanol
	0,1 %	SDS
Anodenpuffer I	0,3 M	Tris
pH 10,4	10 %	Methanol

Anodenpuffer II pH 10,4	25 mM 10 %	Tris Methanol
10× PBS	750 mM 30 mM 45 mM 15 mM	NaCl (43,8 g/l) KCl (2,2 g/l) Na ₂ HPO ₄ × 12 H ₂ O (16,1 g/l) KH ₂ PO ₄ (2,0 g/l)
Blockierer	5 % 1× 0,05 %	Magermilchpulver (50 g/l) PBS TWEEN 20 (2,5 ml Stammlösung (20 %)/l)
Waschlösung	0,05 % 1×	TWEEN 20 (2,5 ml Stammlösung (20 %)/l) PBS
Entwickler (frisch herstellen)	500 µl 1 M Tris-HCl pH 8,3 50 µl Luminol (Stammlösung 250 mM in DMSO) 22 µl Cumarsäure (Stammlösung 90 mM in DMSO) 3 µl H ₂ O ₂ 9,425 ml H ₂ O	

Blotten:

SDS-Gel für 5 min in Kathodenpuffer inkubieren (BN-Gel für min. 30 min). PVDF-Membran (*Immobilon™-P*, Millipore) und 6× Blotpapier zuschneiden. Vom Blotpapier 3 Blatt in Kathodenpuffer, 1 Blatt in Anodenpuffer II, 2 Blatt in Anodenpuffer I einweichen. PVDF-Membran in Methanol einweichen, dann in Anodenpuffer II.

Blot-Aufbau:**Immunodetektion:**

PVDF-Membran 30-60 sec in H₂O waschen und anschließend trocknen (min. 2 h oder über Nacht bei RT). 5 min in Methanol inkubieren. 2× 10 min mit H₂O waschen. Danach mind. 2 h in Blockierer inkubieren. 2 h Inkubation mit 1. Antikörper (1:1.000 gelöst in Blockierer).

4× mit Blockierer waschen. 1 h Inkubation mit 2. Antikörper (1:30.000 gelöst in Blockierer) und Streptavidin (1:8.000 - 1:10.000). 4× 5 min in Waschlösung waschen.

Entwickeln:

Plastikfolie zuschneiden, Membran 1 min in Entwickler inkubieren, dann kopfüber auf Folie legen und damit einwickeln. Membran für 10-15 min auf *HyperECL film* (Amersham) exponieren. Film entwickeln und fixieren.

2.3.5 Heterologe Expression von Proteinen

Die Proteinexpression erfolgte mit einem C-terminalen Hexahistidin-*tag* heterolog in *E. coli* (Vektor: pET26b, Stamm: Rosetta) nach folgenden Protokollen:

2.3.5.1 Analytische Proteinexpression

LB-Medium (flüssig):	Bacto-Tryptone	10 g
2× 500 ml	Bacto-Yeast extract	5 g
	NaCl	10 g
	auf pH 7,0 einstellen	ad 1 l
LBG-Medium (LB + 0,5% (w/v) Glucose)	20 % (g/v) Glucose (steril)	12,5 ml auf 500 ml LB
Puffer A (pH 8,0)	20 mM Tris-HCl pH 8,0	1 ml 2 M stock
100 ml	20 % Saccharose (w/v)	20 g
	2 mM EDTA	400 µl 0,5 M stock
		ad 100 ml
Puffer B (pH 8,0)	50 mM Tris-HCl pH 8,0	2,5 ml 2 M stock
100 ml	20 mM EDTA	800 µl 0,5 M stock
		ad 100 ml
Lysozym	in Puffer B	10 mg/ml

Bei der Expressionsanalyse im analytischen Maßstab werden 5 ml LBG (LB-Medium mit 0,5% (w/v) Glucose, inkl. Antibiotikum) mit je 1/50 (100 µl) einer Übernachtskultur (5 ml LBG) angeimpft und bis zu einer $OD_{600} = 1$ bei 37 °C inkubiert (ca. 3 h). Dann wird 1 ml Kultur entnommen, 1 min bei 16.000 g zentrifugiert und das Pellet in 150 µl 4× Laemmli-Probenpuffer aufgenommen (*Minus-Fraktion*). Die restliche Kultur (4 ml) wird mit final 1 mM IPTG (40 µl 0,1 M Stock/ 4 ml) versetzt. Die Inkubation nach der Induktion erfolgt bei 37 °C für weitere 3 h. Anschließend wird erneut 1 ml Kultur entnommen, 1 min bei 16.000 g

zentrifugiert und das Pellet in 150 µl 4× Laemmli-Probenpuffer aufgenommen (*Plus-Fraktion*). Die restlichen 3 ml Kultur werden für die Subfraktionierung verwendet.

Präparation der Subfraktionen:

Die Bakterienzellen werden durch Zentrifugation (1 min, 16.000 g) sedimentiert, in 1 ml Puffer A resuspendiert, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erneut zentrifugiert (5 min, 16.000 g). Der Überstand wird mit 2/5 (40%) Volumen 73% TCA versetzt, 15 min auf Eis inkubiert, 10 min bei 16.000 g zentrifugiert, zweimal mit 80% Aceton gewaschen und das Pellet nach Abdampfen des Acetons (10 min 40 °C Heizblock) in 50 µl 4× Laemmli-Probenpuffer aufgenommen (*Periplasmafraktion*). Das Pellet wird in 900 µl Puffer B resuspendiert und anschließend nach Zugabe von 100 µl Lysozym (10 mg/ml in Puffer B) bei RT 30 min inkubiert. Der Ansatz wird drei Gefrier/Tau-Zyklen unterzogen (jeweils in flüssigen N₂ einfrieren und anschließend bei 37 °C auftauen). Danach wird der Ansatz 5 min bei 2.500 g zentrifugiert und das Pellet in ca. 700 µl Puffer B resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 min 2.500 g) wird das Pellet in 50 µl 4× Laemmli-Probenpuffer aufgenommen (*inclusion bodies*). Der Überstand wird wie schon im Fall des Periplasmas TCA-gefällt und final in 50 µl 4× Laemmli-Probenpuffer aufgenommen (*Cytosol und Membranfraktion*). Die gewonnenen Fraktionen werden wie folgt auf ein SDS-Gel (vgl. Abschnitt 2.3.1) aufgetragen: 30 µl Minus-Fraktion, 30 µl Plus-Fraktion, 10 µl Periplasmafraktion, 10 µl *inclusion bodies*, 10 µl Cytosol-Membranfraktion.

2.3.5.2 Präparative Proteinexpression

Die Expression von Proteinen im präparativen Maßstab wurde basierend auf einem Protokoll durchgeführt, wie es in Rudolph et al., 1997 beschrieben ist.

LBG-Medium	vgl. Abschnitt 2.3.5.1	
Homogenisationspuffer	100 mM	Tris-HCl
	1 mM	EDTA
	pH 7,0 mit HCl einstellen, Lagerung bei 4 °C	
Membranwaschpuffer	1,5 M	NaCl
	6% (v/v)	Triton X-100
	60 mM	EDTA
Waschpuffer	100 mM	Tris-HCl
	20 mM	EDTA
	pH 7,0 mit HCl einstellen, Lagerung bei 4°C	

Zur Expression werden 500 ml LBG-Medium (inkl. entsprechendes Antibiotikum) mit 5 ml einer Übernachtskultur (5–20 ml LBG) angeimpft und bis zu einer $OD_{600} = 1$ bei 37 °C inkubiert. Die Induktion erfolgt durch Zugabe von final 1 mM IPTG. Anschließend wird die induzierte Expressionskultur weitere 3 h bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit werden die Zellen 15 min auf 4 °C abgekühlt, 30 min bei 4 °C und 4.000 U/min (Sorvall Super T21; SLC-750T-Rotor) zentrifugiert. Die sedimentierten Bakterien werden in 25 ml Homogenisationspuffer pro 5 g Frischgewicht vorsichtig resuspendiert, Lysozym zugegeben (1,5 mg Lysozym pro g Frischgewicht) und 30 min bei 4 °C inkubiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgt durch zweimalige "French Press" (SIMAMINGOR, Spectromic Instruments, French-Pressure-Cell FA-031). Die beim Aufschluss der Zellen freigesetzte DNA wird durch Zugabe von DNase (2,4 U pro ml "French Press"-Lösung und 3 mM $MgCl_2$) während 20 minütiger Inkubation bei 25 °C abgebaut. Zum Waschen der *inclusion bodies* wird nun 0,5 Volumen Membranwaschpuffer zugegeben. Nach 30 minütiger Inkubation auf einem Drehrad bei 4 °C werden die *inclusion bodies* 15 min bei 4 °C und 31.000 g zentrifugiert und mit Hilfe des Polytron® PT3000 (Kinematica® (Littau-Lucerne, Schweiz), Polytron PT-DA 3007/2) bei 12.000–14.000 U/min in 40 ml Waschpuffer resuspendiert. Dieser Waschschrift wird 4× wiederholt, um das Triton möglichst vollständig zu entfernen. Die gereinigten *inclusion bodies* werden abschließend 15 min bei 4 °C und 31.000 g zentrifugiert. Die Pellets können mehrere Wochen bei –20 °C gelagert bzw. direkt in 8 M Harnstoff aufgenommen werden. Das Lösen des Pellets erfolgt durch Resuspendieren mittels des Polytron® PT3000 mit nachfolgender Inkubation über Nacht auf einem Drehrad bei Raumtemperatur. Nach Zentrifugation für 30 min bei 25 °C und 31.000 g kann der Überstand für weitere Reinigungsschritte verwendet werden.

2.3.5.3 Reinigung heterologer His₆-Proteine durch Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie

Equilibrierungspuffer	8 M	Harnstoff	
	20 mM	NaH ₂ PO ₄	pH 7,5
Harnstoffpuffer	8 M	Harnstoff	
	1×	PBS	
Elutionspuffer	20 mM	Na ₂ HPO ₄	
	500 mM	NaCl	
	500 mM	Imidazol	
	pH 7,0 mit HCl einstellen, Lagerung bei 4 °C		

Zur Affinitätschromatographie wurde die Ni-NTA Sepharose™ 6 Fast Flow Matrix von GEHealthcare verwendet. Bei der Vorbereitung der Matrix wurden 2 ml Säulenmaterial zunächst mit entgastem ddH₂O gespült und anschließend mit Harnstoffpuffer equilibriert. Anschließend wurde die Ni-NTA Matrix auf eine Schwerkraftsäule (Bio-Rad) überführt.

Die *inclusion bodies* in Harnstoffpuffer aus der Proteinexpression wurden für die Ni-Affinitätschromatographie eingesetzt. Nach einem Zentrifugationsschritt (28.000 U/min; 1 h; Beckmann Optima™MAX Ultrazentrifuge, SW28 Rotor) wurde der Überstand auf die Säulenmatrix gegeben (4 °C, 15 µl/ min pumpen) (*Durchfluss D*). Danach wurde die Säulenmatrix mit 10 ml Harnstoffpuffer gewaschen (*Waschfraktion W*). Die Elution erfolgte mit 5× 2 ml Elutionspuffer (*Elutionsfraktionen E1-E5*). Je 10 µl der Fraktionen wurden zur Überprüfung der Reinigung einer SDS-PAGE unterzogen. Die erhaltenen Fraktionen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80°C gelagert.

2.3.6 Antikörperproduktion

Für die Herstellung eines Antikörpers gegen Cytochrom c1 wurde das Gen in den pET26b-Vektor kloniert (vgl. Abschnitt 2.2.3.2). Die Überexpression erfolgte im präparativen Maßstab in *E. coli* (vgl. Abschnitt 2.3.5.2). Die gereinigten *inclusion bodies* der Expression wurden mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Die erste Elutionsfraktion (E1) wurde über eine präparative SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der Coomassie-Colloidal-Färbung und Entfärbung mit H₂O wurde die Cytochrom c1 Bande ausgeschnitten und in 5 Aliquots getrennt. Diese wurden für die Antikörperproduktion eingesetzt. Die Antikörperproduktion selbst erfolgte durch die Firma Innovagen (Lund, Schweden).

2.4 Methoden zur *in vitro* Analyse von Proteinen

2.4.1 Gemeinsame Präparation von Mitochondrien und Chloroplasten aus Erbse (*Pisum sativum* L.)

Mitochondrienpräparation:

EB-Puffer	450 mM	Saccharose	
(Extraktionspuffer)	15 mM	MOPS	
	1,5 mM	EGTA-KOH pH 7,2	
	pH 7,4 mit KOH einstellen; autoklaviert bei 4 °C lagern		
	0,6 %	PVP	}
	0,2 %	BSA	} erst vor Gebrauch zufügen
	10 mM	DTT	
	0,2 mM	PMSF	}

WB-Puffer	300 mM	Saccharose		
(Waschpuffer)	10 mM	MOPS		
	1 mM	EGTA-KOH pH 7,2		
	pH 7,2 mit KOH einstellen; autoklaviert bei 4 °C lagern			
	0,2 mM	PMSF	(erst vor Gebrauch zufügen)	
RB-Puffer	400 mM	Mannitol		
(Resuspensionspuffer)	10 mM	MOPS		
	1 mM	EGTA-KOH pH 7,2		
	pH 7,2 mit KOH einstellen; autoklaviert bei 4 °C lagern			
	0,2 mM	PMSF	(erst vor Gebrauch zufügen)	
5× Gradientenpuffer	1,5 M	Saccharose		
	50 mM	MOPS		
	pH 7,2 mit KOH einstellen; autoklaviert bei 4 °C lagern			
Percoll-Lösungen	Stufe:	18 %	23 %	40 %
	5× Gradientenpuffer:	4 ml	4 ml	4 ml
	Percoll:	3,7 ml	4,7 ml	8 ml
	H ₂ O:	12,3 ml	11,3 ml	8 ml
Chloroplastenpräparation:				
5× SRM	250 mM	HEPES-KOH	pH 8,0	
(Sorbitolresuspensions- medium)	1,65 M	Sorbitol		
Percoll-Lösungen	Stufe:	35 %	80 %	
	5× SRM:	2,0 ml	2,0 ml	
	Percoll:	3,5 ml	8,0 ml	
	H ₂ O:	4,5 ml	-	

Alle folgenden Schritte werden bei 4 °C im Kühlraum bzw. auf Eis durchgeführt und die verwendeten Puffer bzw. Geräte (Zentrifuge, Rotor) auf 4 °C vorgekühlt. Um die Zerstörung der Organellen durch Scherkräfte zu verhindern, werden die verwendeten Pipettenspitzen abgeschnitten.

*Mitochondrienpräparation:**Zellaufschluss und differentielle Zentrifugation:*

Etwa 40 - 60 g junge Erbsenkeimlinge (ca. 8-12 Tage alt) werden mit 250 ml eiskaltem EB-Puffer im *Waring blender* homogenisiert (5×2 s), das Homogenat anschließend durch zwei Lagen Miracloth (100 μ m Porengröße; Calbiochem, La Jolla, USA) und eine Schicht Nylongewebe (31 μ m Porengröße) filtriert und danach für 5 min bei 2.000 g zentrifugiert (Zentrifuge: Sorvall Super T21; Rotor: Sorvall SLC-250T; diese werden auch bei den nächsten beiden Zentrifugationsschritten eingesetzt). Das Sediment wird vorsichtig in 10 ml 1 \times SRM resuspendiert. Dabei wird der Zentrifugenbecher auf Eis gestellt und das Sediment vorsichtig mit einem weichen Pinsel gelöst. Dieses Sediment wird zur Chloroplastenpräparation eingesetzt und während der Mitochondrienpräparation dunkel und auf Eis gelagert. Der Überstand wird 5 min bei 6.000 g erneut zentrifugiert. Das Sediment wird wieder verworfen und der Überstand ein drittes Mal zentrifugiert, diesmal 10 min bei 16.000 g. Danach wird das Sediment vorsichtig in 2 ml WB-Puffer resuspendiert. Dabei wird der Zentrifugenbecher auf Eis gestellt und das Sediment vorsichtig mit einem weichen Pinsel gelöst.

Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation:

In zwei 30 ml Corex-Zentrifugenröhrchen wird jeweils ein dreistufiger Percollgradient vorgelegt (je 6 ml von 40 %-, 23 %- und 18 %-Percoll-Lösung vorsichtig mit Hilfe von Korkstückchen übereinanderschichten) und mit je 2 ml der resuspendierten Organellen vorsichtig überschichtet und 45 min bei 12.000 g zentrifugiert (Zentrifuge Sorvall Super T21; Rotor: Sorvall SL-50T, Bremse ab 5000 g abstellen). Die intakten Mitochondrien werden aus der Interphase zwischen der 23 %- und der 40 %-Percollstufe entnommen und in einen 250 ml-Zentrifugenbecher überführt, in dem 100 ml RB-Puffer vorgelegt sind. Anschließend werden die Mitochondrien 15 min bei 10.000 U/min sedimentiert (Zentrifuge Sorvall Super T21; Rotor: Sorvall SLC-250T). Der Großteil des Überstandes wird vorsichtig entfernt, das Sediment in RB-Puffer gelöst und in 30 ml Corex-Zentrifugenröhrchen überführt. Es wird erneut zentrifugiert (15 min bei 10.000 rpm zentrifugieren (Sorvall Super T21; Rotor: Sorvall SL-50T). Die Mitochondriensuspension wird mindestens zweimal in RB gewaschen. Das Sediment wird dann in einem maximalen Volumen von 1 ml RB-Puffer resuspendiert und 15 min bei 13.000 U/min (Zentrifuge: Biofuge fresco/Heraeus). Das Sediment wird schließlich in ca. 200 μ l RB-Puffer resuspendiert und der Proteingehalt bestimmt.

Proteinbestimmung mittels Bradford-Reagenz:

Die Proteinbestimmung basiert auf Bradford, 1976.

1 μ l Mitochondriensuspension werden mit 99 μ l 1 M Harnstoff und 700 μ l H₂O versetzt und 1 min bei 13.000 U/min zentrifugiert (Biofuge/Heraeus). Der Überstand wird mit 200 μ l Bradford-Reagenz versetzt. Die Extinktion wird nach 5 min Inkubationszeit bei 595 nm

gemessen (Shimadzu UV-1602) und die Protein-Konzentration aus einer Eichgeraden bestimmt.

Chloroplastenpräparation:

Für die Chloroplastenpräparation wird das resuspendierte Pellet des ersten Schrittes der differentiellen Zentrifugation eingesetzt. In zwei 15 ml Corex-Zentrifugenröhrchen werden je 7 ml des 35 %igen Percollkissens vorgelegt, mit den resuspendierten Chloroplasten vorsichtig überschichtet und 7 min bei 4.000 U/min zentrifugiert (Zentrifuge Sorvall Super T21; Rotor: SL-50T). Das Sediment, das zum Großteil aus intakten Chloroplasten besteht, wird in ca. 10 ml 1× SRM resuspendiert und 2 min bei 3.000 U/min sedimentiert (Zentrifuge Sorvall Super T21; Rotor: SL-50T). Dieser Waschschrift wird wiederholt. Das Sediment wird schließlich in ca. 2 ml 1× SRM resuspendiert und der Chlorophyllgehalt bestimmt.

Bestimmung des Chlorophyllgehaltes:

Die Chlorophyllbestimmung basiert auf Arnon, 1949.

10 µl Chloroplastensuspension werden mit 990 µl 80 % Aceton versetzt und gut gemischt (Vortex). Anschließend wird 2 min bei 13.000 U/min zentrifugiert (Biofuge fresco/Heraeus). Die Extinktion des Überstands wird bei 645 und 663 nm gemessen (Shimadzu UV-1602) und die Chlorophyll a-Konzentration nach folgender Formel berechnet:

$$c \text{ [µg Chlorophyll/ml]} = 20.2 \times A_{645} + 8.02 \times A_{663} \quad (\times 100)$$

2.4.2 Fraktionierung von Mitochondrien

SFB	10 mM	HEPES-KOH pH 7,6
(Subfraktionierungspuffer)	60 mM	Saccharose
	1 mM	PMSF

Die Mitochondrien werden sedimentiert (15 min 13.000 rpm, 4 °C, Biofuge fresco/Heraeus). Der Überstand wird verworfen und das Pellet in SFB resuspendiert, sodass die Proteinkonzentration $c = 10 \text{ µg/µl}$ entspricht. Der Aufschluss der Mitochondrien erfolgt durch 3 Gefrier-Tau-Zyklen in Flüssig-N₂. Anschließend erfolgt die Trennung durch Ultrazentrifugation (15 min 200.000 g). Das Pellet repräsentiert die Membranfraktion (mf). Der Überstand entspricht der löslichen Fraktion (sf). Die Proben werden mit Laemmli-Probenpuffer versetzt, wobei ein Endvolumen von 50 µl erreicht werden soll.

2.4.3 Fraktionierung von Chloroplasten

HM	10 mM	HEPES-KOH pH 8,0
(Homogenisationsmedium)	5 mM	MgCl ₂

HME		HM
	10 mM	EDTA

Die Chloroplasten werden sedimentiert (3 min, 6.000 U/min, 4 °C, Biofuge fresco/Heraeus), der Überstand verworfen und das Pellet in 75 µl HME-Puffer resuspendiert. Bei 10 minütiger Inkubation auf Eis erfolgt die Osmolyse. Danach werden die Thylakoide durch Zentrifugation sedimentiert (5 min, 13.000 U/min). Der freigesetzte Stromaextrakt im Überstand wird vollständig abgenommen und mit 25 µl 4× Laemmli-Puffer versetzt (Stroma-Fraktion s). Durch zweimaliges Waschen der Thylakoide in jeweils 200 µl HM-Puffer soll das restliche Stroma entfernt werden (Zentrifugation bei 13.000 U/min für 5 min). Das Pellet wird dann wieder in 200 µl HM-Puffer resuspendiert und gleichmäßig auf zwei Reaktionsgefäße verteilt, wobei die eine Hälfte (100 µl) mit 10 µl Thermolysin-Lösung versetzt und 30 min auf Eis inkubiert wird (plus-Fraktion t+). Die andere Hälfte inkubiert ohne Zugabe von Thermolysin während dieser Zeit auf Eis (minus-Fraktion t-). Anschließend werden beide Fraktionen zentrifugiert (5 min, 13.000 U/min) und die Sedimente in jeweils 50 µl 2× Laemmli-Puffer (mit EDTA) aufgenommen. Zum Schluss werden alle Fraktionen denaturiert (5 min, 95 °C).

2.4.4 Solubilisierung organellärer Proteine

Lysepuffer	50 mM	Bistris
	1 M	ε-Aminocaprinsäure
	5 mM	EDTA
	1 mM	PMSF
5 % Digitonin	50 mg/ 1 ml in ddH ₂ O	
	5 min bei 100 °C lösen	
10 % Dodecylmaltosid	50 mg/ 0,5 ml in ddH ₂ O	

Die Mitochondrien in RB waschen und abzentrifugieren. Das Pellet in 20 µl Lysepuffer und 3 µl 10 % Dodecylmaltosid resuspendieren. Den Ansatz 1 h bei 4 °C auf dem Rotator inkubieren und anschließend zentrifugieren (1 h, 4 °C, 19000 rpm). Den Überstand mit 5 % BN-Probenpuffer (5 % Coomassie-G250) versetzen, 10 min auf Eis inkubieren und danach für 5 min bei 19000 rpm zentrifugieren. Der Überstand wird auf ein BN-Gel aufgetragen.

Die Chloroplasten in 1× SRM waschen und abzentrifugieren. Das Pellet in 15 µl Lysepuffer und 7,5 µl 5 % Digitonin resuspendieren. Den Ansatz 1 h bei 4 °C auf dem Rotator

inkubieren und anschließend zentrifugieren (1 h, 4 °C, 19000 rpm). Den Überstand mit 5 % BN-Probenpuffer (5 % Coomassie-G250) versetzen, 10 min auf Eis inkubieren und danach 5 min bei 19000 rpm zentrifugieren. Der Überstand wird auf ein BN-Gel aufgetragen.

2.4.5 Gemeinsame Präparation von Mitochondrien und Chloroplasten aus Spinat (*Spinacia oleracea* L.)

Die Präparation der Organellen aus Spinat erfolgt prinzipiell analog zur Präparation aus Erbse (vgl. Abschnitt 2.4.1). Im Folgenden wird auf die Abweichungen zu diesem Protokoll eingegangen.

Mitochondrienpräparation:

Percoll-Lösungen	Stufe:	5 %	25 %	45 %
	5× Gradientenpuffer:	4 ml	4 ml	4 ml
	Percoll:	1 ml	5 ml	9 ml
	H ₂ O:	15 ml	11 ml	7 ml

Chloroplastenpräparation:

HoM	0,33 M	Sorbitol	
(Homogenisations- medium)	2 mM	EDTA	
	1 mM	MgCl ₂	
	1 mM	MnCl ₂	
	50 mM	HEPES-KOH	pH 7,6
	5 mM	Na-Ascorbat	(erst vor Gebrauch zufügen)

PBF-Percoll-	3 % (w/v)	PEG 6000	} gelöst in Percoll
Stammlösung	1 % (w/v)	BSA	
	1 % (w/v)	Ficoll 4000	

Percoll-Lösungen	Stufe:	45 %	85 %
	Sorbitol:	3,0 g	1,8 g
	PBF-Stammlösung:	22,5 ml	25,5 ml
	1 M HEPES-KOH pH 7,6:	2,5 ml	1,5 ml
	0,5 M EDTA pH 8,0:	200 µl	120 µl
	1 M MgCl ₂ :	50 µl	30 µl
	H ₂ O:	24,8 ml	2,8 ml
	ΣV:	50 ml	30 ml

Das Pflanzenmaterial (Spinatblätter) wird am Abend vor der eigentlichen Präparation geerntet, in eiskaltem ddH₂O gewaschen, mittels Salatschleuder getrocknet und über Nacht dunkel im Kühlraum gelagert, um den Stärkegehalt zu reduzieren. Für den 3-Stufen-

Percollgradient (Mitochondrienpräparation) werden in zwei 30 ml Corex-Zentrifugenröhrchen je 5 ml 45 %, 12 ml 25 % und 4 ml 5 % Percoll-Lösung vorsichtig übereinandergeschichtet. Für den 2-Stufen-Percollgradient (Chloroplastenpräparation) werden in zwei 15 ml Corex-Zentrifugenröhrchen je 3 ml 85 % und 5 ml 45 % Percoll-Lösung vorsichtig übereinandergeschichtet. Statt SRM wird für die Chloroplastenpräparation HoM verwendet.

2.4.6 Gemeinsame Präparation von Mitochondrien und Chloroplasten aus Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.)

Die Präparation der Organellen aus Kartoffel erfolgt analog zur Präparation aus Erbse (vgl. Abschnitt 2.4.1).

2.4.7 *In vitro* Transkription

5× NTPs red.GTP	je 2,5 mM 0,25 mM	ATP, CTP, UTP GTP
25× GTP	11,25 mM	GTP
CAP	10 mM	m ⁷ G(5')ppp(5')G

Vor der *in vitro* Transkription werden alle verwendeten Plasmide hinter der inserierten cDNA mittels Restriktionsendonukleasen linearisiert, um eine effiziente mRNA-Synthese zu erreichen. Die Transkription erfolgt dann je nach Orientierung der codierenden DNA mit der T3- bzw. T7-RNA-Polymerase. Die Isolierung der eingesetzten Plasmid-DNA erfolgte im Midi-Maßstab. Die Transkription wird in einem Endvolumen von 25 µl durchgeführt (Tabelle 2.5). Nach einer Inkubation von 60 min bei 37 °C wird 1 µl 25× GTP zugegeben und für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Der Reaktionsansatz wird dann auf 100 µl aufgefüllt, mit 5 µl 4 M Ammoniumacetat und 250 µl Ethanol bei -20 °C gefällt und dort gelagert.

Tabelle 2.5: *in vitro* Transkriptionsansatz unter Nutzung des T3- bzw. des T7-Promotors

Orientierung:	T3 ⇒ T7	T7 ⇒ T3
DEPC-ddH ₂ O	3,3 µl	10,3 µl
5× T3-Puffer	5,0 µl	-
10× T7-Puffer	-	2,5 µl
5× NTPs, red. G	5,0 µl	5,0 µl
CAP (10 mM)	1,2 µl	1,2 µl
DTT (100 mM)	7,5 µl	2,5 µl

DNA, linearisiert (1 µg/µl)	2,0 µl	2,0 µl
RNase-Inhibitor (50 U/µl)	0,5 µl	0,5 µl
T3-RNA-Polymerase (50 U/µl)	0,5 µl	-
T7-RNA-Polymerase (20 U/µl)	-	1,0 µl
Total:	25 µl	25 µl

2.4.8 *In vitro* Translation

2.4.8.1 Translation mittels Reticulocytenlysat

Die Translation wurde mit einem Reticulocytenlysat aus Kaninchen (Promega, Madison USA), einem zellfreien eukaryontischen Translationssystem, durchgeführt. Dieses zellfreie System hat den Vorteil, dass eine ganz bestimmte RNA als *Template* verwendet werden kann und außerdem die Markierung des später zu untersuchenden Proteins durch Einbau radioaktiv-markierten [³⁵S] Methionins möglich ist.

Zur Translation der RNA werden 10 µl des gefällten Transkriptionsansatzes entnommen und 30 min bei 4 °C und 15.000 U/min (Zentrifuge: Sorvall Super T21; Rotor: Sorvall ST-Micro) zentrifugiert. Anschließend wird das Pellet an der Luft getrocknet. Der Translationsansatz (Tabelle 2.6) wird auf das getrocknete RNA-Pellet gegeben und für 60 min bei 30 °C inkubiert. Die Translationsansätze können nach der Inkubation bei –80 °C gelagert bzw. je 0,5–1 µl zum Test einer SDS-PAGE unterzogen und autoradiographisch überprüft werden.

Tabelle 2.6: *in vitro*-Translationsansatz mit Reticulocytenlysat

ddH ₂ O	4,35 µl
Reticulocytenlysat	6,25 µl
Aminosäure-Mix (ohne Met)	0,25 µl
1 M KCl	0,9 µl
0,1 M DTT	0,25 µl
[³⁵ S] – Met	0,50 µl
Total	12,5 µl

2.4.8.2 Translation mittels Weizenkeimextrakt

Eine weitere Methode zur Synthese radioaktiv-markierter Proteine ist die *in vitro*-Translation mittels Weizenkeimextrakt (Promega, Madison, USA). Die RNA wird analog zur Reticulocytenlysat-Translation (vgl. Abschnitt 2.4.8.1) gewonnen. Die pelletierte RNA wird in 3,5 µl H₂O resuspendiert und dann mit dem Translationsansatz (Tabelle 2.7) gemischt. Die Reaktion erfolgt für 1-2 h bei 25 °C. Anschließend wird entsprechend 2.4.8.1 verfahren.

Tabelle 2.7: *in vitro*-Translationsansatz mit Weizenkeimextrakt

ddH ₂ O	1,15 µl
Weizenkeimextrakt	6,25 µl
Aminosäure-Mix (ohne Met)	1,00 µl
[³⁵ S] – Met	0,60 µl
RNA in H ₂ O	3,5 µl
Total	12,5 µl

2.4.9 *In vitro* Import

Thermolysin-Lösung	2 mg 25 mM	Thermolysin/ml CaCl ₂
4× Laemmli-Puffer	0,25 M 8 % (w/v) 40 % (w/v) 20 % (w/v) 0,016 % (w/v)	Tris-HCl pH 6,8 SDS Glycerin β-Mercaptoethanol Bromphenolblau
2× Laemmli-Puffer (+ EDTA)	50 % (v/v) 20 mM	4× Laemmli-Puffer EDTA
2× Importpuffer	0,6 M 30 mM 10 mM 0,1 % pH 7,4	Saccharose HEPES-KOH KH ₂ PO ₃ BSA

Tabelle 2.8: Import-Mastermix

Stock		ΣV _{final} = 1 ml	C _{final}
	2× Import buffer	0,5 ml	1×
1 M	MgCl ₂	4 µl	4 mM
250 mM	Methionin	16 µl	4 mM
100 mM	ATP	40 µl	4 mM
100 mM	GTP	10 µl	1 mM
100 mM	ADP	2 µl	0,2 mM
100 mM	Malat	50 µl	5 mM
0,5 M	DTT	10 µl	4,5 mM
1 M	Potassium acetat	10 µl	10 mM
1 M	NaHCO ₃ (fresh)	10 µl	10 mM
	ddH ₂ O	348 µl	

2.4.9.1 Standardansatz

Die Mitochondrien wurden auf eine Proteinkonzentration von 10 µg/µl in RB eingestellt. Die Chloroplasten wurden auf eine Chlorophyllkonzentration von 1 mg/ml in 1× SRM eingestellt. Beim Pipettieren der Organellen wurden wieder abgeschnittene Spitzen verwendet, um die Beschädigung der Organellen durch Scherkräfte zu vermeiden. Der Importansatz wurde 25 min bei 25 °C im beleuchteten Wasserbad inkubiert, die Importreaktion durch die Zugabe von 90 µl eiskaltem 1× Importpuffer abgestoppt und der Reaktionsansatz geteilt (2× 100 µl).

Tabelle 2.9: Standardimportansatz

	Mitochondrienimport M	Chloroplastenimport C
Mitochondrien (10 µg/µl Protein)	10 µl	-
Chloroplasten (1 µg/µl Chlorophyll)	-	25 µl
<i>In vitro</i> Translation	10 µl	10 µl
Import-Mastermix	90 µl	75 µl
Total	110 µl	110 µl

Ein Teil wurde sedimentiert (Chloroplasten: 3 min, 4 °C, 3.500 g; Mitochondrien: 15 min, 4 °C, 16.000 g) und das Pellet gewaschen (Chloroplasten: 200 µl 1× SRM; Mitochondrien: 200 µl RB-Puffer). Dieser Waschschrift wurde nochmals wiederholt und das Pellet in 20 µl 2× Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95 °C denaturiert (C-, M-).

Der zweite Teil des abgestoppten Importansatzes wurde mit 1/20 Volumen Thermolysin (2 mg/ml in 25 mM CaCl₂) versetzt und 40 min auf Eis inkubiert. Nach Abstoppen des Verdauens durch Zugabe von 1/50 Volumen 0,5 M EDTA wurden auch diese Ansätze zentrifugiert (Chloroplasten: 3 min, 4 °C, 3.500 g; Mitochondrien: 15 min, 4 °C, 16.000 g), die Pellets resuspendiert (Chloroplasten: 200 µl 1× SRM; Mitochondrien: 200 µl RB-Puffer), dieser Waschschrift wiederholt und die gewaschenen Pellets in 20 µl 2× Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95 °C denaturiert. Nach einer abschließenden Zentrifugation der denaturierten Proben (1 min, 6.000 g) konnten die Überstände über SDS-PAGE analysiert werden. Bei vollständiger Auftragung (20 µl) entsprach dies bei den Chloroplasten einer Chlorophyllmenge von 12,5 µg (C-, C+) und bei den Mitochondrien einer Proteinmenge von 50 µg (M-, M+).

2.4.9.2 Gemischter Ansatz

Der gemischter Importansatz wurde prinzipiell nach dem Protokoll von Rudhe et al., 2002a durchgeführt. Der genaue Ablauf ist im Folgenden dargestellt (Tabelle 2.10).

Tabelle 2.10: Fließschema für die Durchführung des gemischten Importansatzes

	M – Mitochondrienimport	CM – Gemischter Import		C – Chloroplastenimport
Ansatz	100 µg Protein (Mitos)	100 µg Protein (Mitos)		---
Σ 110 µl	---	25 µg Chlorophyll		25 µg Chlorophyll
	10 µl IVTL	10 µl IVTL		10 µl IVTL
	90 µl dual-MM	65 µl dual-MM		75 µl dual-MM
Inkubation	20 min 25 °C im Licht			
Aliquotieren	Ansatz + 90 µl 1× Importpuffer 2 Aliquots à 100 µl	Ansatz + 90 µl 1× Importpuffer 2 Aliquots à 100 µl		Ansatz + 90 µl 1× Importpuffer 2 Aliquots à 100 µl
Protease- verdau	Aliquot 1: Kein Proteaseverdau		Aliquot 2: Thermolysin-verdau: + 9 µl 2 mg/ml Thermolysin 30 min auf Eis Stop: + 3 µl 0.5 M EDTA	
Reinigung	über 20 % - Percoll	über 4 % - Percoll, 30 s bei 13000 rpm max.		über 35 % - Percoll
	M	cM (obere Phase)	Cm (untere Phase)	C
Waschen	In 200 µl RB	In 200 µl RB	In 200 µl 1× SRM	In 200 µl 1× SRM
Fraktionen	M- / M+	cM- / cM+	Cm- / Cm+	C- / C+

2.4.9.3 Ionophoren-Ansätze (Nigericin, Valinomycin)

Valinomycin	Stammlösung:	10 mM in 100% EtOH
	Stammlösung schrittweise mit 1× Importpuffer verdünnen → $c_{\text{final}} = 0,1 \text{ mM}$	
Nigericin	Stammlösung:	0,1 mM in 100% EtOH

Die Importansätze (Organellen + Import-Mastermix) wurden vor Substratzugabe mit Valinomycin bzw. Nigericin (Tabelle 2.11) versetzt und 30 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Danach wurden 10 µl Substrat (*in vitro* Translation) zugeben. Der Import und die Probenaufarbeitung erfolgte wie für den Standardimport beschrieben (vgl. Abschnitt 2.4.9.1).

Tabelle 2.11: Eingesetzte Ionophorenkonzentrationen

Ansatz	Valinomycin	Nigericin
	+ 1,1 µl 0,1 mM	+ 2,3 µl 0,1 mM
		+ 1,1 µl 1 M KCl
Finale Konzentration	1 µM	2 µM

2.4.9.4 Kompetitionsansätze

Die Konkurrenzexperimente wurden mit überexprimiertem Protein (Tabelle 2.12) durchgeführt. Die Konzentrationen der Konkurrenzproteine im Importansatz lagen zwischen 0 und 1,5 μM . Dabei wurde in jedem Ansatz die gleiche Konzentration Harnstoff zugesetzt. Der Konkurrenzmix (Konkurrenzprotein + Harnstoff) wurde zusammen mit der Translation im Reaktionsgefäß vorgelegt. Anschließend wurde zunächst der Import-Mastermix und dann die Organellen entsprechend einem Standardimportexperiment (vgl. Abschnitt 2.4.9.1) zugegeben. Der Import und die Probenaufarbeitung erfolgte analog dem Standardimport (vgl. Abschnitt 2.4.9.1).

Tabelle 2.12: Eingesetzte Konkurrenzproteine

Konkurrenz	OEC33	FNR	Cytc1
Überexpr. Protein	200 μM in 7 M Harnstoff	140 μM in 7 M Harnstoff	64 μM in 8 M Harnstoff
1/10 in 1 \times Importpuffer	20 μM in 0,7 M Harnstoff	14 μM in 0,7 M Harnstoff	-

2.5 Methoden zur *in vivo* Analyse von Proteinen

2.5.1 Biolistische Transformation

Plasmid-DNA	300 ng/ μl in ddH ₂ O	pRT- Ω /Not/Asc::Konstrukt
Goldpartikel	60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	\varnothing 0,6 μm
autoklavierte Träger		
Agar-Platten	2 % (w/v) Micro-Agar	
CaCl ₂	2,5 M in ddH ₂ O	
Spermidin (free base)	0,1 M in ddH ₂ O	

Die verwendete biologische Schussapparatur wurde von der technischen Abteilung der Universität Freiburg angefertigt. Das im Folgenden beschriebene Protokoll wurde in unserer Arbeitsgruppe etabliert (Baudisch, 2006).

Präparation des Pflanzenmaterials:

Zur Transformation werden ca. 2 Wochen alte, bereits geöffnete Blätter von *Pisum sativum* verwendet. Die Blätter werden unter sterilen Bedingungen zentral auf Agar-Platten aufgelegt.

Präparation der Goldpartikel:

Die Goldpartikel müssen am Tag des Partikelbeschusses frisch präpariert werden. 2 mg der verwendeten Goldpartikel werden dreimal in je 1 ml 100 % Ethanol gewaschen und anschließend in 33,3 µl sterilem ddH₂O resuspendiert (finale Konzentration: 60 µg/µl).

Tabelle 2.13: Biolistische Transformation: Präzipitationsansatz

Lösung	Volumen
Goldpartikel (60 µg/µl)	3,3 µl
Plasmid (300 ng/µl)	1,3 µl
CaCl ₂ (2,5 M)	4,0 µl
Spermidin (0,1 M)	1,0 µl

Präzipitation der DNA auf die Goldpartikel:

Der Fällungsansatz (Tabelle 2.13) wird sorgfältig gemischt, 10 min bei RT inkubiert und anschließend bei 16.060 g für 15 bis 30 s bei RT zentrifugiert. 7,1 µl des Überstandes werden verworfen.

Partikelbeschuss:

Schussapparatur vorbereiten (Sterilbank, Vakuumpumpe anschließen, Heliumschlauch anschließen, Gasventil öffnen (Druck = 12 bar), Kontrollapparatur einschalten). 2,5 µl Fällungsansatz auf den Träger laden und in der Schussapparatur befestigen. Zielgewebe auf Agar-Platten in der biolistischen Kammer positionieren. Der Abstand zwischen Träger und Pflanzenmaterial sollte 8,0 cm (entspricht der 2. Ebene von oben) betragen. Die Partikel werden mit Hilfe eines Heliumdruckes (12 bar) beschleunigt und in das Zielgewebe geschossen. Der Beschuss erfolgt unter Vakuum, wobei auf der entsprechenden Anzeige ein Wert von -0,8 bar eingestellt wird. Nach Auslösen des Schusses über die Kontrollapparatur wird das Vakuum reduziert.

Inkubation:

Im Anschluss an den Beschuss wird auf die Agar-Platten mit dem Pflanzenmaterial ca. 500 µl steriles Leitungswasser gegeben. Die Platten werden mit Parafilm™ luftdicht verschlossen und bei RT dunkel inkubiert. Anschließend erfolgte die mikroskopische Analyse (siehe Abschnitt 2.5.2).

2.5.2 Mikroskopie*Präparation des Pflanzenmaterials für die Mikroskopie:*

Ein Stück des Blattgewebes wurde mit Leitungswasser infiltriert und mit der oberen Blattepidermis nach oben auf einen Objektträger positioniert, das entsprechende

Einschlussmedium (meistens Leitungswasser) dazugegeben und anschließend mittels eines Deckglases luftblasenfrei bedeckt.

Mikroskopische Analyse und Bilddokumentation:

Das präparierte Pflanzenmaterial wurde mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie untersucht und dokumentiert (Zeiss LSM 510).

2.6 Auswertung der Daten

2.6.1 Datenverarbeitung

Programm	Anwendung
AIDA (<i>advanced image data analyser</i> – Raytest/Fujifilm)	Autoradiographie
Image Gauge Version 4.0 (Fujifilm)	Autoradiographie
Canvas (ACD Systems)	Bildbearbeitung
DNASTAR	Sequenzanalyse
LSM Image Browser (Carl Zeiss AIM)	CLSM Datenverwaltung
AxioVision 4.5 (Carl Zeiss)	AxioCam Datenverwaltung

2.6.2 Auswertung der mikroskopischen Bilder

Anhand der Durchlichtaufnahme der transformierten Zelle konnte die Zellkontur markiert werden (Abb. 2.3). Die Überlagerung der Fluoreszenzbilder wurde mit der Konturlinie verknüpft, um die Begrenzung zwischen transformierter Zelle und den nicht-transformierten Nachbarzellen deutlich zu machen.

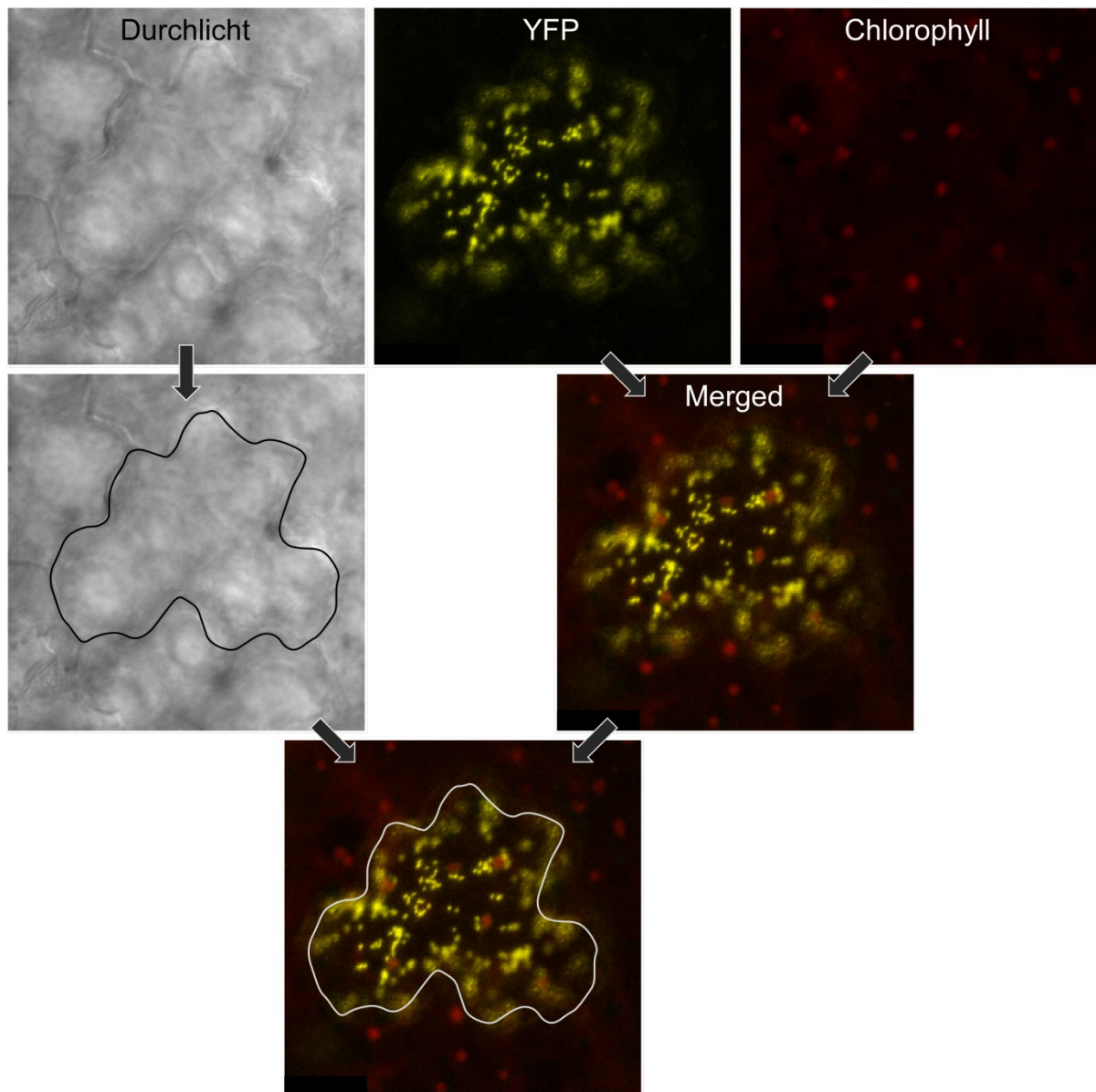


Abb. 2.3: Bearbeitung mikroskopischer Bilder. Die Markierung der Zellkontur in den Fluoreszenzaufnahmen erfolgte auf Basis der Durchlichtaufnahme. Durch Überlagerung mit YFP- und Chlorophyll-Fluoreszenzaufnahmen (*Merged*) wird die Begrenzung der transformierten Zelle deutlich.

3 ERGEBNISSE

3.1 Gemeinsame Präparation importkompetenter Mitochondrien und Chloroplasten aus Blattgewebe

3.1.1 Methodenetablierung

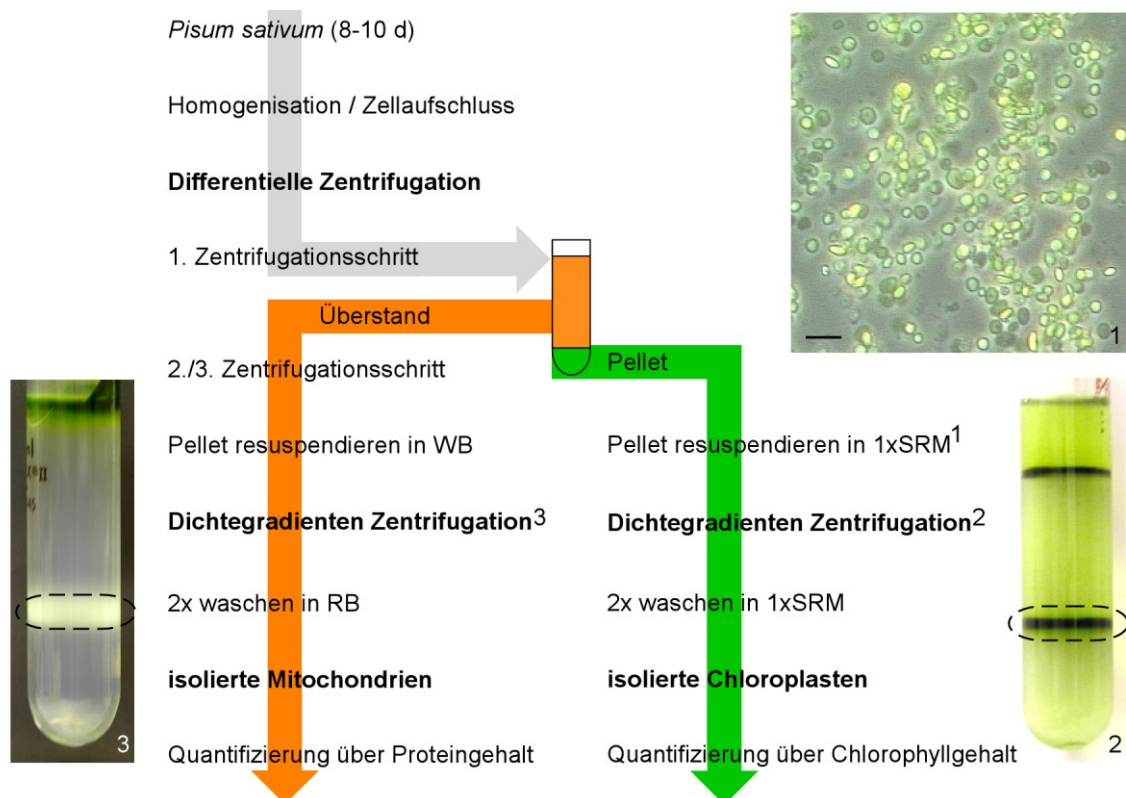


Abb. 3.1: Parallelpräparation von Mitochondrien und Chloroplasten aus *Pisum sativum*. Das homogenisierte Pflanzenmaterial wird einer differentiellen Zentrifugation unterzogen. Das resuspendierte Pellet des ersten Zentrifugationsschrittes wurde lichtmikroskopisch untersucht (1), um die Menge an intakten Chloroplasten festzustellen. Über einen zweistufigen Percollgradienten (2) werden die intakten von den aufgebrochenen Chloroplasten getrennt. Das letzte Pellet der differentiellen Zentrifugation wird resuspendiert und über einen dreistufigen Percollgradienten (3) werden die intakten Mitochondrien isoliert.

Grundlage für die *in vitro* Analyse von Proteintransportvorgängen ist eine geeignete Methode zur Präparation importkompetenter Organellen. Die Etablierung einer solchen Methode stand eingangs im Fokus der Arbeit. Das Ziel war, sowohl Mitochondrien als auch Chloroplasten aus ein und demselben Gewebe zu erhalten. Dadurch ist sichergestellt, dass sie hinsichtlich Entwicklungsphase und Umwelteinflüssen absolut identische Bedingungen aufweisen. Es wurde Blattgewebe von Erbse eingesetzt, da Erbse eine übliche

Modellpflanze zur Isolierung von Chloroplasten für Proteintransportstudien ist und auch in unserer Arbeitsgruppe routinemäßig verwendet wird. Die Methode zur Präparation der Organellen wurde darauf ausgerichtet, dass beide Organellen aus ein und demselben Homogenat isoliert werden können (Abb. 3.1).

Für die Parallelpräparation wird Blattmaterial homogenisiert und dann einer Kombination aus differentieller und Dichtegradientenzentrifugation unterzogen. Nach dem ersten Schritt der differentiellen Zentrifugation wird der Überstand für die weitere Mitochondrienisolierung eingesetzt. Das Pellet sollte den Großteil der Chloroplasten enthalten. Das resuspendierte Pellet wurde lichtmikroskopisch daraufhin untersucht, wie hoch der Anteil intakter Chloroplasten war (Abb. 3.1 Bild 1). Intakte Plastiden heben sich, da sie von einer doppelten Hüllmembran umgeben sind, im negativen Phasenkontrast als helle Vesikel von den dunkel erscheinenden, defekten Plastiden ab (Joyard et al., 1983). Das Pellet des ersten Schrittes der differentiellen Zentrifugation enthält hauptsächlich intakte Chloroplasten und kann demnach für die Chloroplastenisolierung eingesetzt werden. Sowohl für die Chloroplasten als auch für die Mitochondrien erfolgt die weitere Isolierung über Percolldichtegradienten (Abb. 3.1 Bild 2 und 3). Abschließend werden die Organellen über den Proteingehalt für die Mitochondrien und über den Chlorophyllgehalt für die Chloroplasten quantifiziert.

3.1.2 Identität und Reinheit der isolierten Organellen

Der Erfolg der Präparation der Organellen wurde zunächst mikroskopisch kontrolliert (Abb. 3.2). Die isolierten Organellen zeigen im Hellfeld einen jeweils einheitlichen Phänotyp. Nahezu alle Organellen der Chloroplastenpräparation weisen in der Fluoreszenzmikroskopie Chlorophyllfluoreszenz auf. In der Mitochondrienpräparation ist Chlorophyllfluoreszenz dagegen nur in minimaler Menge zu detektieren, wobei die Größe der Chlorophyllsignale deutlich kleiner als ein Chloroplast ist. Dies weist auf eine nur sehr geringe Kreuzkontamination mit chlorophyllhaltigen Vesikeln hin. Intakte Chloroplasten finden sich demnach nicht in den isolierten Mitochondrien.

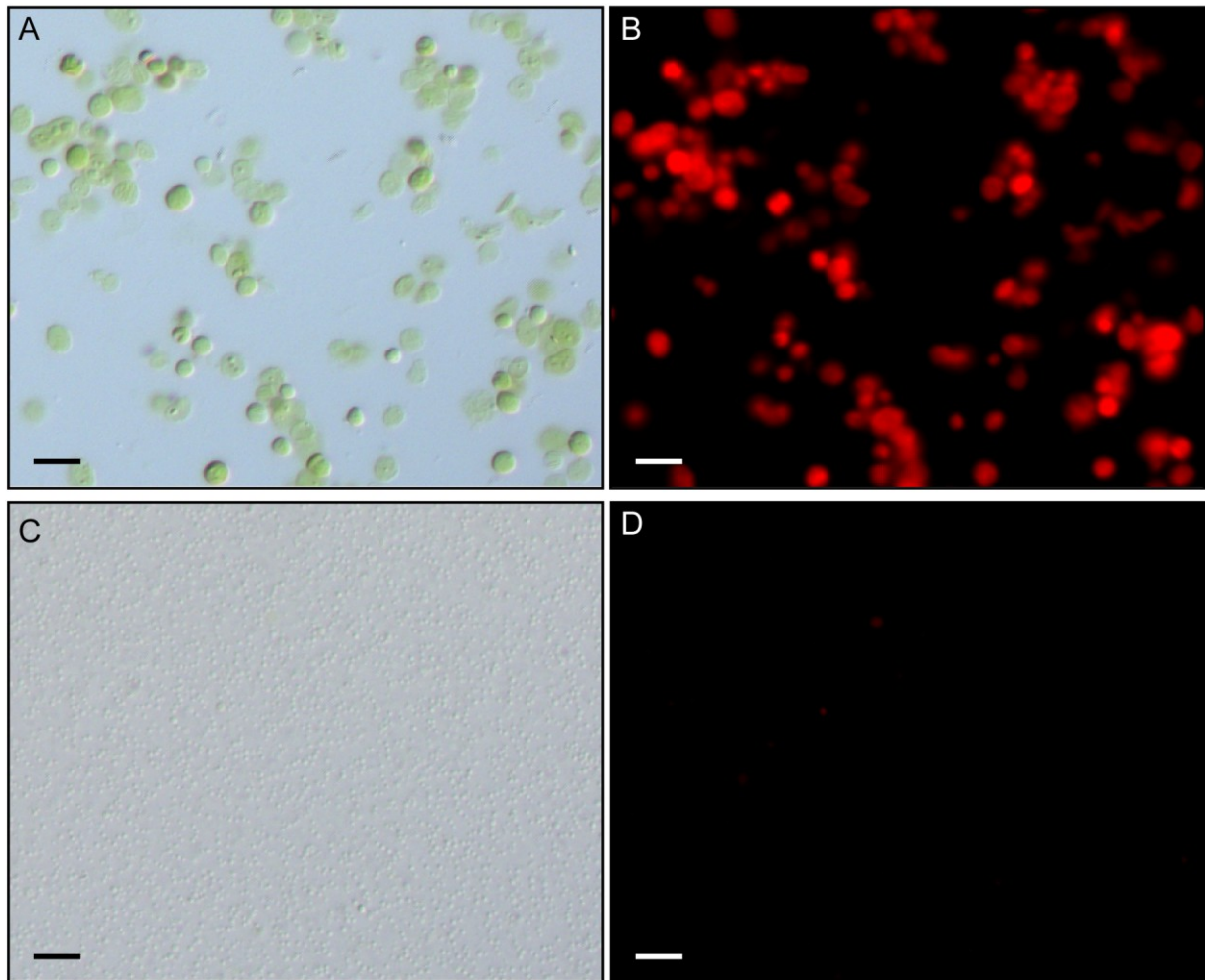


Abb. 3.2: Mikroskopie der isolierten Organellen. Hellfeld- (A, C) und Fluoreszenzmikroskopie (B, D) der isolierten Chloroplasten (oben) und Mitochondrien (unten). Die Größenbalken entsprechen 20 μm .

Im Weiteren wurden die isolierten Organellen hinsichtlich ihrer Identität und Reinheit mittels Western-Analyse überprüft (Abb. 3.3). Dazu wurden Antikörper gegen organellspezifische Proteine verwendet, um die An- bzw. Abwesenheit dieser Proteine festzustellen. Für die Mitochondrien waren das Proteine der inneren Membran (α 75kDa, α 30/31kDa und α COXII) und matrixlokalisierte Proteine (α GDC, α Idh). Die Chloroplasten wurden mit Antikörpern gegen Stroma- (α SSU, α FNR), Thylakoid- (α CFoll, α OEC23) und Hüllmembranproteine (α Toc33) verifiziert. Als Proben wurden die Organellen in dem Verhältnis eingesetzt, wie sie auch für die Importexperimente verwendet werden.

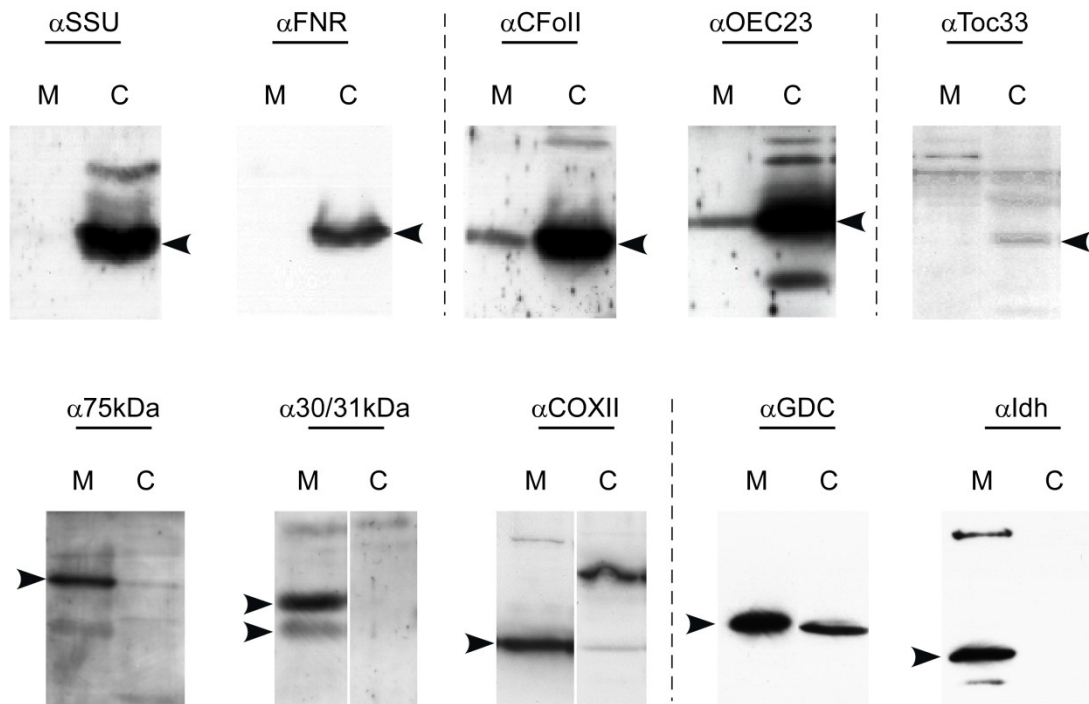


Abb. 3.3: Identität und Reinheit der präparierten Organellen aus *Pisum sativum*. Aufgetragene Mengen an Organellen entsprechen dem Verhältnis der Importsätze, d.h. Mitochondrien entsprechend 10 µg Protein und Chloroplasten entsprechend 2,5 µg Chlorophyll. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Detektion der Proteine erfolgte über ECL Western Analyse. Bei den oberen Blots wurde mit plastidären, bei den unteren mit mitochondriellen Antikörpern detektiert. Die Pfeile markieren die Signale, die den reifen Proteinen in den Organellen entsprechen.

Sowohl die Mitochondrien- als auch die Chloroplastenproteine sind eindeutig in der jeweiligen Präparation zu detektieren. Die Analysen zeigen auch mögliche Kontaminationen mit dem jeweils anderen Organell auf. Die Mitochondrienpräparation ist frei von Stroma, da weder die kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (SSU) noch die Ferredoxin-NADPH-Oxidoreduktase (FNR) detektierbar sind. Auch der Antikörper gegen die Untereinheit der Transportmaschinerie der äußeren plastidären Hüllmembran (Toc33) zeigt keine Reaktion mit den Mitochondrien. Allerdings sind geringe Mengen der Thylakoidproteine CFoll, einer Untereinheit II des Fo-Teils der ATP-Synthase, sowie OEC23, der 23 kDa Untereinheit des Wasserspaltungsapparates, zu finden. Die Mitochondrien sind also nicht mit Stroma verunreinigt und nur minimal mit Thylakoidvesikeln. Es sind somit keine intakten Chloroplasten oder Plastiden anderen Typs enthalten, die die späteren Importexperimente beeinflussen würden. Die Ergebnisse für die Chloroplastenpräparation sind relativ ähnlich. Es gibt kein Signal für die matrixlokalisierte Isocitratdehydrogenase (ldh), woraus sich schließen lässt, dass keine intakten Mitochondrien in den isolierten Chloroplasten enthalten sind. Allerdings zeigen zwei der drei Antikörper gegen Proteine der inneren mitochondrialen Membran (COXII, 75 kDa, 30/31 kDa Protein) eine Reaktion mit der Chloroplastenfraktion, wenn auch marginal. Dennoch muss auf minimale Mengen an mitochondrialen Membranvesikeln geschlossen werden.

Eine bemerkenswerte Ausnahme bildet das mitochondrielle H-Protein des Glycinderboxylase-Komplexes (GDC). Der Antikörper detektiert ein Protein in den Chloroplasten, das eine vergleichbare Größe wie das mitochondrielle Protein hat. Aufgrund der Ergebnisse der anderen mitochondriellen Antikörper ist eine Kontamination der Plastiden mit Mitochondrien als Ursache auszuschließen. Hier handelt es sich eventuell um ein Beispiel für ein duales Protein, das sowohl in den Mitochondrien als auch in den Chloroplasten lokalisiert ist.

Im Ergebnis konnte ein Protokoll für die gleichzeitige Präparation von Mitochondrien und Chloroplasten etabliert werden. Die isolierten Organellen enthalten keine Kontamination mit intakten Organellen des entsprechend anderen Typs. Sie sind nur minimal mit inneren Membranen bzw. Organelltrümmern verunreinigt. Allerdings ist das unproblematisch für Analysen, die auf intakten Organellen beruhen, wie den in dieser Arbeit durchgeführten Proteinimportstudien.

3.1.3 Importkompetenz der isolierten Organellen

Die Importkompetenz der isolierten Organellen wurde durch *in vitro* Importversuche überprüft/bestimmt (Abb. 3.4). Dabei dienen, mittels *in vitro* Transkription und Translation erzeugte, radioaktiv markierte Vorläuferproteine (*Precursor*) als Substrate.

Die Importreaktion erfolgt durch Inkubation der Substrate zusammen mit den isolierten Mitochondrien bzw. Chloroplasten im beleuchteten Wasserbad bei 25 °C für 20 bis 30 min. Im Anschluss wird jeder Ansatz in zwei Aliquote geteilt. Ein Aliquot wird ohne, das zweite mit Protease, standardmäßig Thermolysin, behandelt. Alle Proteine, die ungeschützt außerhalb der Organellen sind, werden durch die Protease abgebaut, nur importierte Proteine sind geschützt und damit proteasestabil. Abschließend werden die Proben elektrophoretisch aufgetrennt und die radioaktiv markierten Proteine sind dann mittels Autoradiographie detektierbar. Im Ergebnis erfolgt demnach ein Import der Vorläuferproteine dann, wenn Prozessierung und Proteasestabilität festzustellen sind.

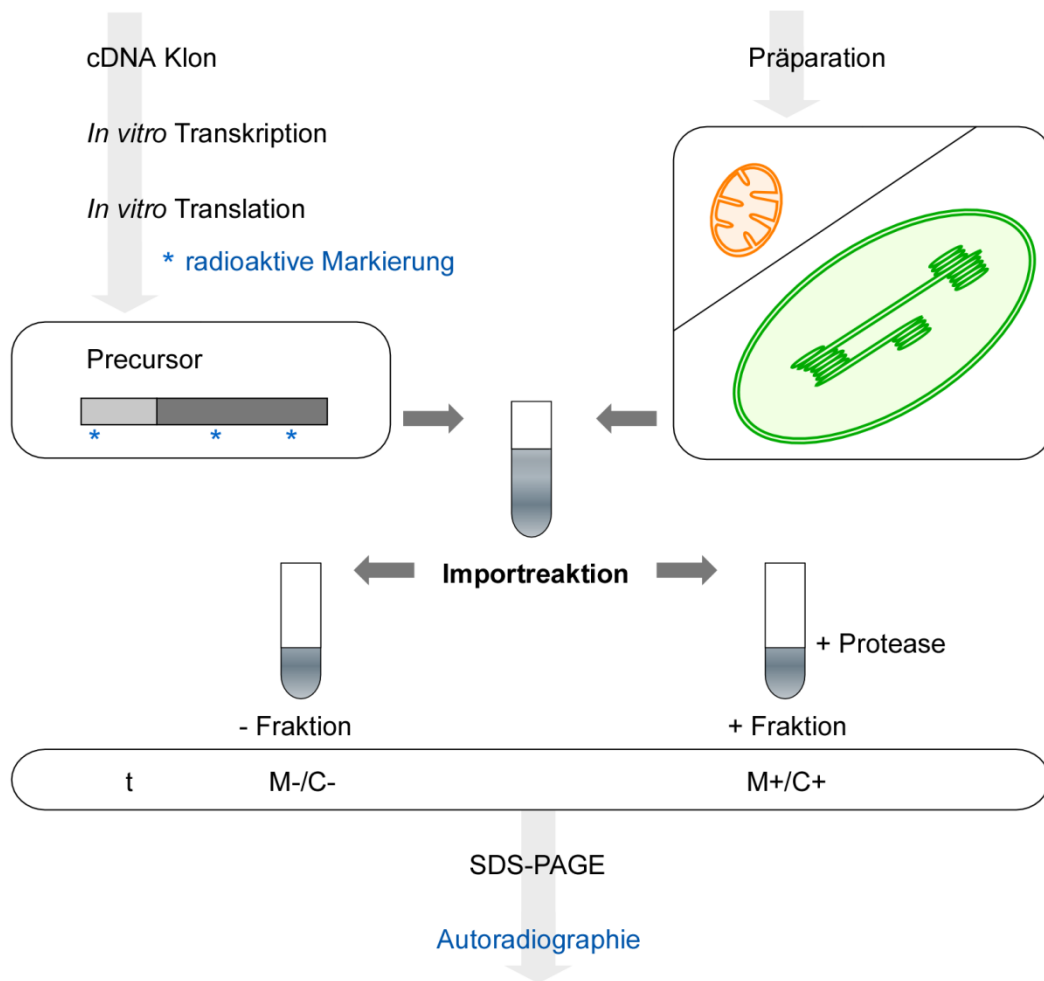


Abb. 3.4: Durchführung eines *in vitro* Imports. Radioaktiv markierte Vorläuferproteine werden mit isolierten Mitochondrien (M) oder Chloroplasten (C) inkubiert, anschließend verbleibt ein Teil des Ansatzes unbehandelt, der zweite Teil wird mit Protease behandelt. Translation (t), Minusfraktion (M-/C-) und Plusfraktion (M+/C+) werden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und über Autoradiographie erfolgt die Detektion der markierten Proteine.

Plastidäre Substrate sind die Ferredoxin-NADPH-Oxidoreduktase (FNR), die Untereinheit II des Fo-Teils der ATP-Synthase (CF_oII) und zwei Proteine des Wasserspaltungsapparates (OEC23 und OEC33). Als mitochondrielle Substrate werden das mitochondrielle Rieske-Protein und das Cytochrom c1 verwendet, die beide zentrale Komponenten des bc₁-Komplexes der Atmungskette sind. Diese Vorläuferproteine wurden für *in vitro* Importe eingesetzt (Abb. 3.5).

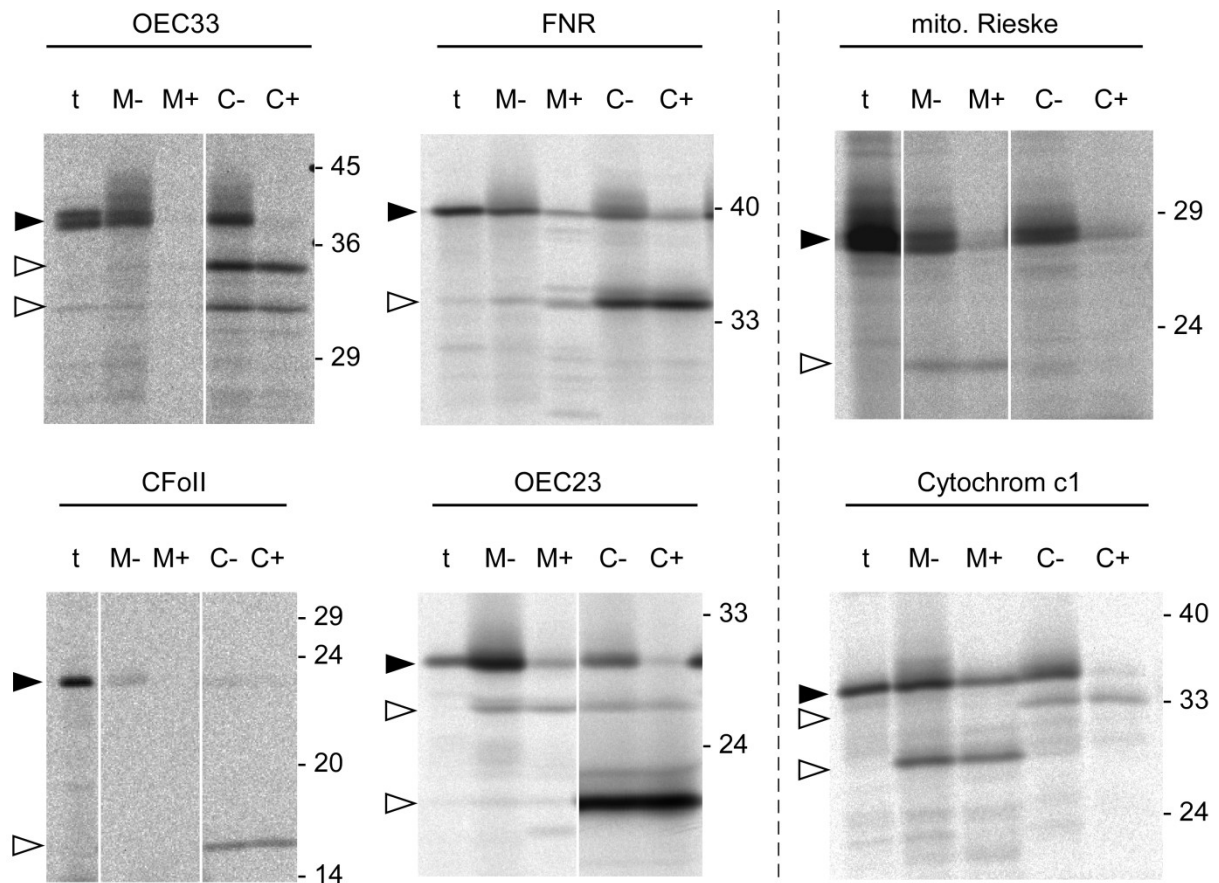


Abb. 3.5: Import von *in vitro* translatierten Vorläuferproteinen in isolierte Organellen. Links der gestrichelten Linie sind die plastidären Proteine, rechts die mitochondriellen dargestellt. Es wurden stöchiometrische Mengen an Translation (t), Mitochondrienimport (M) und Chloroplastenimport (C) aufgetragen. Die Importproben wurden jeweils zur Hälfte proteasebehandelt (+) oder scheinbehandelt (-). Die schwarzen Pfeile markieren die Vorläuferproteine, die weißen Pfeile die Prozessierungsprodukte, die nach Import ins Organell entstehen.

Sowohl OEC33 als auch CFoll zeigen keinen Import in die Mitochondrien. Lediglich oberflächenassoziierter Vorläufer ist in den proteaseunbehandelten Proben zu erkennen, der aber durch Zugabe von Thermolysin abgebaut wird. OEC33 wird in die Chloroplasten importiert, es sind zwei proteasestabile Prozessierungsprodukte detektierbar, wobei es sich zum einen um das Stromaintermediat, zum anderen um das reife Protein handelt. Das thylakoidäre OEC33 besitzt ein zusammengesetztes Transportsignal, d.h. es erfolgt zunächst die Prozessierung durch die SPP und das Stromaintermediat entsteht. Danach wird das Protein über die Thylakoidmembran transportiert und durch die TPP zum reifen Protein prozessiert. CFoll wird ebenfalls in die Chloroplasten importiert und dort zum reifen Protein umgesetzt. Auch bei der FNR erfolgen erwartungsgemäß Import und Prozessierung zum reifen Protein bei den Chloroplasten. Es findet zudem eine Assoziation an die Oberfläche der Mitochondrien statt. Neben dem Vorläuferprotein ist hier jedoch ein zusätzliches Protein in den Mitochondrien zu detektieren, das eine ähnliche Größe wie die reife FNR in den Chloroplasten aufweist. Ein mitochondrieller Import erfolgt aber nicht

nachweislich, da auf gleicher Höhe auch ein Protein in der Translation festzustellen ist. OEC23 zeigt, wie schon OEC33, einen Import in die Chloroplasten, wobei zwei Prozessierungsprodukte zu finden sind, das Stromaintermediat und das eigentliche reife Protein. Bei den Mitochondrien findet sich, im Gegensatz zu den anderen plastidären Proteinen, ein proteasestabiles Prozessierungsprodukt, das in seiner Größe dem Stromaintermediat in den Chloroplasten entspricht.

Das mitochondrielle Rieske zeigt einen Import in die Mitochondrien und die Prozessierung zum reifen Protein. Ein Import in die Chloroplasten erfolgt nicht. Auch Cytochrom c1 wird erwartungsgemäß in die Mitochondrien transportiert und dort zum reifen Protein prozessiert. Überraschenderweise findet auch ein Import mit anschließender Prozessierung in den Chloroplasten statt. Das hierbei entstehende Prozessierungsprodukt ist größer als das reife Cytochrom c1 in den Mitochondrien.

Von den insgesamt sechs eingesetzten Substraten zeigen drei Proteine einen monospezifischen Import (zwei plastidäre und ein mitochondrielles). Im Wesentlichen erfolgt kein oder nur ein marginaler Import organellfremder Proteine mit Ausnahme von OEC23 und Cytochrom c1. Das plastidäre OEC23 zeigt, neben dem erwarteten Import in die Chloroplasten, einen Import in die Mitochondrien mit anschließender Prozessierung zu einem dem Stromaintermediat entsprechenden Protein. Das eigentlich mitochondrielle Cytochrom c1 zeigt ebenfalls einen Import in beide Organellen, wobei sich die entstehenden Prozessierungsprodukte deutlich in ihrer Größe unterscheiden. Das bedeutet, dass zwei verschiedenen Proteasen aktiv sind. Der beobachtete Import in die Chloroplasten kann demzufolge nicht auf eine Kontamination der Chloroplastenpräparation mit Mitochondrien zurückzuführen sein.

Generell kann aber festgestellt werden, dass die präparierten Organellen importkompetent sind. Sie erkennen, importieren und prozessieren die angebotenen eigenen Vorläuferproteine, auch wenn teilweise eine Fremderkennung festgestellt wurde.

3.2 Gemischter Importansatz

3.2.1 Methode

Die Experimente zur Analyse der Importkompetenz der isolierten Organellen ergaben überraschende Ergebnisse für die Vorläuferproteine Cytochrom c1 und OEC23. Beide Proteine zeigen neben dem erwarteten Import in das authentische Organell auch einen Transport in das entsprechende fremde Organell. Inwiefern diese Resultate auf einen

spezifischen Import zurückzuführen sind oder ob es sich um Artefakte des verwendeten *in vitro* Systems handelt, musste überprüft werden.

In den Einzelimportexperimenten werden entweder Mitochondrien oder Chloroplasten als mögliche Ziele für die Substrate angeboten. Ein möglicher Fehltransport eines eigentlich mitochondrialen Proteins in die Chloroplasten und umgekehrt könnte man auf das Fehlen des authentischen Organells zurückführen. Um dies zu untersuchen, wurde der sogenannte gemischte Importansatz etabliert, wie er von Rudhe et al., 2002a publiziert worden ist. Dabei werden beide Organellen in einem Ansatz angeboten, um die Konkurrenzsituation zwischen Mitochondrien und Chloroplasten, wie sie auch innerhalb der Pflanzenzelle existiert, nachzustellen (Abb. 3.6).

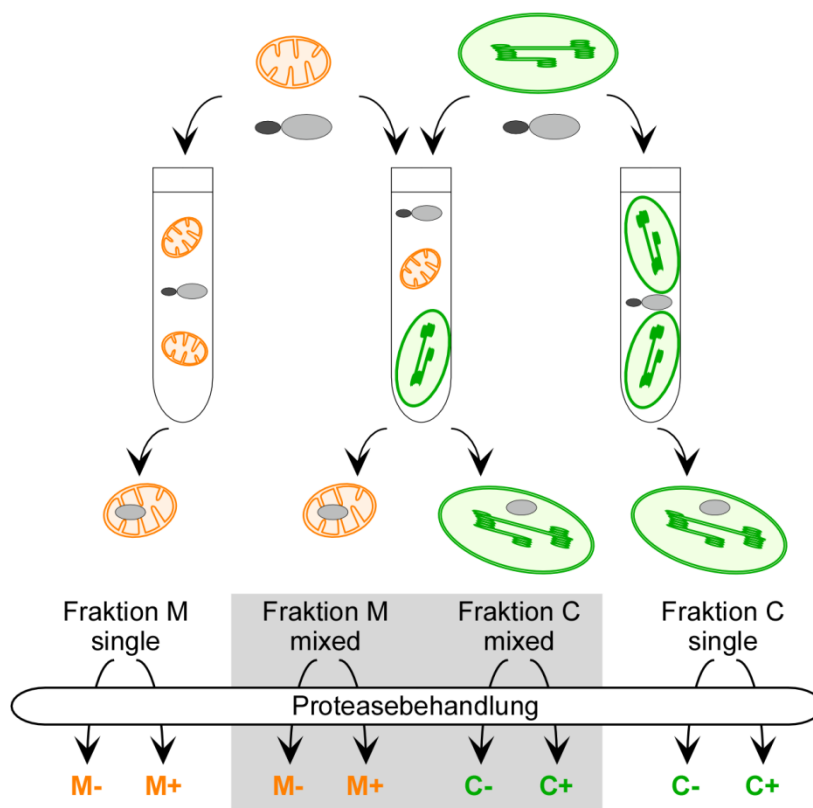


Abb. 3.6: Schematische Darstellung des gemischten *in vitro* Imports. Die Mitochondrien (M) und Chloroplasten (C) werden entweder getrennt für Einzelimporte (*single*) oder gemeinsam (*mixed*) eingesetzt. Nach dem *in vitro* Import erfolgt die Reisolierung. Proteasebehandlung, Elektrophorese und Autoradiographie erfolgen wie für den Standard-*in vitro*-Import beschrieben (Abschnitt 3.1.3).

Die Organellen werden einerseits getrennt für Einzelimporte und parallel dazu gemeinsam für den gemischten Import eingesetzt. Dadurch lassen sich im direkten Vergleich von Einzel- und gemischtem Ansatz mögliche Unterschiede feststellen. Nach der Inkubation mit dem radioaktiv markierten Vorläuferprotein müssen die Organellen wieder über ein Percollkissen voneinander getrennt werden. Inwiefern diese Trennung im Mikromaßstab

erfolgreich durchgeführt werden kann, wurde über Western Analyse mit Antikörpern gegen plastidäre Proteine überprüft (Abb. 3.7). Dazu wurden die für den *in vitro* Import eingesetzten Organellen vergleichend zu den nach dem Import reisolierten Mitochondrien und Chloroplasten eingesetzt.

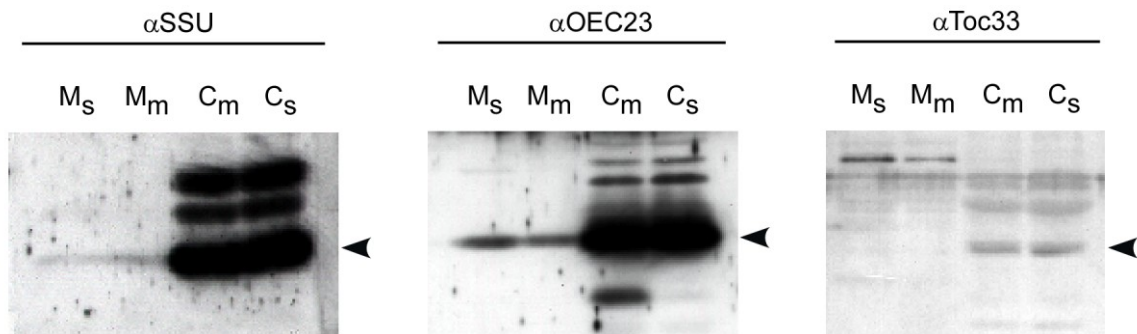


Abb. 3.7: Identität und Reinheit nach Reisolierung im Vergleich zu präparierten Organellen. Es wurden gleiche Mengen an Organellen aufgetragen, bei den Mitochondrien entsprechend 10 μ g Protein, bei den Chloroplasten entsprechend 2,5 μ g Chlorophyll. Nach der Auftrennung mittels SDS-PAA-Gelelektrophorese erfolgte die Western Analyse mit dem entsprechenden Antikörper. Die präparierten Organellen (M_s , C_s) im Vergleich zu den reisolierten (M_m , C_m) zeigen den Erfolg der Reisolierung im Mikromaßstab. Die Pfeile markieren die Signale, die den reifen Proteinen in den Organellen entsprechen.

Die Antikörper gegen SSU, OEC23 und Toc33 detektieren die jeweiligen Proteine in gleichem Maße in den Organellfraktionen. Es zeigen sich weder bei Stroma- noch bei Thylakoid- oder Hüllmembranproteinen Unterschiede zwischen den Mitochondrien- bzw. zwischen den Chloroplastenproben. Die reisolierten Organellen besitzen demnach die gleiche Reinheit wie die ursprünglichen Präparationen. Die Organellen lassen sich also erfolgreich nach der Vermischung reisolieren.

3.2.2 Organellquantität *in vitro* vs. *in vivo*

Im gemischten *in vitro* Importansatz werden die Mitochondrien entsprechend 100 μ g Protein und die Chloroplasten entsprechend 25 μ g Chlorophyll eingesetzt. Es sollte getestet werden, inwiefern die Organellkonzentration im Ansatz dem Verhältnis in der Zelle entspricht.

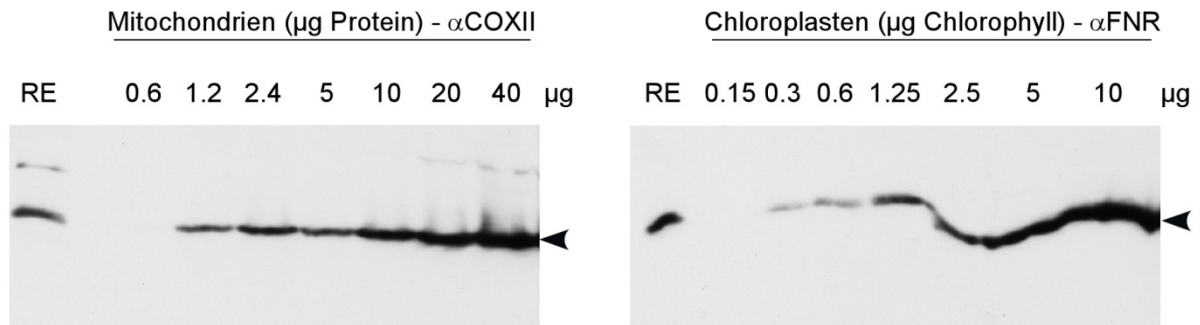


Abb. 3.8: Organellverhältnis *in vitro* vs. *in vivo*. Rohextrakt aus Erbse entsprechend 2,5 µg Chlorophyll, sowie unterschiedliche Mengen an Mitochondrien bzw. Chloroplasten entsprechend der angegebenen Mengen an Protein bzw. Chlorophyll wurden mittels SDS-PAA-Gel und anschließend Western Blot analysiert. Für die Immunodetektion wurde der COXII Antikörper für die Mitochondrien (links) bzw. der FNR Antikörper für die Chloroplasten (rechts) eingesetzt.

Dazu wurde aus Erbse Rohextrakt präpariert, der das Gesamtprotein und damit das *in vivo* Verhältnis von Mitochondrien zu Chloroplasten repräsentiert. Der Rohextrakt wurde mit den Organellpräparationen mittels Western Analyse verglichen (Abb. 3.8). Der FNR Antikörper zeigt die relative Menge an Chloroplasten. Über den COXII Antikörper sollte entsprechend die relative Menge an Mitochondrien abgeschätzt werden. Durch die Analyse mittels ECL-Western, wie sie hier durchgeführt wurde, kann zwar keine exakte Quantifizierung erfolgen, aber eine Abschätzung zum Mengenverhältnis ist möglich. Der Rohextrakt wurde entsprechend 2,5 µg Chlorophyll aufgetragen. Die Signalstärke für COXII ist mit der Mitochondrienprobe vergleichbar, die 5 µg Protein entspricht. Bezogen auf das Organellverhältnis im Importansatz würde das bedeuten, dass der *in vitro* Ansatz mit der *in vivo* Situation vergleichbar ist. Sicher ist das Verhältnis nicht identisch, aber die Dimension ist ähnlich.

3.2.3 Gemischter Import und Einzelimport im Vergleich

Die Spezifität des Organelltransportes von Cytochrom c1 und OEC23 wurde mittels gemischtem Importansatz überprüft (Abb. 3.9).

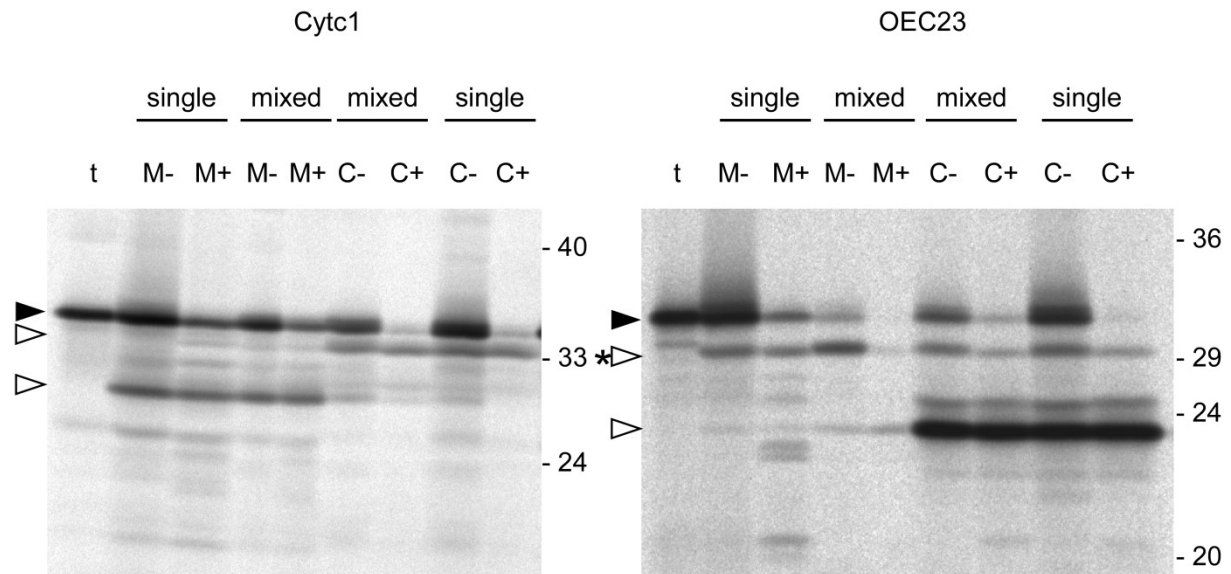


Abb. 3.9: Gemischter Import vs. Einzelimport. Die Organellen wurden entweder separat (*single*) oder gemeinsam (*mixed*) im *in vitro* Import angeboten. Das Substrat stammt aus derselben *in vitro* Translation (t). Die Organellen wurden nach dem Import ohne (M-, C-) bzw. mit (M+, C+) Thermolysin behandelt und reisoliert. Die schwarzen Pfeile markieren die Vorläuferproteine, die weißen Pfeile die Prozessierungsprodukte, die nach Import ins Organell entstehen. Das Stromaintermediat des OEC23 ist zusätzlich durch einen Stern gekennzeichnet.

OEC23 wird sowohl im Einzel- als auch im gemischtem Importansatz in die Chloroplasten transportiert, dort bildet sich zunächst das Stromaintermediat, das dann zum reifen Protein umgesetzt wird. Der Vergleich zeigt, dass im Einzelansatz mehr Vorläuferprotein an der Oberfläche der Organellen gebunden ist. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass in beiden Ansätzen die gleiche Menge Translation eingesetzt wurde und im gemischtem Ansatz eine Assoziation mit dem zweiten Organell, den Mitochondrien, erfolgen kann, den Chloroplasten also relativ weniger Substrat zur Verfügung stand. Bei den Mitochondrien zeigt sich ein anderes Bild. Wie schon im Einzelansatz wird OEC23 an die Organellen gebunden, es ist ein Prozessierungsprodukt auf Höhe des Stromaintermediats zu finden. Dieses Produkt zeigt sich aber im Gegensatz zum Einzelansatz nicht proteasestabil. Es ist demnach nicht eindeutig von einem Transport von OEC23 in die Mitochondrien auszugehen.

Bei Cytochrom c1 lässt der gemischte Ansatz eine konkrete Aussage zu. Wie schon im Einzelimport beobachtet, wird Cytochrom c1 auch hier in beide Organellen transportiert. Cytochrom c1 wird zudem mit gleicher Effizienz in die Organellen importiert, unabhängig davon, ob die Organellen separat oder gemeinsam angeboten wurden. Auch die Prozessierung des Proteins innerhalb der Organellen bestätigt das Resultat aus den Einzelimporten. Es erfolgen wieder Prozessierungen an verschiedenen Positionen des Proteins. Das Prozessierungsprodukt in den Chloroplasten ist größer als das reife Protein in

den Mitochondrien. Der Import von Cytochrom c1 in die Chloroplasten ist demnach kein Artefakt, das der Abwesenheit des eigentlich „korrekten“ Organells geschuldet ist.

Im Gegensatz zu OEC23 konnte der duale Import für Cytochrom c1 auch im gemischten Ansatz verifiziert werden. Der Fokus dieser Arbeit soll im Weiteren auf Cytochrom c1 und dem Transportverhalten dieses Proteins liegen.

3.3 Vorhersage der subzellulären Lokalisierung von Cytochrom c1

Da Cytochrom c1 ein kerncodiertes Protein ist und somit ein entsprechendes N-terminales Transportsignal trägt, sollte nun über verschiedene Vorhersageprogramme die subzelluläre Lokalisierung überprüft werden. Zur Vorhersage wurden die Programme TargetP, Predotar, MitoProt II, ChloroP und PSORT verwendet. Während TargetP, Predotar und PSORT Vorhersagen über die Lokalisierung in Chloroplasten und Mitochondrien bzw. weiteren Kompartimenten der Zelle geben, gibt Mitoprot II nur eine Aussage über eine mögliche Mitochondrienlokalisierung und ChloroP ist entsprechend auf Chloroplasten beschränkt. Die Ergebnisse einer solchen Analyse sind in den meisten Fällen nur als Indizien zu verstehen. Definitive Aussagen oder Beweise können aus solchen Daten nicht abgeleitet werden. Aus diesem Grund sollen die Ergebnisse im Folgenden mit entsprechender Vorsicht interpretiert werden.

Vorhersage-Programm	Ergebnis und Zuverlässigkeit	
TargetP	M (0,531) C (0,099)	geringe Zuverlässigkeit
Predotar	M (0,48) C (0,00)	eventuell
MitoProt II	M (0,9288)	wahrscheinlich
ChloroP	C (0,462)	geringer Wert
PSORT	Plasmamembran (0,790) Peroxisomen (0,508)	

Abb. 3.10: Verschiedene Vorhersageprogramme zur subzellulären Lokalisierung von Cytochrom c1 aus *Solanum tuberosum*. Angegeben sind die Wahrscheinlichkeitswerte für eine Lokalisierung in den Mitochondrien (M) oder Chloroplasten (C) bzw. andernorts. Orange unterlegt ist eine mögliche mitochondrielle Lokalisierung. Grau unterlegt sind Vorhersagen ohne mitochondrielle oder plastidäre Wahrscheinlichkeit. Die Zuverlässigkeit der Vorhersage, auf Basis der jeweils programmeigenen Einschätzung, ist vermerkt.

Betrachtet man die Vorhersagen (Abb. 3.10), so zeigt Cytochrom c1 die erwartete Tendenz zu einer mitochondrialen Lokalisierung. Allerdings sind die entsprechenden Werte, gerade bei TargetP, nicht sehr sicher. Auch gibt ChloroP eine geringe Wahrscheinlichkeit für eine plastidäre Lokalisierung an. Im Gegensatz dazu weist das Ergebnis von PSORT weder auf eine mitochondrielle noch eine plastidäre Lokalisierung hin. Im Ergebnis ist beim Vergleich der verwendeten Vorhersageprogramme ein Trend für eine subzelluläre Lokalisierung von Cytochrom c1 in den Mitochondrien festzustellen. Das Transportsignal ist aber offenbar nicht absolut eindeutig einem bestimmten Kompartiment zuzuordnen.

3.4 Kontrollen für echten Organelltransport

3.4.1 Ionophore/Entkoppler

In diesem Abschnitt soll untersucht werden, ob tatsächlich ein aktiver Transport von Cytochrom c1 in beide Organellen vorliegt. Dazu wurden Unterschiede der Transportmechanismen der Mitochondrien und Chloroplasten genutzt. Mitochondrien sind für den Import auf das Membranpotential der inneren Membran angewiesen. Chloroplasten benötigen dagegen Energie in Form von internem ATP, dessen Bildung vom Protonengradienten über der Thylakoidmembran abhängt.

Zur weiteren Analyse des Organelltransportes von Cytochrom c1 wurden daher Importexperimente mit beiden Organellen in Anwesenheit von Ionophoren durchgeführt. Ionophore beeinflussen den Transport von Vorläuferproteinen über die Organellmembranen, indem sie die *Proton motive force* (pmf) beeinträchtigen, d.h. sie beeinträchtigen die für den Import notwendige Energiequelle. Der elektrochemische Gradient setzt sich aus zwei Komponenten zusammen: dem Protonengradient (ΔpH) und dem Membranpotential ($\Delta\Psi$). Beide zusammen werden als pmf bezeichnet. Zwei unterschiedliche Ionophore kamen zum Einsatz (Abb. 3.11).

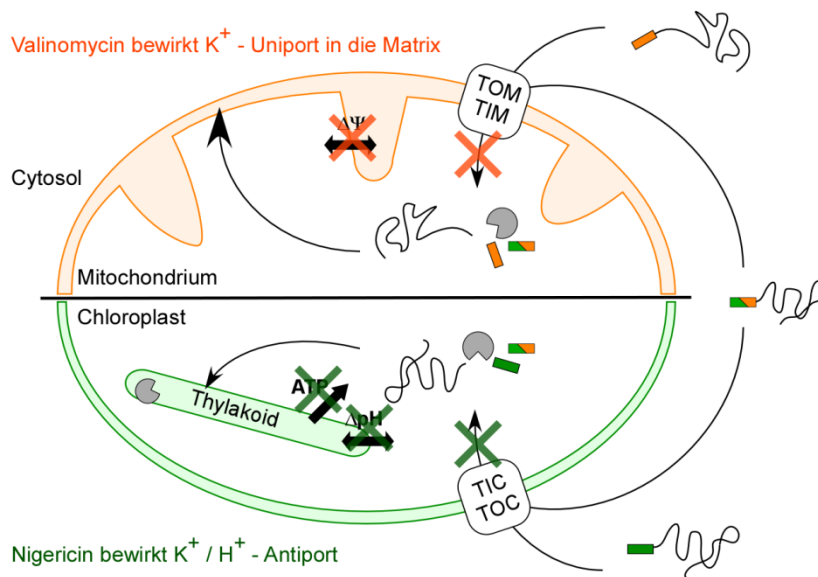


Abb. 3.11: Der Einfluss von Ionophoren auf den Proteintransport. Valinomycin bewirkt eine Störung des mitochondrialen Imports. Nigericin bedingt die Blockierung des chloroplastidären Imports.

Valinomycin depolarisiert durch einen K^+ -Uniport das elektrische Potential über der Membran, welches essentiell für den effektiven Proteintransport durch die innere Mitochondrienmembran ist (Schleyer et al., 1982). Auf den plastidären Proteinimport sollte Valinomycin dagegen kaum Einfluss haben, da dieser ATP als Energiequelle benötigt. Nigericin hingegen bewirkt durch einen K^+/H^+ -Antiport die Aufhebung des Protonengradienten. Dies bedeutet im Fall der Chloroplasten, dass das für den Proteintransport notwendige interne ATP nicht mehr gebildet werden kann (Mould and Robinson, 1991; Chow et al., 1997).

Demnach sollte der mitochondrielle Import durch Valinomycin, der plastidäre Import durch Nigericin gehemmt werden und dadurch eine Unterscheidung des Mitochondrien- vom Plastidenimport möglich sein. Der Effekt von Valinomycin und Nigericin auf den *in vitro* Import von Cytochrom c1 wurde untersucht, indem die Organellen vor Zugabe der *in vitro* Translation zum Importansatz mit dem entsprechenden Ionophor vorbehandelt wurden. OEC23 wurde als Kontrolle mitgeführt (Abb. 3.12).

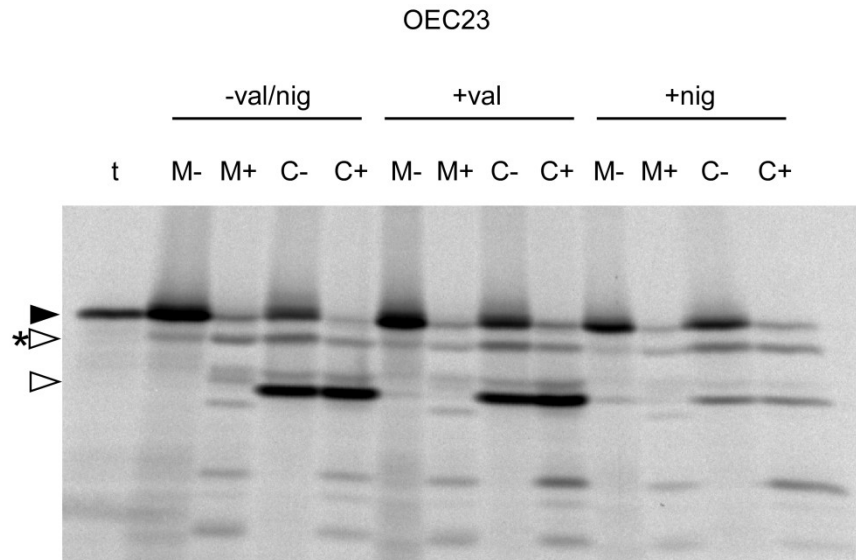


Abb. 3.12: Der Einfluss von Ionophoren auf den *in vitro* Import von OEC23. Die Organellen wurden mit Valinomycin (+val) bzw. Nigericin (+nig) vorbehandelt. Als Kontrollen dienten unbehandelte (-val, -nig) Organellen. Als Substrat wurde OEC23 verwendet. Der schwarze Pfeil markiert das Vorläuferprotein, die weißen Pfeile die Prozessierungsprodukte, die nach Import ins Organell entstehen. Das Stromaintermediat des OEC23 ist zusätzlich durch einen Stern gekennzeichnet. Die Auftragung und Beschriftung entsprechen darüber hinaus Abb. 3.5.

OEC23 wird in Abwesenheit von Inhibitoren effizient in die Chloroplasten transportiert und zum reifen Protein umgesetzt. Die Zugabe von Valinomycin hat keinen nennenswerten Einfluss auf den plastidären Import dieses Proteins. Die Anwesenheit von Nigericin hingegen führt zu einer deutlichen Abnahme der Menge an reifem OEC23. Dies zeigt die Sensitivität des plastidären Imports auf Nigericin, nicht aber auf Valinomycin.

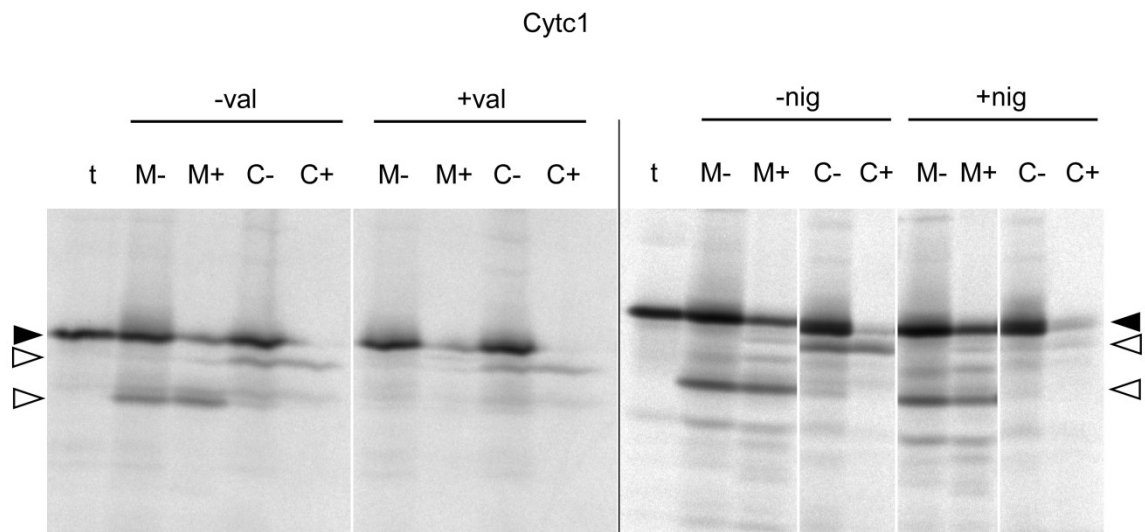


Abb. 3.13: Der Einfluss von Ionophoren auf den *in vitro* Import von Cytochrom c1. Die Organellen wurden mit Valinomycin (+val) bzw. Nigericin (+nig) vorbehandelt. Als Kontrollen dienten unbehandelte (-val, -nig) Organellen. Als Substrat wurde Cytochrom c1 verwendet. Die Auftragung und Beschriftung entsprechen darüber hinaus Abb. 3.5.

Cytochrom c1 wird ohne Zugabe von Ionophoren in beide Organellen transportiert. Der mitochondrielle Import von Cytochrom c1 wird nahezu vollständig aufgehoben, wenn die Importexperimente in Gegenwart von Valinomycin durchgeführt werden (Abb. 3.13 links). Import und Prozessierung von Cytochrom c1 ist also im Fall der Mitochondrien $\Delta\Psi$ -abhängig. Die Chloroplasten zeigen dagegen keinen nennenswerten Valinomycineffekt. Werden die Importexperimente in Gegenwart von Nigericin durchgeführt (Abb. 3.13 rechts), zeigt sich die typische Sensitivität der Chloroplasten gegenüber Nigericin. Cytochrom c1 wird dann kaum noch in die Chloroplasten transportiert. Der Import in die Mitochondrien wird im Gegensatz dazu nicht beeinflusst.

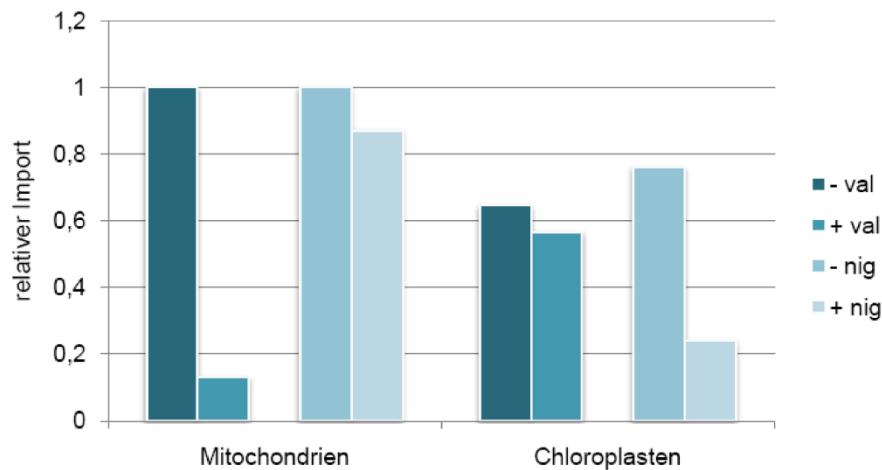


Abb. 3.14: Quantifizierung der Ionophorenansätze. Einfluss von Valinomycin und Nigericin auf den relativen Import von Cytochrom c1 in die Organellen. Die Quantität der Prozessierungsprodukte in den Organellen (M- und C-) wurde bestimmt. Der Import in die Mitochondrien ohne Ionophorenbehandlung wurde jeweils 1 gesetzt und die anderen Importwerte relativ dazu berechnet.

Der unterschiedliche Effekt der beiden Ionophoren auf den *in vitro* Import von Cytochrom c1 wird durch die Quantifizierung der Ionophorenansätze zweifelsfrei gezeigt (Abb. 3.14). Der mitochondrielle Import wird durch Valinomycin, der chloroplastidäre Import durch Nigericin blockiert. Der Import in das jeweils andere Organell wird hingegen kaum verringert. Die Ergebnisse zeigen, dass Cytochrom c1 aktiv sowohl in die Mitochondrien als auch in die Chloroplasten transportiert wird.

3.4.2 Retikulocytenlysat vs. Weizenkeimextrakt

Die *in vitro* Translationen für die Importexperimente wurden standardmäßig in Retikulocytenlysat durchgeführt. Ein weiteres gebräuchliches Translationssystem ist Weizenkeimextrakt. Der Hauptunterschied der beiden Systeme liegt klar in ihrer biologischen Herkunft: ein pflanzliches System einerseits und ein tierisches System andererseits. Unterschiede der cytosolischen Zusammensetzung sind einzubeziehen. So enthält Weizenkeimextrakt Plastiden und Mitochondrien, während das bei Retikulocytenlysat nicht der Fall ist. Die Zusammensetzung des Lysats könnte das Organelltargeting von Vorläuferproteinen beeinflussen (Dessi et al., 2003; Schleiff et al., 2002; Lain et al., 1994).

Es sollte also überprüft werden, ob das verwendete System einen Einfluss auf die Transporteigenschaften des Translationsproduktes aufweist. Dazu wurden *in vitro* Importexperimente mit Vorläuferprotein durchgeführt, das entweder über Retikulocytenlysat oder Weizenkeimextrakt translatiert wurde (Abb. 3.15).

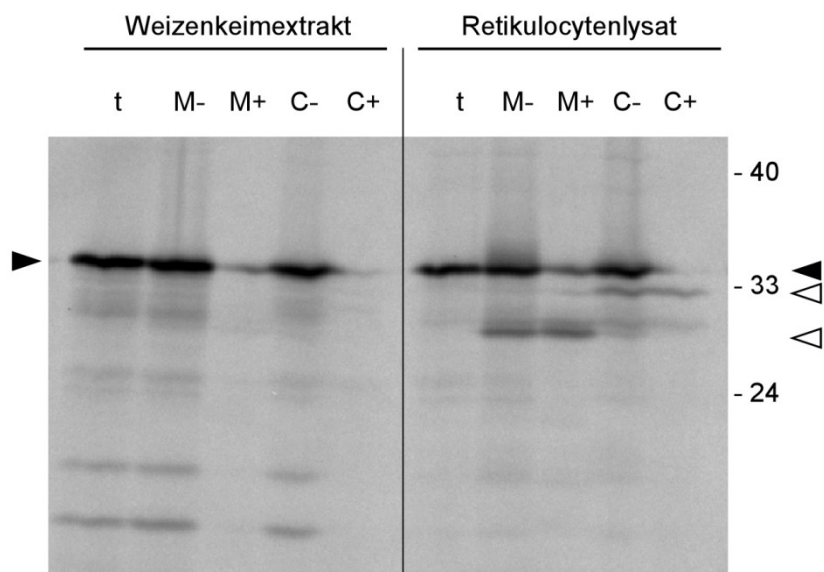


Abb. 3.15: Verschiedene Translationssysteme. Gegenübergestellt sind *in vitro* Importe mit *in vitro* Translationen aus Weizenkeimextrakt bzw. Retikulocytenlysat. Die schwarzen Pfeile markieren die Vorläuferproteine, die weißen Pfeile die Prozessierungsprodukte, die nach Import ins Organell entstehen. Die Auftragung und Beschriftung entsprechen darüber hinaus Abb. 3.5.

Das Retikulocytenlysat ergab importkompetentes Translationsprodukt. Cytochrom c1 zeigt wieder Import und Prozessierung sowohl im Fall der Mitochondrien als auch der Chloroplasten. Das bedeutet, dass die isolierten Organellen in der Lage waren, das Protein aufzunehmen. Mit den Organellen derselben Präparation zeigte sich im Fall des mittels Weizenkeimextrakt translatierten Cytochrom c1 ein völlig anderes Bild. Weder die

Mitochondrien noch die Chloroplasten waren imstande, dieses Translationsprodukt zu importieren. Weizenkeimextrakt enthält also Komponenten, die den Transport von Cytochrom c1 in das eigentlich „falsche“ Organell verhindern, aber ebenso kann kein Import in das authentische Organell stattfinden. Dieses Translationssystem führt also zu importinkompetentem Cytochrom c1. Ein Einfluss des Translationssystems z.B. auf den Faltungszustand des Vorläuferproteins oder die Bindung von Chaperonen kann vermutet werden. Dadurch wäre eine Verhinderung der Bindung an Rezeptoren der Organellen denkbar und damit die Importinkompetenz zu erklären.

3.5 Suborganelläre Lokalisierung

Ein dualer Transport von Cytochrom c1 in Mitochondrien und Chloroplasten wurde mittels *in vitro* Importexperimenten gezeigt. Im Anschluss daran war es von Interesse, die Lokalisierung innerhalb der Organellen zu bestimmen, wodurch sich auch Hinweise auf eine mögliche Funktion dieses mitochondriellen Proteins in den Chloroplasten ergeben können.

3.5.1 Methodenetablierung

Während die Fraktionierung von Chloroplasten eine bereits gut etablierte Methode in der Arbeitsgruppe ist, musste für die Fraktionierung von Mitochondrien zunächst ein geeignetes Protokoll gefunden werden. Prinzipiell erfolgt der Aufschluss von Mitochondrien entweder durch Gefrier-Tau-Zyklen oder durch Ultraschall-Behandlung. Vorversuche (nicht gezeigt) zum Vergleich beider Methoden ergaben mit der Gefrier-Tau-Methode bessere Ergebnisse, weshalb diese Methode für den Aufschluss der Mitochondrien gewählt wurde.

Dazu werden die isolierten Mitochondrien sedimentiert, in geeigneter Pufferlösung aufgenommen und mehreren Gefrier-Tau-Zyklen unterzogen. Anschließend erfolgt die Trennung von löslicher und unlöslicher Fraktion mittels Zentrifugation (Abb. 3.16 links). Die unlösliche Fraktion sollte die äußeren und inneren Membranen der Mitochondrien enthalten. Die lösliche Fraktion sollte die Matrix und den Intermembranraum repräsentieren. Der überwiegende Teil der mitochondriellen Proteine ist zum einen in der inneren Membran, z.B. als Teil der Atmungskette, und zum anderen in der Matrix lokalisiert.

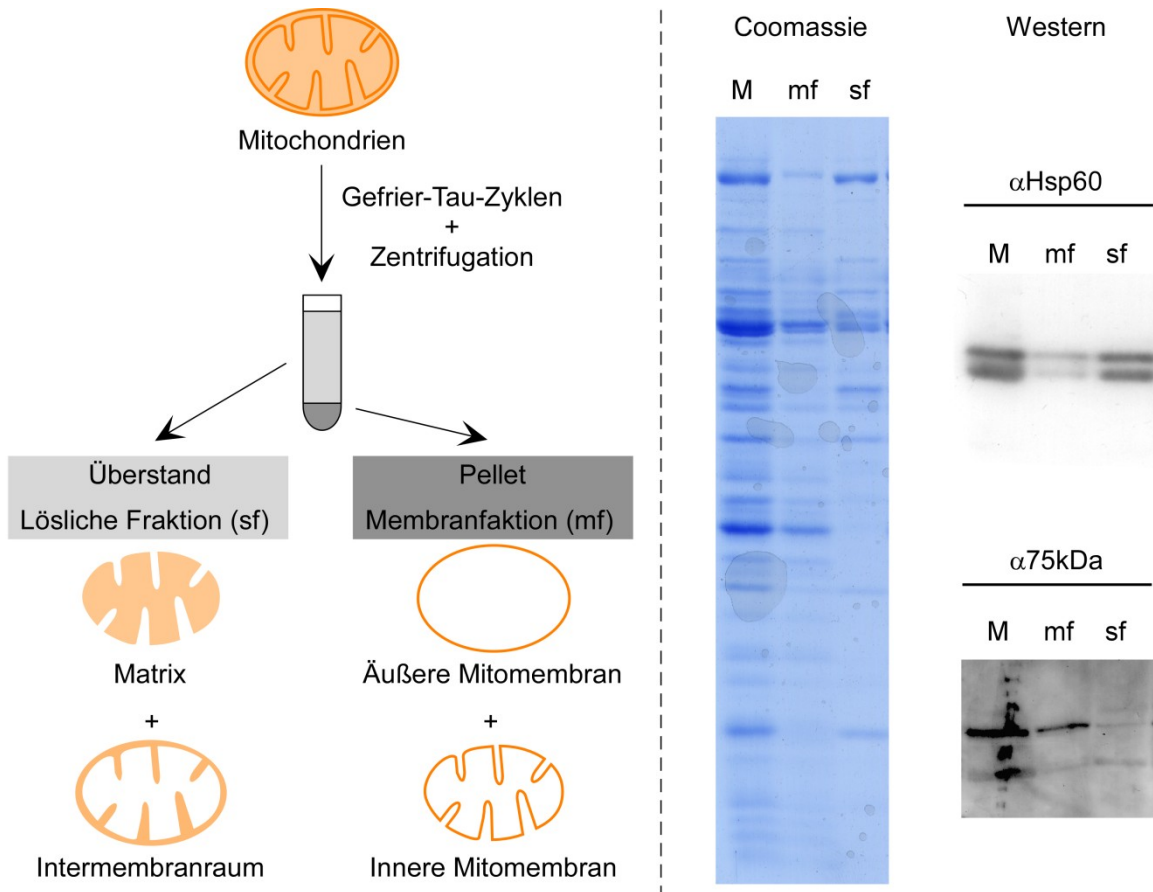


Abb. 3.16: Fraktionierung von Mitochondrien über Gefrier-Tau-Zyklen. Links ist das Prinzip der Methode schematisch dargestellt. Rechts sind die SDS-PAGE und die dazugehörigen Western Ergebnisse abgebildet. Aufgetragen sind stöchiometrische Mengen der Mitochondrienfraktionen (M – komplette Mitochondrien, mf – Membranfraktion, sf – Lösliche Fraktion).

Um einen ersten Eindruck der Fraktionierung der Organellen zu erhalten, wurden die isolierten Proben unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt (Abb. 3.16 rechts - Coomassie). Im SDS-Gel ist zu erkennen, dass die lösliche und Membranfraktion der Mitochondrien gut separiert und eindeutig voneinander unterschieden werden können. Die SDS-Page der verschiedenen mitochondriellen Fraktionen zeigt klare Unterschiede im Bandenmuster von Membran- und löslicher Fraktion. Einzelne Banden in der Spur der Gesamtmitochondrien lassen sich entweder der löslichen oder der Membranfraktion zuordnen. Die beiden Fraktionen enthalten also verschiedene Proteine unterschiedlicher Menge.

Diese erste gelelektrophoretische Untersuchung zur erfolgreichen Trennung beider Mitochondrienfraktionen wurde mit immunologischen Methoden ergänzt. Mittels Western Analysen sollte eine Abschätzung der Reinheit bzw. Qualität der Fraktionen erfolgen (Abb. 3.16 rechts - Western). Der eingesetzte Antikörper gegen Hsp60 gibt nur in den Fraktionen ein Signal, die Matrix enthalten. Hsp60 wird in den kompletten Mitochondrien und der löslichen Fraktion am stärksten nachgewiesen. Nur geringe Mengen finden sich dagegen in

der Membranfraktion. Der Antikörper gegen das 75 kDa Protein von Komplex I der inneren Membran detektiert Protein in den Mitochondrien und in der Membranfraktion. In der löslichen Fraktion ist nur ein minimales Signal zu sehen. Es ist demnach eine klare Anreicherung in den entsprechenden Fraktionen festzustellen.

Die Fraktionierung in lösliche und Membranfraktion der Mitochondrien ist also prinzipiell mit der hier eingesetzten Methode möglich. Die Trennung ist zwar nicht vollständig, für eine erste Analyse der Lokalisierung eines Proteins innerhalb des Organells nach einem erfolgten *in vitro* Import aber geeignet.

3.5.2 Import von Cytochrom c1 und anschließende Fraktionierung der Mitochondrien bzw. Chloroplasten

Die suborganelläre Lokalisierung von Cytochrom c1 nach erfolgtem *in vitro* Import sollte bestimmt werden. Die Organellen wurden dafür nach dem *in vitro* Import und der Thermolysinbehandlung fraktioniert. Die Mitochondrien wurden nach dem zuvor dargestellten Protokoll (Abschnitt 3.5.1) via Gefrier-Tau-Zyklen in lösliche und Membranfraktion getrennt. Der Aufschluss der Chloroplasten wird via Osmolyse in hypotonischem Puffer erreicht. Die Trennung in Stromafraktion und Thylakoide erfolgt durch anschließende Zentrifugation.

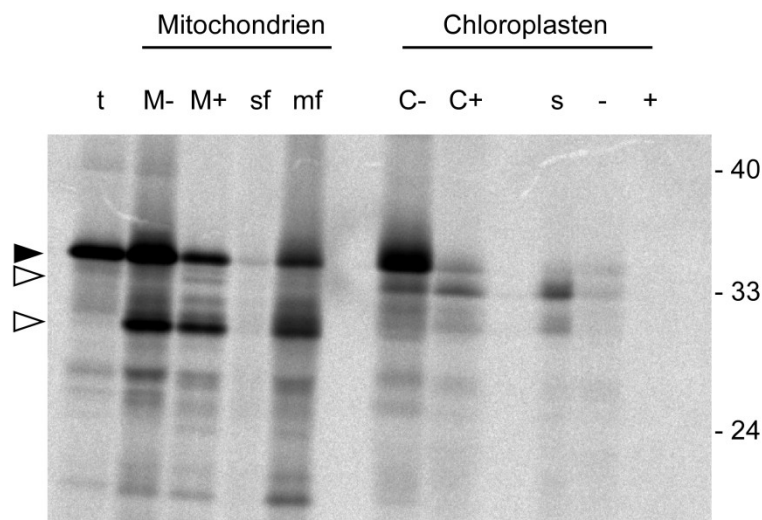


Abb. 3.17: Fraktionierung der Organellen nach Import. Die Importe wurden wie beschrieben durchgeführt. Anschließend erfolgte die Trennung der Mitochondrien in Membran- (mf) und lösliche (sf) Fraktion. Die Chloroplasten wurden in Stromafraktion (s) und Thylakoide getrennt. Die Thylakoidfraktion wurde geteilt und ohne (-) bzw. mit Thermolysin (+) behandelt.

Cytochrom c1 ist als Bestandteil des bc1-Komplexes der Atmungskette in der inneren Membran der Mitochondrien verankert. Nach dem *in vitro* Import und der anschließenden Fraktionierung der Organellen kann die suborganelläre Lokalisierung festgestellt werden (Abb. 3.17). Erwartungsgemäß akkumuliert das reife Cytochrom c1 in der Membranfraktion der Mitochondrien. Auch das trotz Thermolysinbehandlung verbleibende Vorläuferprotein findet sich in dieser Fraktion. Dies ist als Indiz zu sehen, dass dieser Vorläufer mit der Transportmaschinerie der Mitochondrien assoziiert und damit geschützt vorliegt. Das Prozessierungsprodukt von Cytochrom c1 in den Chloroplasten akkumuliert hingegen in der Stromafraktion, die der löslichen Fraktion entspricht. Es ist demnach, trotz der hydrophoben Domäne des Cytochrom c1 (vgl. Einleitung, Abschnitt 1.5, S. 24), keine Membraninsertion innerhalb der Chloroplasten festzustellen.

3.5.3 Stromaprozessierung

Kernkodierte mitochondrielle und plastidäre Proteine werden nach dem Import in das entsprechende Organell durch spezifische, metallabhängige Enzyme proteolytisch prozessiert: die Matrixprozessierungspeptidase (MPP) und die Stromaprozessierungspeptidase (SPP). *In vitro* Prozessierungsstudien mit gereinigten Stromapräparationen haben gezeigt (Bascham et al., 1994), dass die SPP in der Lage ist, auch mitochondrielle Proteine, wie Cyclophilin, die β -Untereinheit des F1-ATPase-Komplexes, das Rieske-Protein, die α -Untereinheit der MPP und Cytochrom b2, zu spalten. Diese Prozessierung erfolgt z.T. sogar effizienter als bei authentischen plastidären Substraten. Die Spaltung findet aber nicht an der authentischen MPP-Spaltstelle statt, sondern ist weiter N-terminal verlagert.

Da für Cytochrom c1 ein Import ins Stroma der Chloroplasten festzustellen ist, stellte sich die Frage nach einer Prozessierung durch die SPP. Dafür wurde die *in vitro* Translation direkt mit Stromaextrakt inkubiert. Das OEC23-Protein des Wasserspaltungsapparates diente dabei als Kontrolle für die SPP-Aktivität, da für dieses Protein bekannt war, dass die SPP-Prozessierung zum Stromaintermediat *in vitro* durch Zugabe von isoliertem Stroma erreicht werden kann (Abb. 3.18).

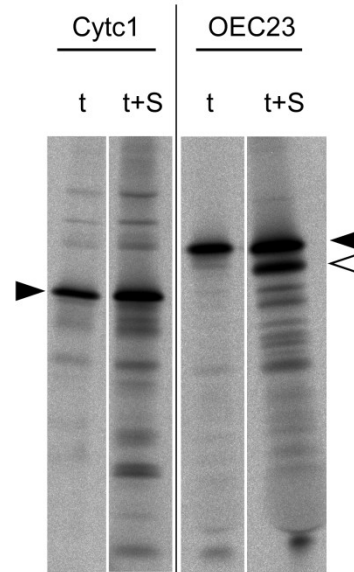


Abb. 3.18: Stromaprozessierung. Die *in vitro* Translationen (t) von Cytc1 und OEC23 wurden mit isoliertem Stroma inkubiert (t+S), um eine mögliche Prozessierung durch die SPP festzustellen. Die schwarzen Pfeile markieren die Vorläuferproteine, der weiße Pfeil das Prozessierungsprodukt, das dem Stromaintermediat des OEC23 entspricht.

Es zeigte sich, dass der eingesetzte Stromextrakt das OEC23 zum Stromaintermediat prozessieren kann, die SPP also aktiv war. Beim Cytochrom c1 konnte jedoch keine derartige Prozessierung beobachtet werden. Zwar entstehen zusätzliche Proteinbanden, diese sind aber deutlich kleiner als das beim Import in die Chloroplasten entstehende Produkt und somit als unspezifische Abbauprodukte zu betrachten. Es lässt sich nur spekulieren, ob der Faltungszustand des Translationsproduktes einen Effekt hat oder ob die Prozessierung vor Erreichen des Stromas stattfindet.

3.5.4 Assemblierungsverhalten

Die Fraktionierung und die entsprechende Lokalisierung von Cytochrom c1 in den Organellen wurde bereits gezeigt (Abschnitt 3.5.2). Es sollte nun untersucht werden, ob mit dem importierten Protein auch Komplexe in den Organellen gebildet werden können. Für diese Untersuchungen wurden die Proben nach Import und Fraktionierung in einer nativen Gelelektrophorese aufgetrennt. Zum besseren Vergleich wurden sowohl die löslichen als auch die Membranproben mittels Blue Native-PAGE (BN) analysiert. Dieses Gelsystem wurde für die native Elektrophorese membranständiger Proteinkomplexe entwickelt. Das BN-System unterscheidet sich vom CN-System (Colorless Native), das üblicherweise für lösliche Proteine eingesetzt wird, im Wesentlichen nur in der Zugabe eines Detergenz und der Verwendung des Farbstoffs Coomassie G250 im Kathodenpuffer. Darüber hinaus ist die

Gel- und Pufferzusammensetzung von CN- und BN-PAGE identisch. Eine gute Auftrennung der löslichen Proben sollte daher ebenfalls möglich sein. Dem BN-Gel wurde kein Detergenz zugesetzt, da die entsprechenden Membranproben mit unterschiedlichen Detergenzien, Dodecylmaltosid für die Mitochondrien bzw. Digitonin für die Chloroplasten, solubilisiert werden. Nach einem Import sollte es möglich sein, sowohl Mitochondrien- als auch Plastidenkomplexe miteinander vergleichen zu können.

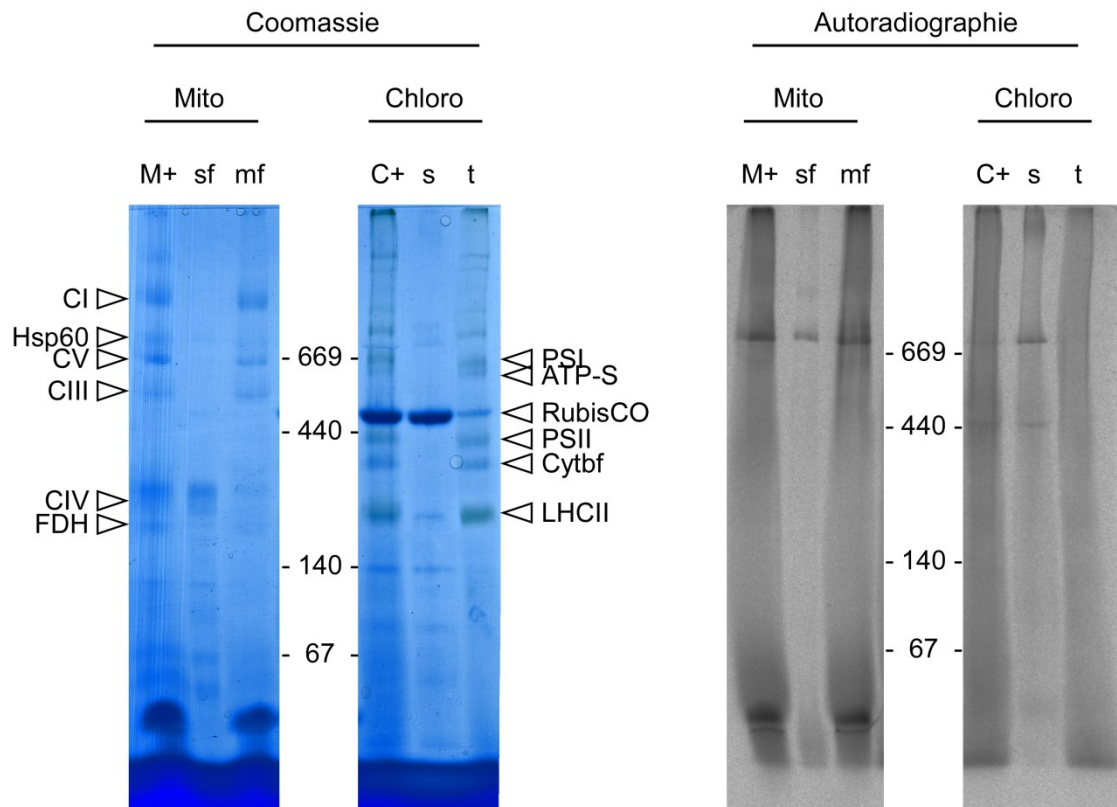


Abb. 3.19: Assemblierungsverhalten von Cytochrom c1. Native PAGE der solubilisierten Organellfraktionen (links) mit Zuordnung der Proteinkomplexe (weiße Pfeile) und Autoradiogramm dieses Gels (rechts). Die Abbildung stammt von ein und demselben Gel. Nach dem Import erfolgte die Trennung der Mitochondrien (M+) in Membran- (mf) und lösliche (sf) Fraktion. Die Chloroplasten (C+) wurden in Stroma (s) und Thylakoide (t) getrennt.

Die Coomassie Colloidal-Färbung des nativen Gels der Organellfraktionen zeigt (Abb. 3.19 links), dass verschiedene Komplexe detektiert und durch Vergleich mit Literaturdaten (Jänsch et al., 1996; Eubel et al., 2003; Meyer et al., 2008) zugeordnet werden können. Bei den Mitochondrien konnten Komplex I (CI), Hsp60 Komplex (Hsp60), Komplex V (CV), Komplex III (CIII), Komplex IV (CIV) und die Formiatdehydrogenase (FDH) im BN-Gel identifiziert werden. Die genannten Komplexe befinden sich überwiegend in der Membranfraktion. Im Gegensatz zu den größeren Komplexen der Membranfraktion weist die lösliche Fraktion vor allem kleinere Komplexe auf. Bei den Chloroplasten sind folgende Komplexe der photosynthetischen Elektronentransportkette im BN-Gel zu erkennen:

Photosystem I (PSI), ATP-Synthase (ATP-S), Photosystem II (PSII), Cytochrom b6/f Komplex (Cytbf) und der Lichtsammelkomplex von PS II (LHCII) (Berghöfer and Klösgen, 1999). Die modifizierte BN-PAGE eignet sich sowohl zur Trennung von löslichen als auch von Membranproteinkomplexen beider Organellen, sodass eine vergleichende Analyse der Proben möglich ist.

Das Autoradiogramm der nativer Gelelektrophorese zeigt (Abb. 3.19 rechts), dass das *in vitro* importierte Cytochrom c1 offenbar nicht befähigt ist, in den beiden Organellen, Mitochondrien und Chloroplasten, in spezifischen Komplexen zu assemblieren. Es sind lediglich unspezifische Banden bzw. Signale des monomeren Proteins zu detektieren. Dies kann darauf hindeuten, dass der Transport eines Proteins in ein Organell nicht automatisch bzw. spontan zur Komplexassemblierung führt.

3.6 Konkurrenzexperimente

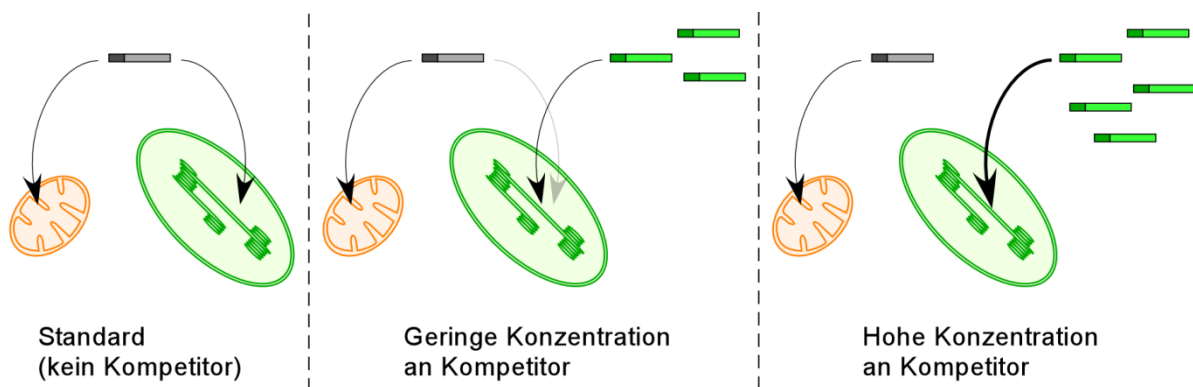


Abb. 3.20: Prinzip eines Konkurrenzexperimentes. Mit steigender Konkretorkonzentration verringert sich der Import des *in vitro* translatierten Proteins, wenn beide Proteine über den gleichen Weg in das entsprechende Organell transportiert werden.

Um zu untersuchen, ob der Import zweier Proteine zum Teil bzw. komplett über denselben Weg erfolgt, wird in einem Konkurrenzexperiment dem Importansatz, zusätzlich zum *in vitro* Translationsprodukt, überexprimiertes Protein zugegeben (Abb. 3.20). Falls beide Proteine um dieselben Transportapparate konkurrieren, wird mit steigender Konzentration des Konkretorproteins der Import des *in vitro* translatierten Proteins zunehmend blockiert, da es zur Sättigung der Importmaschinerie kommt. Es wurde also untersucht, ob der Import von Cytochrom c1 in die Chloroplasten über den Weg erfolgt, den auch authentische plastidäre Proteine nehmen.

3.6.1 Kompetitor OEC33

Überexprimiertes OEC33 wurde als ein Kompetitor für den Chloroplastenimport eingesetzt. Die authentischen plastidären Substrate FNR bzw. OEC23 wurden als Kontrollproteine verwendet. Der Kompetitor wurde in Konzentrationen von 0 bis 1,5 μM eingesetzt, wobei die Harnstoffkonzentration in allen Ansätzen angeglichen wurde, um einen dementsprechenden Effekt zu unterbinden. Zusätzlich wurde ein Standardansatz ohne Kompetitor und Harnstoff durchgeführt. Ein Vergleich des Standardansatzes mit dem 0 μM Kompetitoransatz zeigt einen möglichen Einfluss der eingesetzten Harnstoffkonzentration auf.

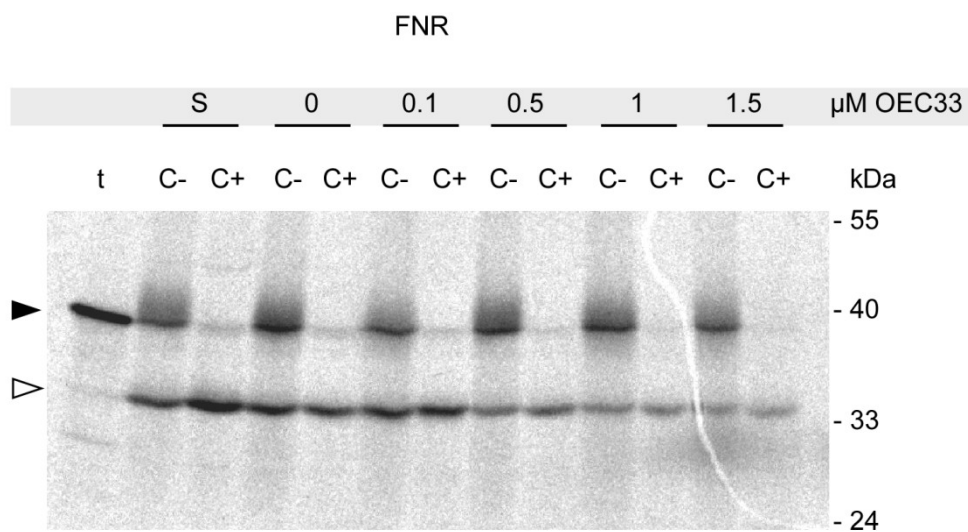


Abb. 3.21: Konkurrenz des Imports von FNR mit OEC33. Als Substrat für den Import in Chloroplasten wurde die *in vitro* translatierte FNR (t) gemeinsam mit unterschiedlichen Mengen an überexprimiertem OEC33 als Kompetitor angeboten. Als Kontrolle wurde der Import ohne Harnstoff (S) denen mit aufsteigenden Konzentrationen (0 – 1,5 μM) an Kompetitor gegenübergestellt, die immer die gleiche Konzentration an Harnstoff aufwiesen. Die Auftragung und Beschriftung entsprechen darüber hinaus Abb. 3.5.

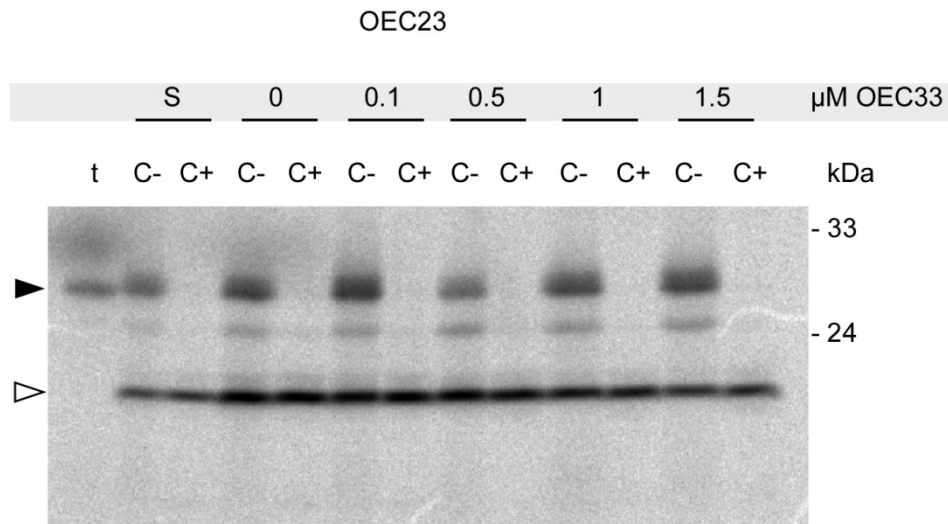


Abb. 3.22: Konkurrenz des Imports von OEC23 mit OEC33. Als Substrat für den Import in Chloroplasten wurde die *in vitro* translatiertes OEC23 (t) gemeinsam mit unterschiedlichen Mengen an überexprimiertem OEC33 als Kompetitor angeboten. Als Kontrolle wurde der Import ohne Harnstoff (S) denen mit aufsteigenden Konzentrationen (0 – 1,5 μM) an Kompetitor gegenübergestellt, die immer die gleiche Konzentration an Harnstoff aufwiesen. Die Auftragung und Beschriftung entsprechen darüber hinaus Abb. 3.5.

Der Import von FNR in die Chloroplasten (Abb. 3.21) ist bereits bei 0,5 μM OEC33 deutlich verringert. Der Import von OEC23 (Abb. 3.22) wird durch Zugabe von Harnstoff zunächst aktiviert. Mit steigender Konzentration an OEC33 erfolgt dann aber auch eine Abnahme der Transporteffizienz. In beiden Fällen bewirkt die zunehmende Konzentration an OEC33 im Importansatz eine kontinuierliche Abnahme der Menge an importiertem reifem Protein.

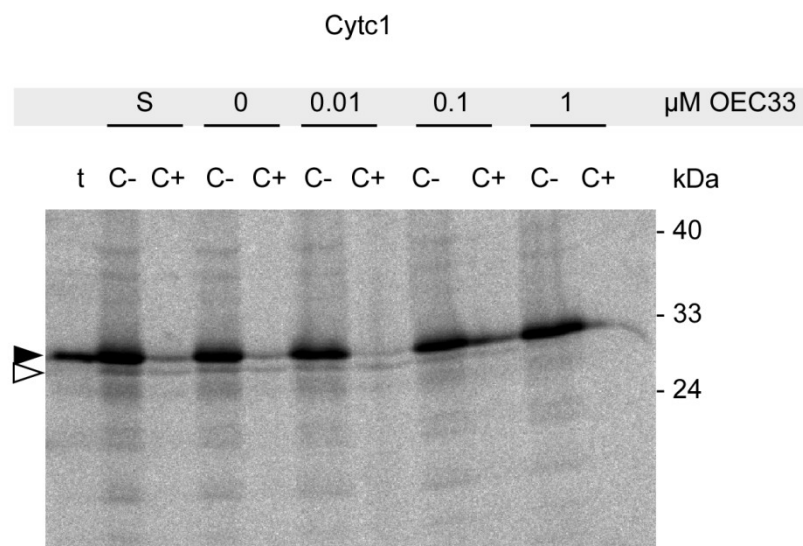


Abb. 3.23: Konkurrenz des Imports von Cytochrom c1 mit OEC33. Als Substrat für den Import in Chloroplasten wurde die *in vitro* translatiertes Cytc1 (t) gemeinsam mit unterschiedlichen Mengen an überexprimiertem OEC33 als Kompetitor angeboten. Als Kontrolle wurde der Import ohne Harnstoff (S) denen mit aufsteigenden Konzentrationen (0 – 1 μM) an Kompetitor gegenübergestellt, die immer die gleiche Konzentration an Harnstoff aufwiesen. Die Auftragung und Beschriftung entsprechen darüber hinaus Abb. 3.5.

Für Cytochrom c1 ist ein ähnlicher Effekt zu beobachten (Abb. 3.23). Mit zunehmender Konkretorkonzentration wird der Import in die Chloroplasten immer stärker blockiert. Subjektiv wird der Cytochrom c1-Import bereits bei niedrigen Konkretorkonzentrationen nahezu vollständig verhindert. Dies ist aber nur durch eine Quantifizierung tatsächlich zu bestimmen (Abschnitt 3.6.4, S. 84).

3.6.2 Konkretor FNR

FNR wurde als weiterer Konkretor eingesetzt, um die zuvor beschriebenen Ergebnisse für Cytochrom c1 zu bestätigen (Abb. 3.24). Zusätzlich wurde überprüft, ob der plastidäre Konkretor einen Einfluss auf den mitochondriellen Import zeigt.

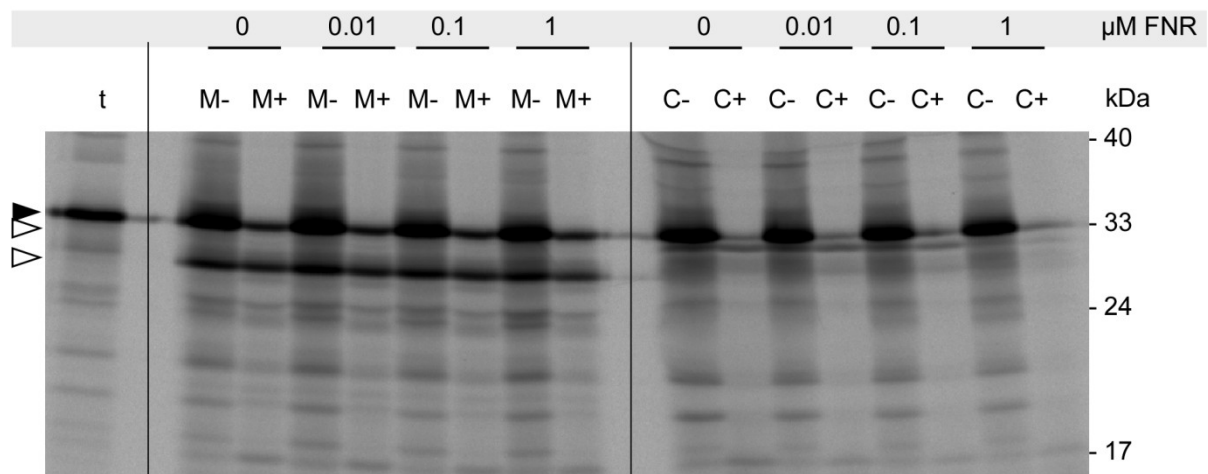


Abb. 3.24: Überexprimierte FNR als Konkretor. Die experimentelle Durchführung war analog Abb. 3.21, allerdings mit überexprimierter FNR als Konkretor in aufsteigenden Konzentrationen (0 – 1 μM). Die Auftragung und Beschriftung entsprechen darüber hinaus Abb. 3.5.

Die Importraten der mitochondriellen Proben verbleiben unverändert bis zu einer Konkretorkonzentration von 1 μM . Der Import von Cytochrom c1 in die Mitochondrien ist somit stabil in Gegenwart des Konkretors FNR. Der plastidäre Import wird dagegen durch die FNR beeinflusst. Bei einer Konzentration des Konkretors von 1 μM lässt sich eine deutliche Reduzierung der Importrate feststellen.

3.6.3 Kompetitor Cytochrom c1

Da der Import von Cytochrom c1 in die Chloroplasten durch OEC33 bzw. FNR als Kompetitoren behindert wird, ließ sich der Umkehrschluss ziehen, dass Cytochrom c1 als Kompetitor für plastidäre Proteine eingesetzt werden kann. Voraussetzung für derartige Experimente ist die Verfügbarkeit von überexprimiertem Cytochrom c1. Auf die Expression von Cytochrom c1 wird später im Detail eingegangen (Abschnitt 3.8.3, S. 94). Cytochrom c1 wurde in *in vitro* translaterter Form als Substrat und gleichzeitig als überexprimiertes Protein als Kompetitor eingesetzt (Abb. 3.25).

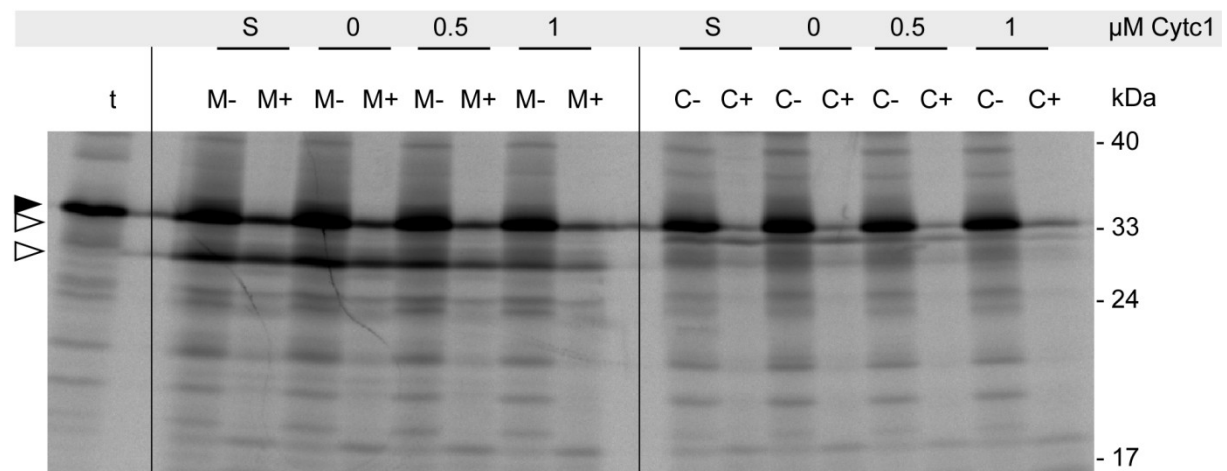


Abb. 3.25: Überexprimiertes Cytochrom c1 als Kompetitor. Die experimentelle Durchführung war analog Abb. 3.22, allerdings mit überexprimiertem Cytochrom c1 als Kompetitor in aufsteigenden Konzentrationen (0 – 1 μ M). Die Auftragung und Beschriftung entsprechen darüber hinaus Abb. 3.5.

Die verwendete Harnstoffkonzentration beeinträchtigt weder den mitochondrialen noch den chloroplastidären Import. Bereits bei 0,5 μ M Kompetitor ist der mitochondrielle Import von Cytochrom c1 verringert. Noch deutlicher zeigt sich der Wettbewerbseffekt bei einer Konzentration von 1 μ M. Der plastidäre Import wird mit zunehmender Kompetitorkonzentration ebenfalls gehemmt. Bei der höchsten Kompetitorkonzentration ist die Menge an Prozessierungsprodukt von Cytochrom c1 in den Chloroplasten erheblich reduziert. Überexprimiertes Cytochrom c1 kann *in vitro* also sowohl mit dem mitochondrialen als auch dem chloroplastidären Import konkurrieren.

3.6.4 Kompetitionen im Vergleich

Für einen genaueren Vergleich der Ergebnisse aus den verschiedenen Konkurrenzexperimenten wurden diese quantifiziert.

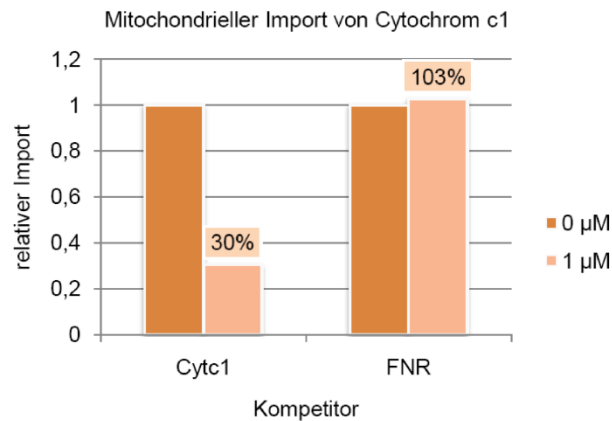


Abb. 3.26: Quantifizierung der Konkurrenzexperimente zum mitochondriellen Import. Mitochondrieller Import von Cytochrom c1 und der Effekt von überexprimiertem Cytc1 und FNR als Konkurrenten im Vergleich. Die Quantität der Prozessierungsprodukte in den Organellen (M-) wurde bestimmt. Der Import ohne Konkurrentenzugabe (0 μM) wurde jeweils 1 gesetzt und die anderen Importwerte relativ dazu berechnet. Der prozentuale Anteil des verbleibenden Importes nach Zugabe von 1 μM Konkurrent ist angemerkt.

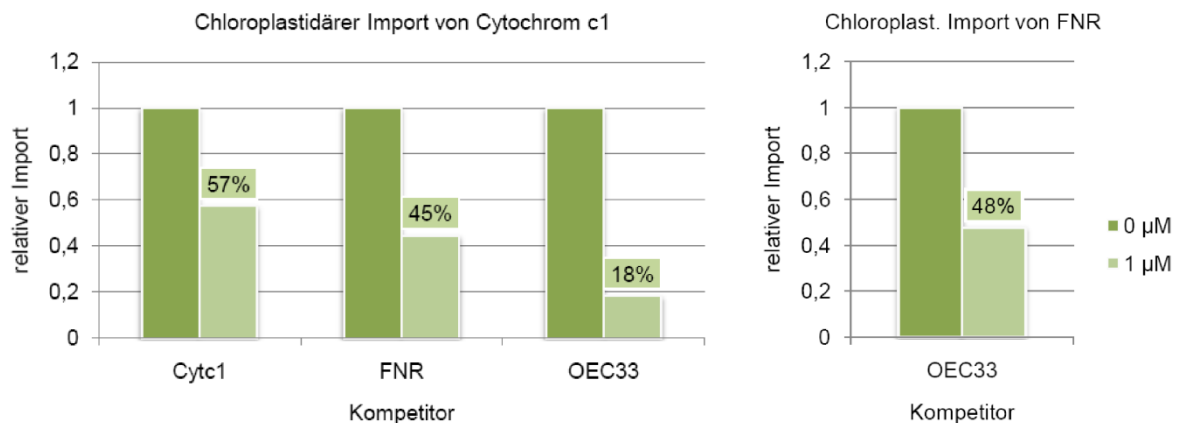


Abb. 3.27: Quantifizierung der Konkurrenzexperimente zum chloroplastidären Import. Chloroplastidärer Import von Cytochrom c1 und der Effekt verschiedener Konkurrenten im Vergleich (links), sowie der Einfluss des Konkurrenten OEC33 auf den chloroplastidären Import von FNR (rechts). Die Quantität der Prozessierungsprodukte in den Organellen (C-) wurde bestimmt. Der Import ohne Konkurrentenzugabe (0 μM) wurde jeweils 1 gesetzt und die anderen Importwerte relativ dazu berechnet. Der prozentuale Anteil des verbleibenden Importes nach Zugabe von 1 μM Konkurrent ist angemerkt.

Der Vergleich der Kompetitionen des Mitochondrienimports zeigt (Abb. 3.26), dass Cytochrom c1 mit sich selbst um den Import in die Mitochondrien konkurriert. Das überexprimierte Cytochrom c1 ist demzufolge als Kompetitor für den mitochondrialen Proteintransport geeignet. Die plastidäre FNR kann den Import von Cytochrom c1 in die Mitochondrien erwartungsgemäß nicht behindern.

Die Importexperimente in die Chloroplasten (Abb. 3.27) in Gegenwart der authentischen plastidären Substrate FNR und OEC33 zeigen eine Reduzierung des Transportes von Cytochrom c1. Die Reduzierung ist jedoch für das OEC33 deutlich stärker als für die FNR oder Cytochrom c1 als Kompetitoren. Der Import der FNR wird ebenfalls durch OEC33 verringert, wenn auch weniger stark als der Import des Cytochrom c1. Die plastidären Substrate konkurrieren demnach mit Cytochrom c1 um die Transportapparate der Chloroplasten. Cytochrom c1 benutzt also teilweise oder vollständig die gleiche Transportmaschinerie wie authentische plastidäre Proteine.

3.7 Mitochondrieller und chloroplastidärer Import von Cytochrom c1 im Vergleich

In diesem Abschnitt soll die Frage nach möglichen Unterschieden zwischen dem mitochondrialen und dem chloroplastidären Import von Cytochrom c1 näher beleuchtet werden.

3.7.1 Einfluss der Menge an Translation

Ein wichtiger Punkt bei der Beurteilung von *in vitro* Importen ist die Menge an angebotenem Substrat. Ist der Import von Cytochrom c1 in die Chloroplasten eventuell nur das Ergebnis eines Überschusses an Translationsprodukt? Zur Beantwortung dieser Frage wurden daher Importexperimente mit reduzierten Mengen an *in vitro* Translationsprodukt durchgeführt (Abb. 3.28). Der Einfluss der Substratkonzentration auf den Import von Cytochrom c1 sollte so untersucht werden.

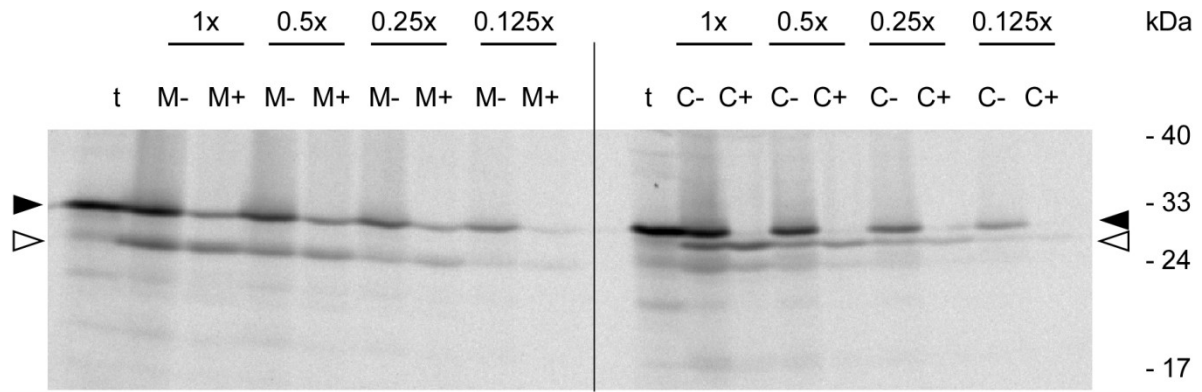


Abb. 3.28: Einfluss der Substratmenge. Für die *in vitro* Importe wurden absteigende Mengen an Translation eingesetzt, die dem x-fachen eines Standardansatzes entsprechen. Die Auftragung und Beschriftung entsprechen darüber hinaus Abb. 3.5.

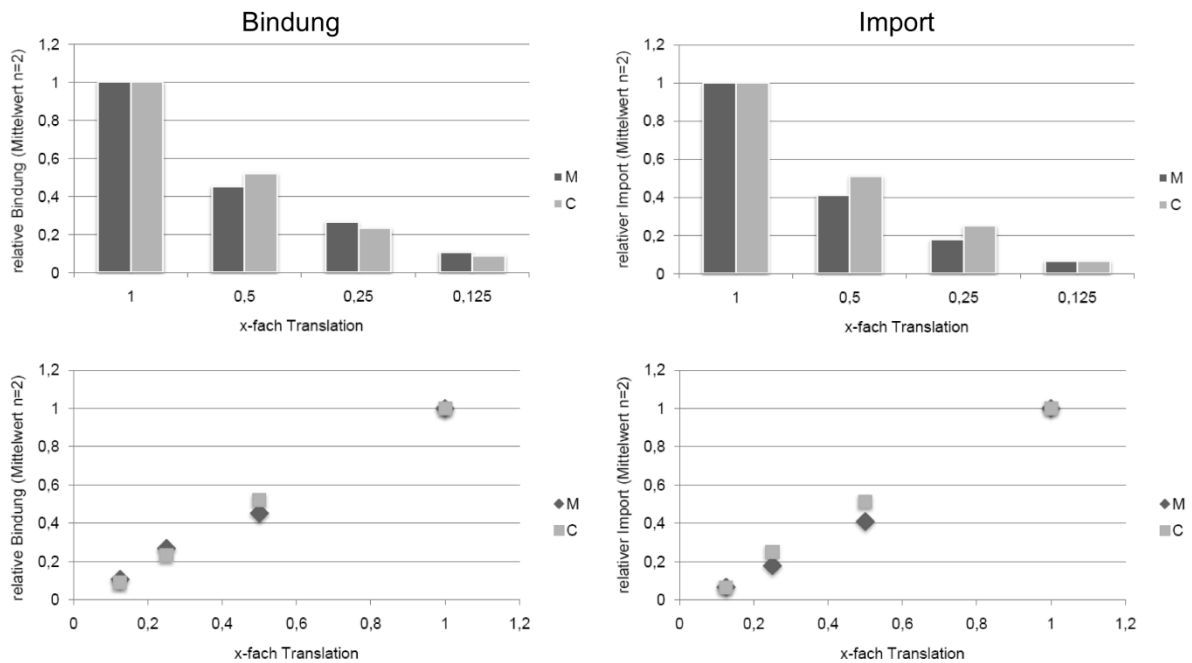


Abb. 3.29: Quantifizierung - Einfluss der Substratmenge. Die Menge an gebundenem Vorläuferprotein und an Prozessierungsprodukt (M- und C-) wurde gemessen. Die Bindung an und der Import in die Organellen bei Zugabe der Standardmenge an Translation (1-fach) wurde jeweils 1 gesetzt und die anderen Importwerte relativ dazu berechnet.

Der Import von Cytochrom c1 erfolgt auch bei der geringsten eingesetzten Menge an Translationsprodukt sowohl in die Mitochondrien als auch in die Chloroplasten. Die Bindung des Vorläuferproteins an die Oberfläche der Organellen und die Menge an Prozessierungsprodukt sinkt in beiden Ansätzen mit abnehmender Menge an Translationsprodukt.

Die Quantifizierung zeigt (Abb. 3.29), dass eine direkte Proportionalität zwischen der Translationsmenge und der Bindung des Vorläufers an die Organellen bzw. der Importrate

besteht. Diese Aussage trifft sowohl auf den mitochondriellen als auch den chloroplastidären Import zu. Das relative Organell-*Targeting* von Cytochrom c1 ist unabhängig von der Substratkonzentration. Somit ist der chloroplastidäre Import auch nicht auf ein Überangebot an Substrat zurückzuführen, sondern stellt eine Eigenschaft des Proteins dar.

3.7.2 Stabilität der importierten Proteine innerhalb der Organellen

Das unerwartete Resultat des plastidären Imports von Cytochrom c1 führt zur Überlegung, ob dieses eventuelle Fehltargeting dazu führt, dass Cytochrom c1 zwar in die Chloroplasten gelangt, dort aber aufgrund einer fehlenden Funktion direkt wieder abgebaut wird. Beispielsweise konnte für das thylakoidäre Protein OEC33 gezeigt werden, dass eine absichtliche Fehlsortierung ins Stroma die rasche Degradation dieses Proteins bewirkt (Halperin and Adam, 1996). Liegt kein Fehltargeting der Proteine vor, sollten die importierten Proteine über einen längeren Zeitraum im Organell stabil vorliegen können. Dazu wurde die Stabilität von Cytochrom c1 nach erfolgtem Import untersucht (Abb. 3.30), indem die Ansätze nach der Importreaktion für bis zu zwei Stunden unter Importbedingungen inkubiert wurden, bevor sie final für die Elektrophorese bearbeitet wurden. Limitierend ist dabei die Stabilität der Organellen selbst, diese lässt sich über authentische chloroplastidäre Proteine, wie beispielsweise die FNR, verfolgen.

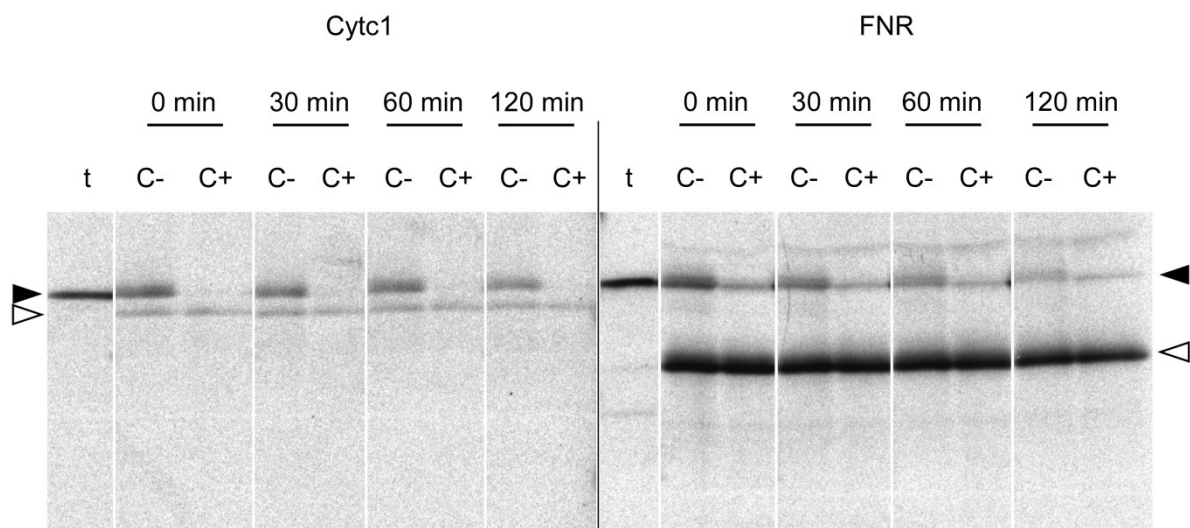


Abb. 3.30: Stabilität der Prozessierungsprodukte nach Import. Nach Import und Proteasebehandlung wurden die Organellen für die angegebene Zeit inkubiert, um mögliche Abbauprozesse festzustellen, bevor die abschließende Präparation der Proben erfolgte. Die Auftragung und Beschriftung entsprechen darüber hinaus Abb. 3.5.

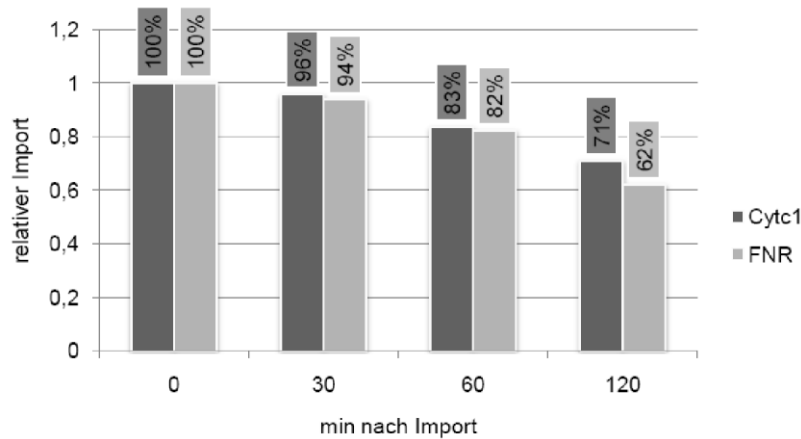


Abb. 3.31: Quantifizierung - Stabilität der Prozessierungsprodukte nach Import. Die Menge an Prozessierungsprodukt (C-) wurde gemessen. Der Import in die Organellen unmittelbar nach Import und Proteasebehandlung (0 min) wurde jeweils 1 gesetzt und die anderen Importwerte relativ dazu berechnet.

Die prozessierte FNR ist auch nach 120 min noch in den Chloroplasten zu detektieren. Die Organellen sind demnach über diesen Zeitraum hinweg überwiegend intakt geblieben. Im Vergleich zur 0 min Probe lässt sich aber eine leichte Verringerung der Menge an Prozessierungsprodukt vermuten, dies konnte durch eine anschließende Quantifizierung (Abb. 3.31) bestätigt werden.

Für das plastidäre Prozessierungsprodukt von Cytochrom c1 lässt sich Vergleichbares sagen. Es zeigt sich, dass Cytochrom c1 auch über Stunden innerhalb der Chloroplasten stabil bleibt. Die Menge an Prozessierungsprodukt nimmt zwar leicht ab, dies ist aber in gleichem Maße für die FNR festzustellen. Demnach wird Cytochrom c1 in den Chloroplasten nicht als falsch erkannt und abgebaut, sondern liegt stabil vor.

3.7.3 *In vitro* Zeitreihe

Erfolgt der Import von Cytochrom c1 in die Chloroplasten verzögert im Vergleich zu den Mitochondrien, also erst nach längeren Inkubationszeiten? Zur Beantwortung dieser Frage wurden zeitabhängige Importexperimente in Mitochondrien bzw. Chloroplasten durchgeführt. Dazu wurde die Inkubationszeit für die Importreaktion von 0 bis 30 min variiert (Abb. 3.32).

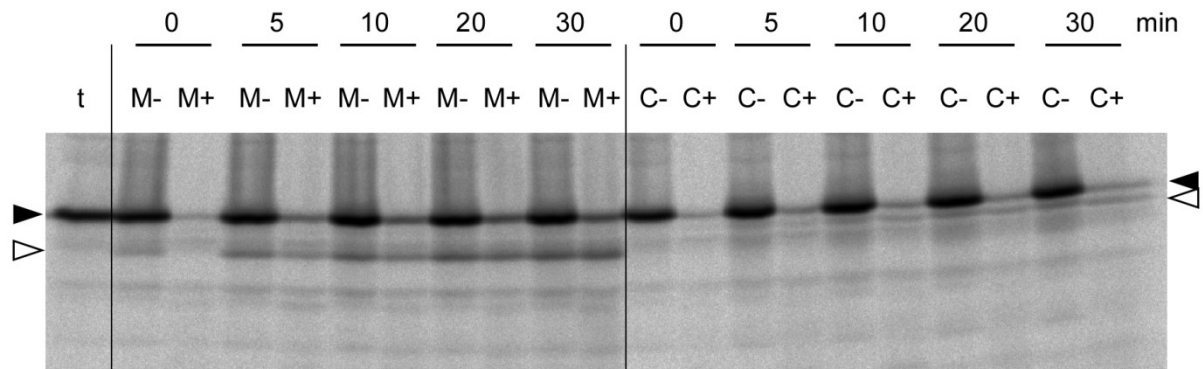


Abb. 3.32: Einfluss der Inkubationszeit auf die Importeffizienz. Die Importe wurden analog zum Standardansatz durchgeführt mit dem Unterschied, dass die Inkubationszeiten für den eigentlichen Import von 0 – 30 min gewählt wurden. Die Auftragung und Beschriftung entsprechen darüber hinaus Abb. 3.5.

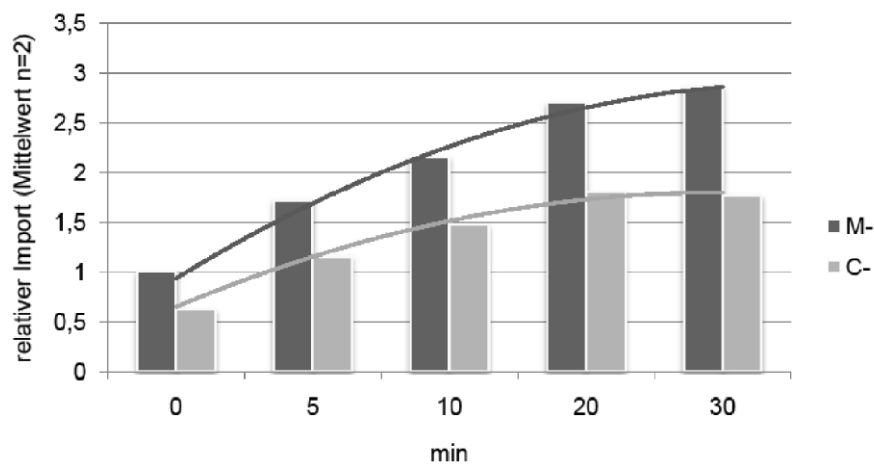


Abb. 3.33: Quantifizierung der Import-Zeitreihe. Die Menge an Prozessierungsprodukt (M- und C-) wurde gemessen. Der Import in die Mitochondrien unmittelbar zu Beginn der Zeitreihe (0 min) wurde 1 gesetzt und die anderen Importwerte relativ dazu berechnet.

Sowohl für den mitochondriellen als auch für den chloroplastidären Import von Cytochrom c1 kann eine Zunahme des reifen Proteins in Abhängigkeit von der Importzeit beobachtet werden. Der Plastidenimport ist offensichtlich bereits nach 20 min nahezu gesättigt, da der importkompetente Anteil des Vorläuferproteins entsprechend schnell in die Chloroplasten transportiert wird. Folglich lassen sich kaum Intensitätsunterschiede zum 30 min Zeitpunkt erkennen. Der Mitochondrienimport nimmt bis zum 30 min Zeitpunkt kontinuierlich zu. Mit Hilfe des zeitabhängigen Imports konnte für Cytochrom c1 demnach gezeigt werden, dass die Prozessierungsprodukte in den Organellen akkumulieren. Der Mitochondrienimport von Cytochrom c1 ist zwar höher, allerdings zeigen sich vergleichbare Kinetiken für den Import des Proteins in beide Organellen (Abb. 3.33). Der

Chloroplastenimport von Cytochrom c1 ist demzufolge kein Artefakt längerer Inkubationszeiten.

3.8 Physiologie

3.8.1 Organellen aus Spinat

Die *in vitro* Importexperimente dieser Arbeit wurden üblicherweise mit aus Erbse isolierten Organellen durchgeführt. Inwiefern der duale Transport von Cytochrom c1 auch in Organellen anderer Pflanzenspezies nachvollziehbar ist, wurde ebenfalls überprüft. Dazu wurden die Organellen aus Spinat isoliert. Die Präparation intakter, importkompetenter Chloroplasten aus Spinat war bereits gut etabliert. Für die Gewinnung von Mitochondrien konnte das Präparationsprotokoll für Erbse im Wesentlichen übernommen werden. Einzige Ausnahme stellt der Dichtegradient dar, der in anderen Percollkonzentrationen eingesetzt werden musste (vgl. Material und Methoden, Abschnitt 2.4.5, S. 45).

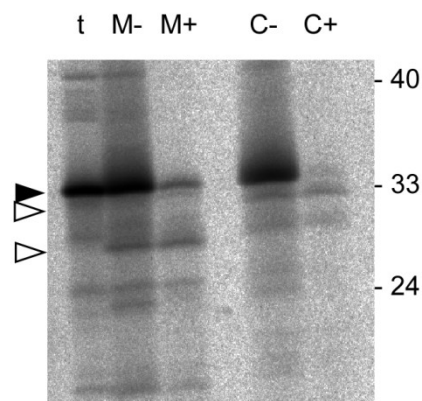


Abb. 3.34: Import von Cytochrom c1 in Spinatorganellen. Der *in vitro* Import wurde analog zu den Experimenten mit Organellen aus Erbse durchgeführt. Die Auftragung und Beschriftung entsprechen Abb. 3.5.

Die *in vitro* Importversuche wurden in gleicher Art wie zuvor beschrieben (Abschnitt 3.1.3, S. 59) durchgeführt. Es zeigt sich, dass Cytochrom c1 sowohl in die Mitochondrien, als auch in die Chloroplasten aus Spinat importiert werden kann (Abb. 3.34). Die proteasegeschützten Prozessierungsprodukte entsprechen größtmäßig denen der Erbsenimporte. Der duale Transport von Cytochrom c1 ist demnach nicht auf eine Pflanzenspezies beschränkt, sondern unabhängig davon, ob die Organellen aus Erbse oder aber aus Spinat präpariert wurden.

3.8.2 Einfluss des Alters der Pflanzen

Betrachtet man alle durchgeführten *in vitro* Importe von Cytochrom c1 mit Organellen aus Erbse etwas genauer, fällt auf, dass das Verhältnis von Mitochondrien- zu Chloroplastenimport nicht unerheblichen Schwankungen unterliegt (Abb. 3.35). Es wurden daher neun unabhängige Importexperimente von Cytochrom c1 quantifiziert und das Verhältnis von mitochondriellem zu chloroplastidärem Import bestimmt. Zwar liegt dabei der durchschnittliche Transport in die Mitochondrien generell höher als der in die Chloroplasten, dennoch stellt sich die Frage, welche Faktoren das Verhältnis des Importes in die beiden Organellen beeinflussen.

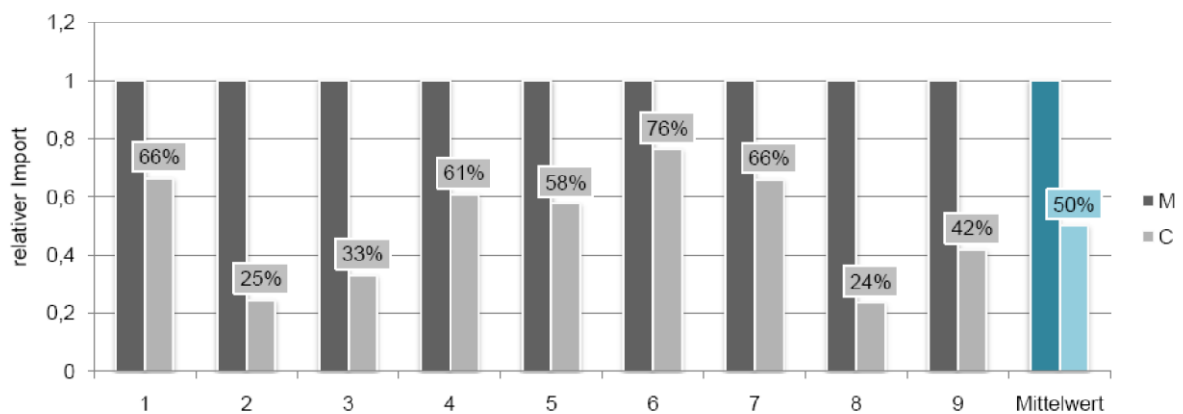


Abb. 3.35: Effektivität des Imports von Cytochrom c1 in Mitochondrien und Chloroplasten. Angegeben sind die prozentualen Verhältnisse von mitochondriellem zu chloroplastidärem Import aus neun unabhängigen Experimenten sowie der Mittelwert dieser Experimente. Die Menge an Prozessierungsprodukt (M- und C-) wurde gemessen. Der Import in die Mitochondrien wurde jeweils 1 gesetzt und der entsprechende Import in die Chloroplasten relativ dazu berechnet.

Da die Importexperimente immer nach dem gleichen Protokoll durchgeführt wurden, kann man einen Einfluss durch das Pflanzenmaterial selbst vermuten. Der physiologische Zustand der Erbsen kann die Importeffizienz eventuell verändern. Beispielhaft wurde dazu das Alter der Pflanzen untersucht, da die Präparation der Organellen aus Erbsen stattfand, die zwischen ein und zwei Wochen alt waren. Für die Untersuchung der Abhängigkeit des Proteintransports vom Alter der Pflanzen wurden die Organellen zum einen aus acht, zum anderen aus dreizehn Tage alten Erbsenpflanzen präpariert (Abb. 3.36). Bei den acht Tage alten Pflanzen sind die Blätter noch geschlossen, während nach dreizehn Tagen die Blätter bereits voll entfaltet vorliegen.



Abb. 3.36: Pflanzenmaterial für die Überprüfung des Alterseffektes auf den Import. Die für die Organellpräparation eingesetzten Erbsen waren 8 bzw. 13 Tage alt.

Werden nun parallel präparierte Organellen aus diesen unterschiedlich alten Pflanzen in einem Importansatz verwendet, so lassen sich sowohl beim Chloroplasten- als auch beim Mitochondrienimport Unterschiede erkennen (Abb. 3.37). Mit höherem Alter steigt der Import von Cytochrom c1 in die Mitochondrien, während sich der Import in die Chloroplasten verringert. Dies ist ein erster Hinweis auf einen Einfluss des Pflanzenalters und somit der Physiologie auf die Importrate von Cytochrom c1.

Das Alter hat dagegen kaum Einfluss auf den Transport des Kontrollproteins OEC23. Sowohl mitochondrieller als auch chloroplastidärer Import verringern sich nur minimal. Daran ist zu erkennen, dass die Präparation selbst keinen Einfluss auf die Importkompetenz der Organellen hatte.

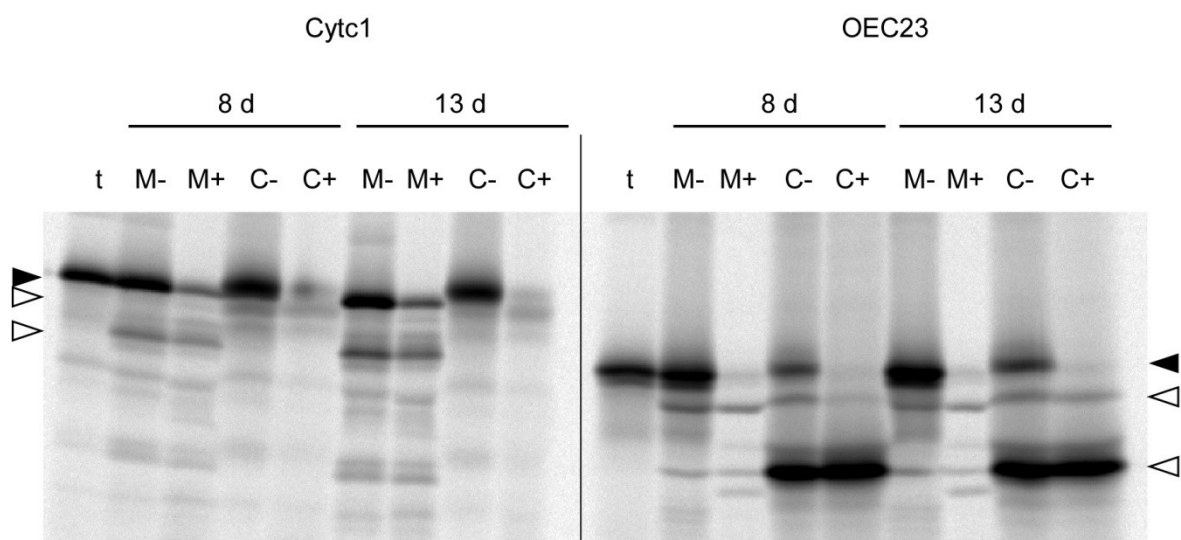


Abb. 3.37: Einfluss des Alters auf die Importeffizienz. Die Importe der Vorläuferproteine Cytochrom c1 und OEC23 in Organellen aus jüngeren (8 d) und älteren (13 d) Erbsenpflanzen sind gegenübergestellt. Die Auftragung und Beschriftung entsprechen darüber hinaus Abb. 3.5.

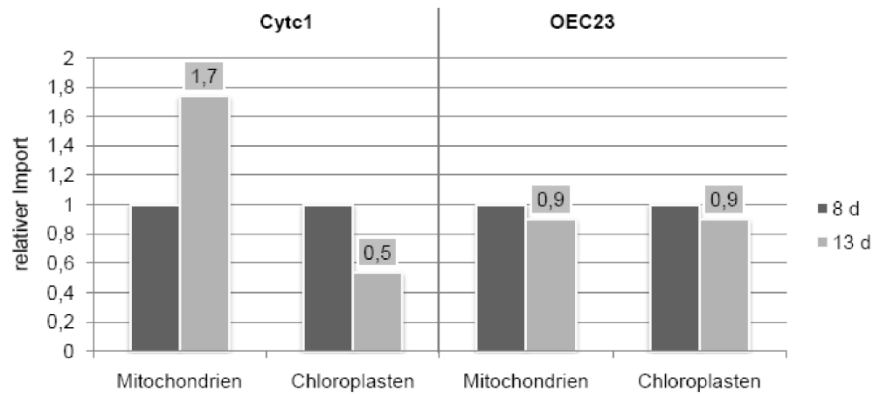


Abb. 3.38: Quantifizierung Alterseffekt. Vergleich der relativen Importraten von OEC23 und Cytc1 bei Mitochondrien und Chloroplasten aus 8 bzw. 13 d alten Pflanzen. Die Menge an Prozessierungsprodukt (M- und C-) wurde gemessen. Der Import in die Organellen der 8 d alten Pflanzen wurde jeweils 1 gesetzt und die Importe der Organellen aus den 13 d alten Pflanzen relativ dazu berechnet.

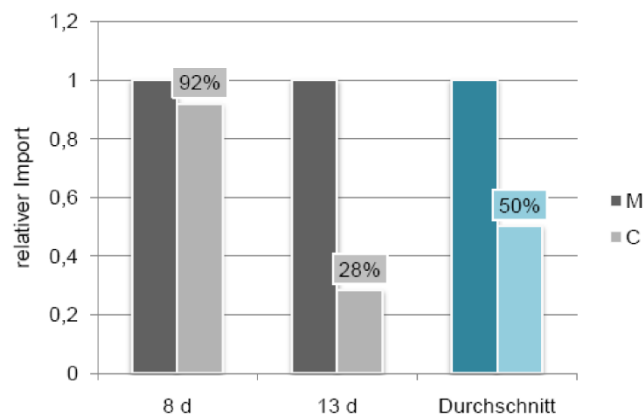


Abb. 3.39: Quantifizierung Alterseffekt. Vergleich des Verhältnisses von Mitochondrien- zu Chloroplastenimport von Cytc1 zueinander und im Vergleich zum Durchschnittswert vorheriger Experimente (vgl. Abb. 3.35).

Vergleicht man den Import in die Organellen von acht und dreizehn Tage alten Erbsenpflanzen quantitativ (Abb. 3.38), lässt sich feststellen, dass der mitochondriale Import auf das 1,7fache steigt und der plastidäre Import auf das 0,5fache sinkt bei den Organellen aus älteren Pflanzen. Werden die Organellen aus Pflanzen desselben Alters relativ zueinander betrachtet (Abb. 3.39), sieht man, dass die Menge an importiertem Protein bei den Mitochondrien und Chloroplasten der jüngeren Pflanzen vergleichbar ist, während bei den Organellen der älteren Pflanzen das Verhältnis deutlich in Richtung Mitochondrien verschoben wird. Die gezeigten Daten geben Hinweise darauf, dass auch das Alter der isolierten Organellen einen Einfluss auf den Transport von Cytochrom c1 hat. Dies kann auf physiologische Faktoren zurückzuführen sein, die unterschiedlich in Abhängigkeit vom Alter der Pflanzen wirken.

3.8.3 Cytochrom c1 Antikörper

Für weitergehende Studien war die Herstellung von Cytochrom c1 in überexprimierter Form sinnvoll. Überexprimiertes Cytochrom c1 kann einerseits für Konkurrenzexperimente (wie zuvor bereits in Abschnitt 3.6.3 gezeigt), andererseits als Antigen für die Produktion eines Antikörpers eingesetzt werden.

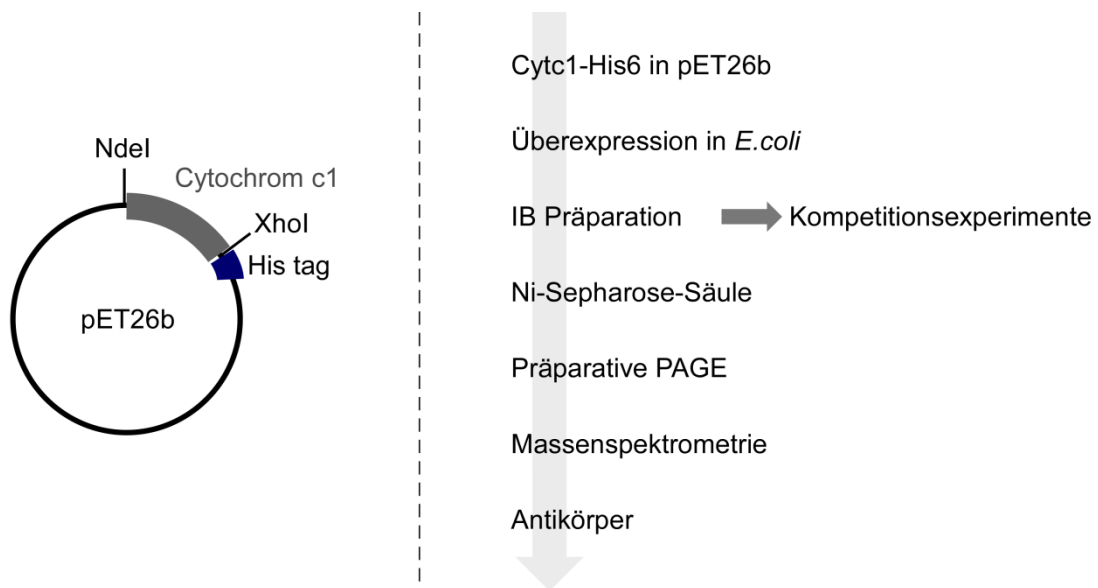


Abb. 3.40: Expression und Reinigung von Cytochrom c1. Schematische Darstellung des Expressionsvektors mit Cytochrom c1, sowie der Expressions- und Reinigungsschritte, die final zum Antigen für die Antikörperproduktion führten. Die gereinigten und in Harnstoffpuffer gelösten *inclusion bodies* (IB) wurden auch für die Konkurrenzexperimente eingesetzt (Abschnitt 3.6.3, S. 83).

Daher wurde Cytochrom c1 aus *Solanum tuberosum* in den Expressionsvektor pET26-b kloniert und in *E. coli* überexprimiert (Abb. 3.40). Die Testexpression zeigt (Abb. 3.41 links), dass nach Induktion mit IPTG eine zusätzliche Bande auf Höhe der theoretischen Größe von Cyt c1-His6 im SDS-PAA-Gel auftritt. Dieses Protein ist hauptsächlich in den *inclusion bodies* zu finden, was durch eine Fraktionierung der *E. coli*-Kultur festzustellen war.

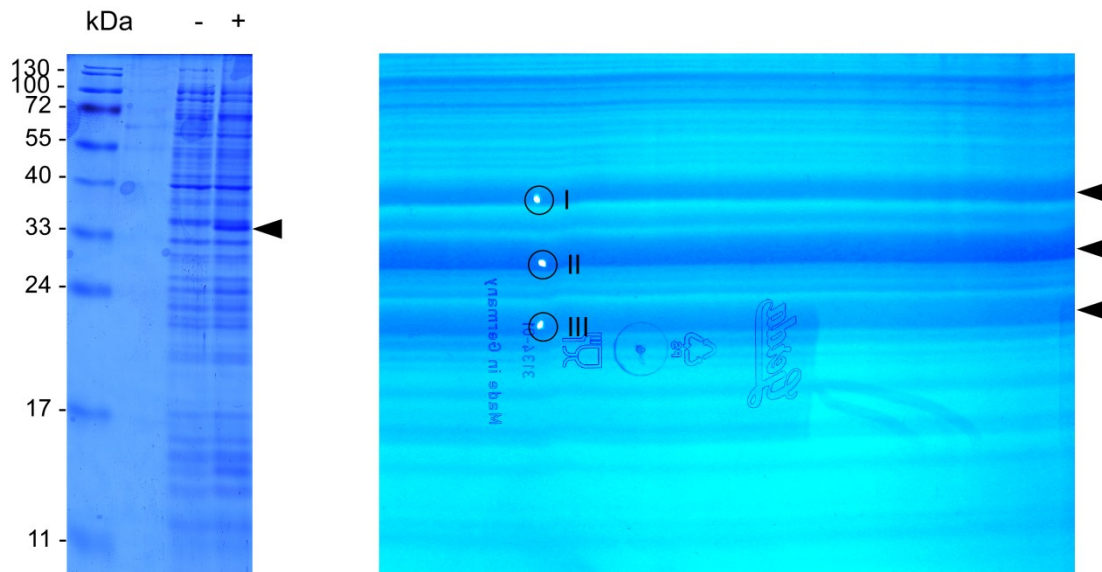


Abb. 3.41: Expression von Cytc1-His6 in *E. coli*. **Links:** Testexpression - Die Überexpression von Cytc1-His6 wurde im Minimaßstab getestet. Es wurden stöchiometrische Mengen vor (-) bzw. nach (+) der Induktion auf ein SDS-PAA-Gel aufgetragen. Der Pfeil markiert die erwartete Größe für Cytc1-His6. **Rechts:** Präparative SDS-PAGE der Cytc1-His6 - Überexpression und Probenahme für Massenspektrometrie. Von den dominanten Proteinbanden (Pfeile) wurden Proben (I, II, III) für die Massenspektrometrie entnommen.

Nach der Expression im quantitativen Maßstab erfolgte die Präparation der *inclusion bodies* mit anschließender Reinigung über den Hexahistidin-*tag* des exprimierten Proteins mittels Ni-Affinitätssäule. Die gereinigten *inclusion bodies* wurde dann über eine präparative SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 3.41 rechts). Es waren drei prominente Banden festzustellen. Von diesen wurde eine massenspektroskopische Analyse durchgeführt. Es zeigte sich, dass das vom Molekulargewicht her größte Protein ein *E. coli*-eigenes Protein ist, ein Elongationsfaktor. Die beiden kleineren Proteine konnten als Cytochrom c1 aus Kartoffel identifiziert werden.

Ein Vergleich der Fragmente aus der Massenspektrometrie zeigt (Abb. 3.42), dass das kleinere der beiden Proteine vermutlich C-terminal verkürzt ist, also keinen Membrananker trägt, während das größere den kompletten Vorläufer von Cytochrom c1 repräsentiert. Dieses Protein wurde demnach auch als Antigen für die Antikörperproduktion eingesetzt.

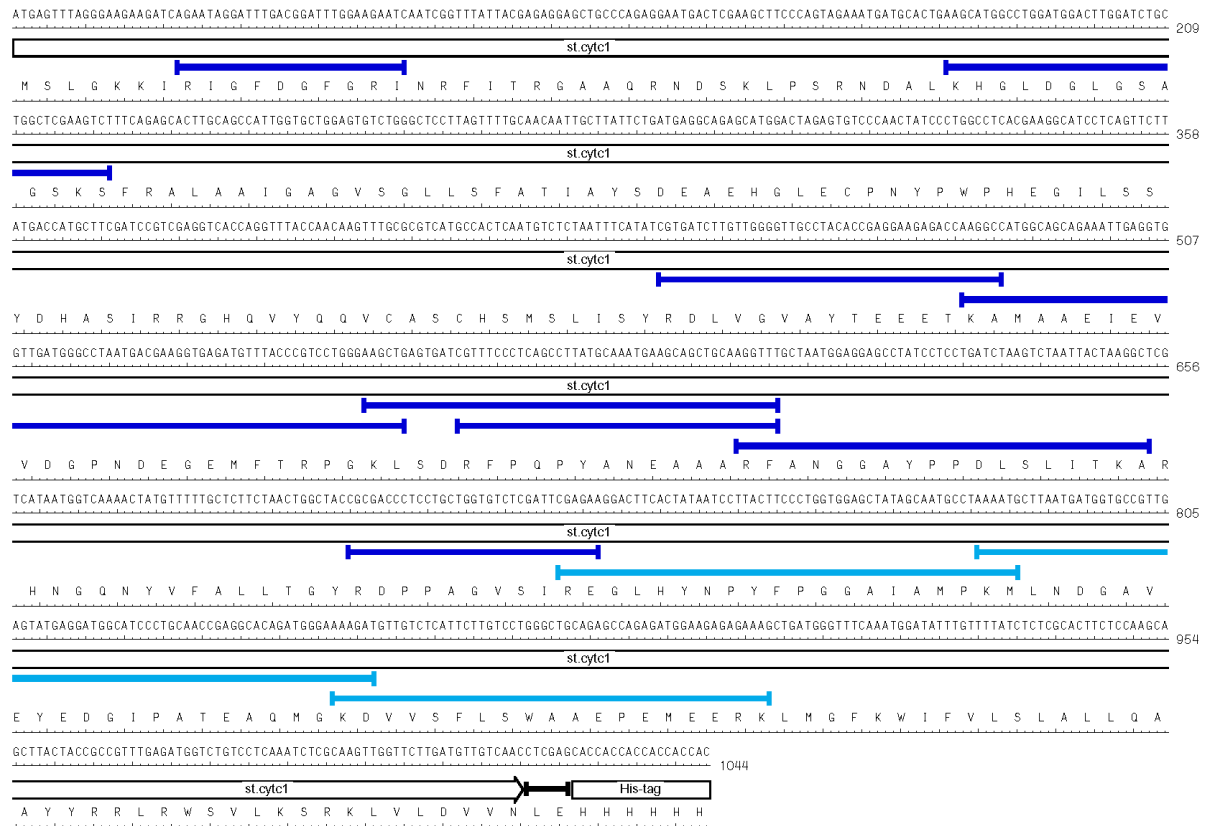


Abb. 3.42: Fragmente der Massenspektrometrie. Die dargestellten Fragmente des Cytochrom c1 aus *Solanum tuberosum* waren entweder in beiden Proben (II+III) (dunkelblau) oder nur in einer Probe (II) (hellblau) nachzuweisen.

Das gewonnene Antiserum konnte bereits für erste Experimente eingesetzt werden. Für die Western Analysen wurden Organellen aus drei verschiedenen Pflanzenspezies präpariert. Mitochondrien und Chloroplasten aus Erbse, Spinat und Kartoffel wurden vergleichend aufgetragen. Zum einen wurde mit dem Präimmunserum zum anderen mit der finalen Blutung aus der Antiserumproduktion detektiert, um unspezifische Wechselwirkungen des Antiserums von den Cytochrom c1-spezifischen unterscheiden zu können (Abb. 3.43).

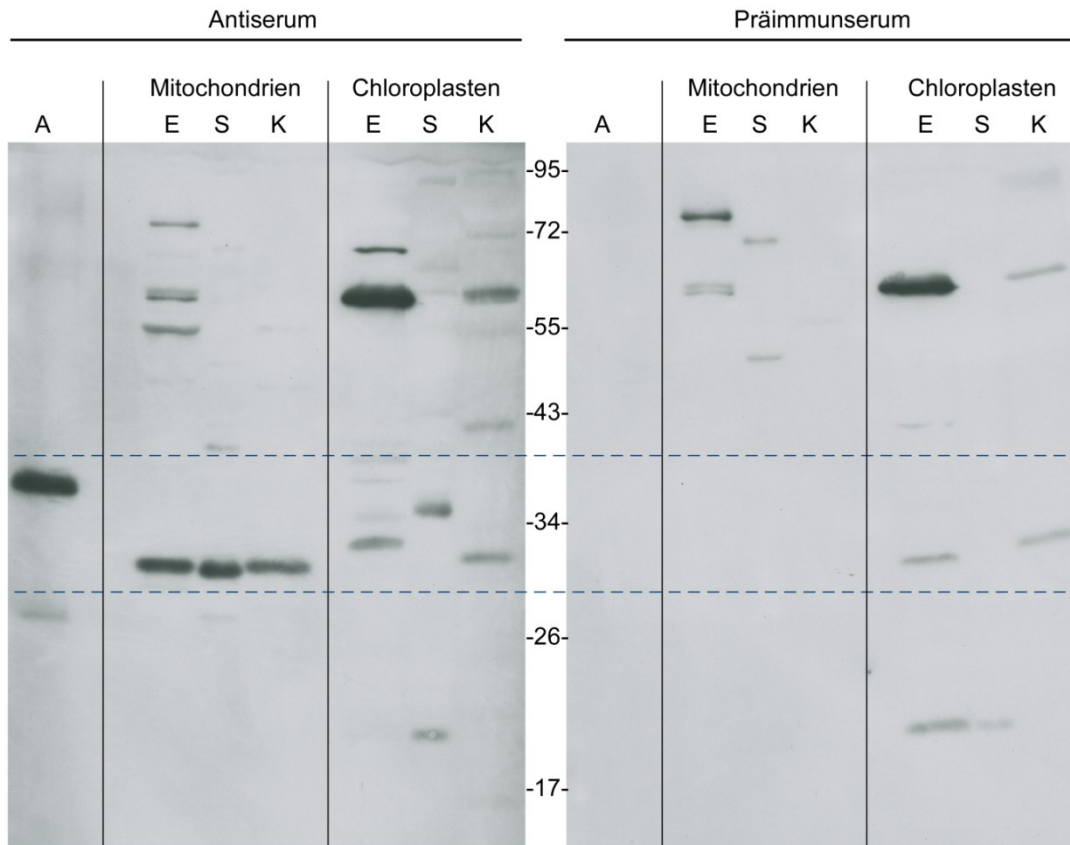


Abb. 3.43: Western-Analyse mit dem Antiserum gegen Cytochrom c1. Detektion mit Präimmunserum (1:1000) und finaler Blutung (1:500) wurden vergleichend durchgeführt. Als Proben wurden Organellen aus Erbse (E), Spinat (S) und Kartoffel (K) aufgetragen. Die aufgetragene Mengen entsprechen 10 µg Protein bei den Mitochondrien und 7,5 µg Chlorophyll bei den Chloroplasten. Zusätzlich wurde das Cytochrom c1 Antigen (A) aufgetragen.

Der Cytochrom c1 Antikörper erkennt das Antigen. In den Mitochondrien aller Pflanzenspezies wird ein Protein detektiert, das in der Größe etwa dem reifen Cytochrom c1 entspricht. Bei den Chloroplasten aus Erbse und Spinat ist jeweils ein deutliches Signal festzustellen, wobei sich die detektierten Proteine jedoch in der Größe unterscheiden. Das Protein in Erbse ist bei ca. 33 kDa, das in Spinat bei ca. 35 kDa zu erkennen. Bei den Chloroplasten aus Kartoffel ist ebenfalls ein Signal zu sehen, das einem Protein von ca. 33 kDa entspricht. Auf etwa derselben Höhe wird aber auch ein Protein durch das Präimmunserum bei Kartoffel detektiert. Es lässt sich also nicht eindeutig sagen, ob dies einem Cytochrom c1 in den Plastiden zuzuordnen ist. Aufgrund der Ergebnisse von Erbse und Spinat kann dies jedoch vermutet werden.

Als Fazit der ersten Analysen lässt sich sagen, dass Cytochrom c1 in Pflanzen nicht nur in den Mitochondrien, sondern wahrscheinlich ebenfalls in den Chloroplasten zu finden ist. Der Cytochrom c1 Antikörper ermöglicht es, nun beispielsweise physiologische Effekte auf die Proteinmenge und Verteilung innerhalb der ganzen Pflanze und in den Organellen zu untersuchen.

3.9 Reporterfusionen von Cytochrom c1

Die bisher gezeigten Transportstudien basieren auf *in vitro* Methoden. Für ein vollständiges Bild des *Targeting*-Verhaltens von Cytochrom c1 waren *in vivo* Studien unabdingbar. Es sollte getestet werden, ob das *dual targeting* von Cytochrom c1 auch *in vivo* nachgewiesen werden kann.

3.9.1 Erstellen der Reporterfusionen

Grundlage für die Detektion von Proteinen innerhalb lebender Zellen bilden detektierbare Reporterproteine. Deshalb wurden Fusionen von Cytochrom c1 mit EYFP als Reporter erzeugt. EYFP wurde gewählt, da es sich, im Gegensatz zu EGFP, in Co-Lokalisierungsexperimenten mit ECFP kombinieren lässt. EGFP kann aufgrund der Lage der Absorptions- und Emissionsmaxima nur in Kombination mit DsRed oder ähnlich fluoreszierenden Proteinen verwendet werden. Diese Proteine emittieren allerdings in einem Wellenlängenbereich, der sich mit dem von Chlorophyll überschneidet, was eine eindeutige Zuordnung von Fluoreszenzsignalen behindert.

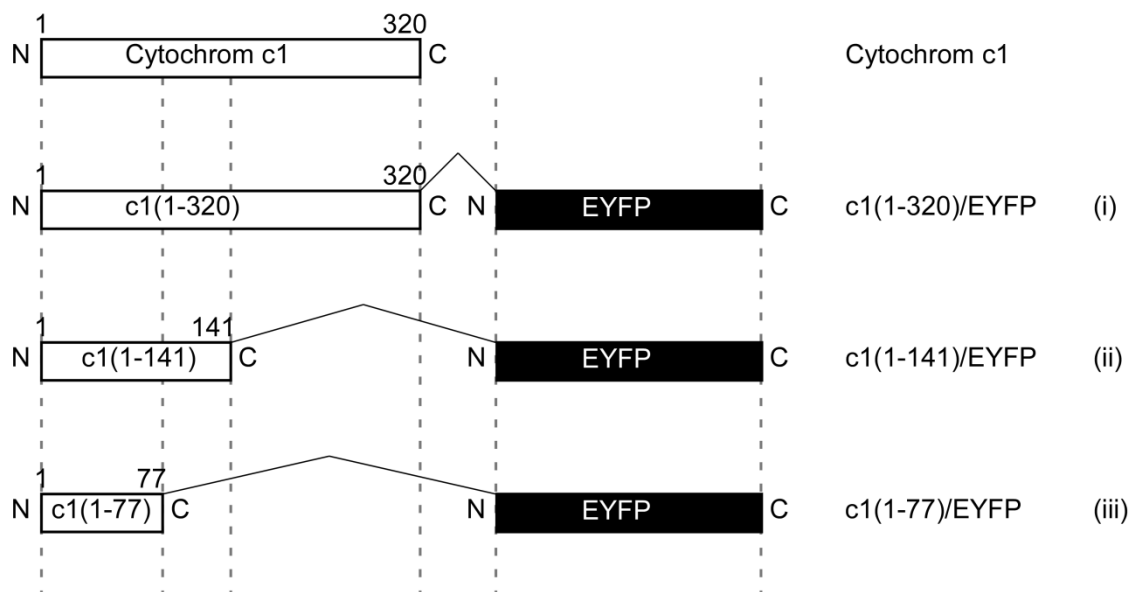


Abb. 3.44: Übersicht der Cytochrom c1/Reporter-Fusionen. Verschiedene Bereiche von Cytochrom c1 wurden mit dem Reporter EYFP fusioniert. Die angegebenen Zahlen beziehen sich auf die entsprechende Aminosäure des authentischen Proteins.

Für die *in vivo* Analyse wurden mehrere Reporterengenkonstruktionen erstellt (Abb. 3.44), die jeweils unterschiedliche Fusionsproteine aus Cytochrom c1 und EYFP codieren. Es ergaben sich drei alternative Fusionen: (i) die Präsequenz allein [c1(1-77)/EYFP], (ii) ein Fragment aus Präsequenz plus 64 Aminosäuren des reifen Proteins [c1(1-141)/EYFP] und (iii) das vollständige Vorläuferprotein [c1(1-320)/EYFP], die jeweils am C-Terminus mit dem Reporterprotein EYFP verknüpft sind. Bei c1(1-141)/EYFP sollten neben dem gesamten Transportsignal auch die Erkennungs- und Schnittstellen für die Prozessierungspeptidasen intakt bleiben. Weiterhin kann über einen Vergleich von Vollängen- und verkürzten Varianten eine Aussage über den Einfluss des reifen Proteins auf den Transport getroffen werden.

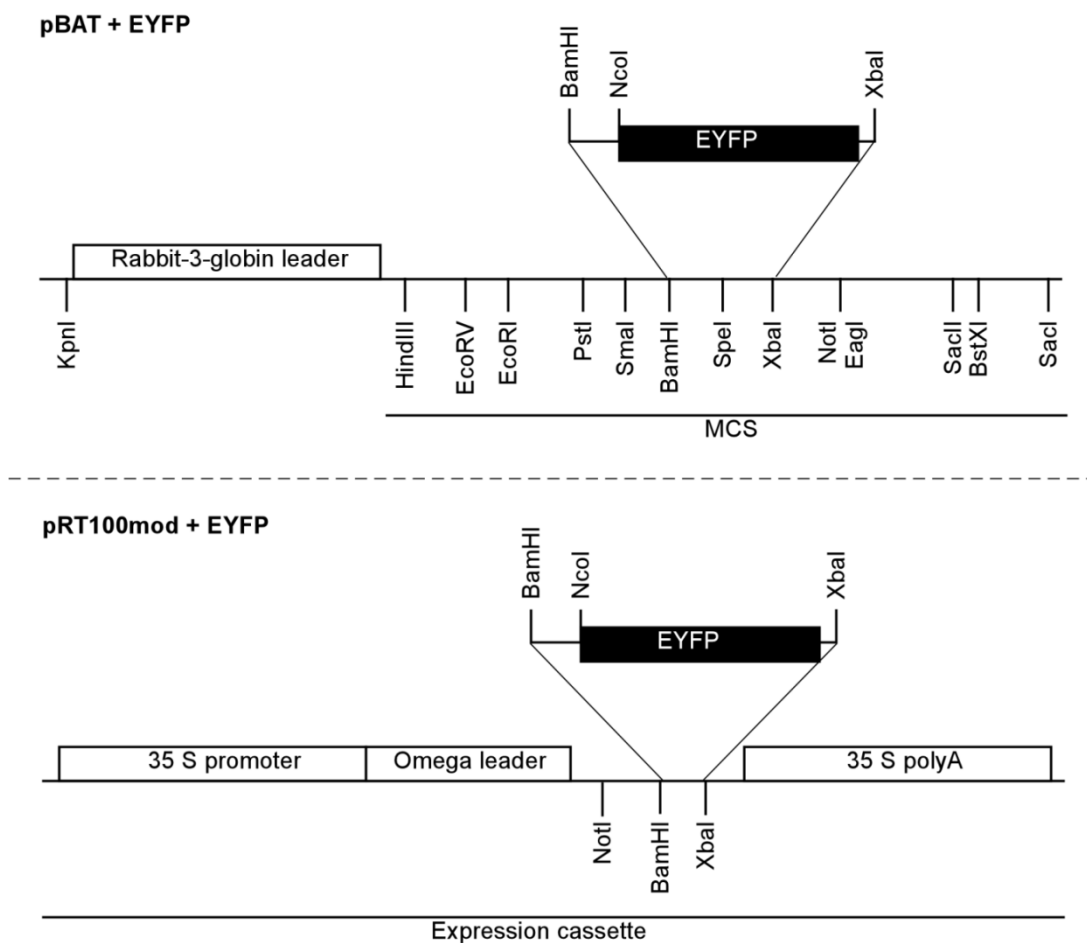


Abb. 3.45: Vektoren mit inseriertem Reporter zur Klonierung der Fusionen. Für die *in vitro* Analyse wurde der für *in vitro* Translationen mittels Retikulocytenlysat optimierte pBAT-Vektor verwendet. Für die *in vivo* Untersuchungen kam der modifizierte pRT100-Vektor zum Einsatz. In beide Vektoren wurde zunächst der Reporter kloniert, um anschließend unterschiedliche Bereiche von Cytochrom c1 über analoge Schnittstellen zu ligieren.

Die entsprechenden Fusionen wurden für die *in vivo* Untersuchungen in einen modifizierten pRT100-Vektor und außerdem für vergleichende *in vitro* Analysen in den pBAT-Vektor kloniert (Abb. 3.45). Im modifizierten pRT100-Vektor werden die Reporterfusionen unter der

Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors des Blumenkohl-Mosaikvirus (CaMV) codiert, wodurch eine Expression in Pflanzenzellen gewährleistet ist. Der pBAT-Vektor ist ein für die Translation mittels Retikulozytenlysat und damit für den Einsatz bei *in vitro* Studien optimierter pBSC-Vektor.

3.9.2 *In vitro* Transportverhalten der Reporterfusionen

Zunächst musste allerdings die Befähigung der Fusionsproteine zum Organelltransport *in vitro* überprüft werden, um auszuschließen, dass der Reporter bzw. das Konstrukt selbst einen Einfluss auf das *Targeting* hat. Die EYFP-Fusionsproteine wurden Standard-*in vitro*-Importexperimenten unterzogen (Abb. 3.46).

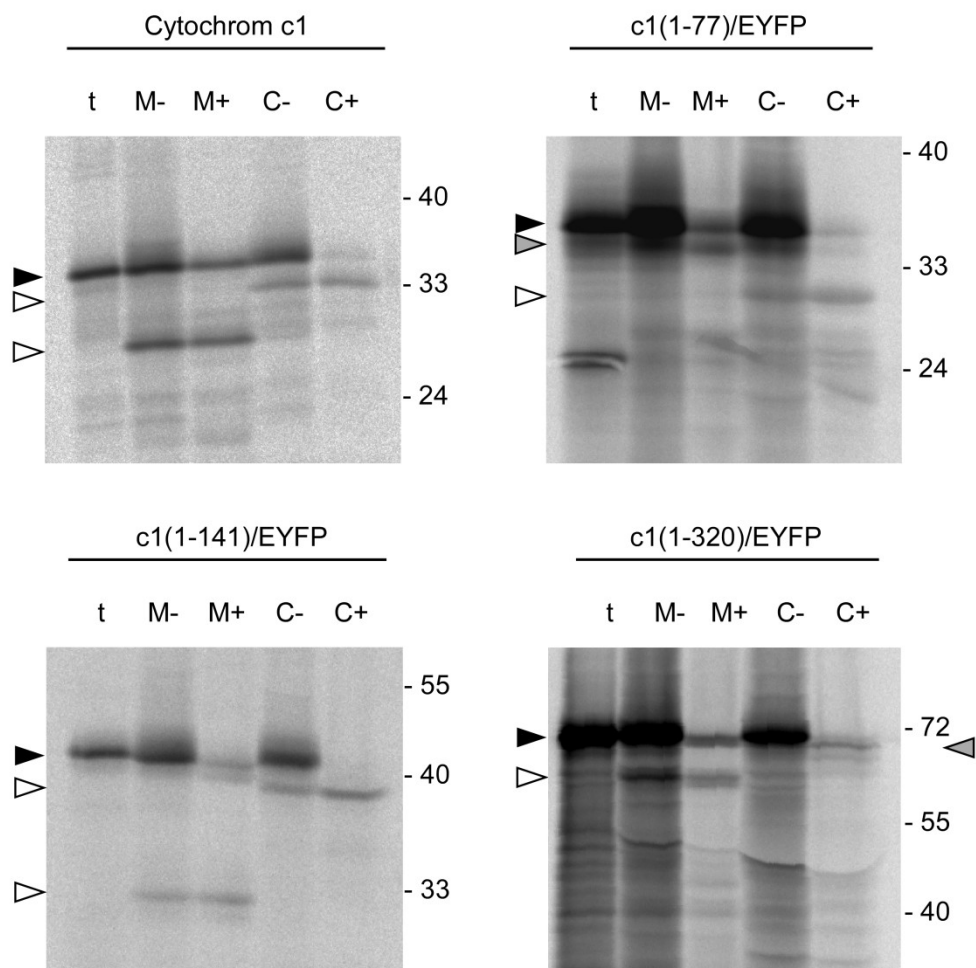


Abb. 3.46: *In vitro* Import der Cytochrom c1-EYFP-Fusionen im Vergleich zum authentischen Cytochrom c1. Die Reporterfusionen wurden für *in vitro* Importe eingesetzt. Als Kontrolle wurde das authentische Cytochrom c1 mitgeführt. Die schwarzen Pfeile markieren die Vorläuferproteine, die weißen Pfeile die Prozessierungsprodukte. Die grauen Pfeile zeigen die Position der nicht eindeutigen Signale. Die Auftragung und Beschriftung entsprechen darüber hinaus Abb. 3.5.

Bei c1(1-77)/EYFP ist im Mitochondrienansatz eine zweite Bande unterhalb des Vorläuferproteins zu erkennen. Dies lässt auf einen möglichen Import der Fusion in die Mitochondrien schließen, wenn auch auf ähnlicher Höhe ein Signal in der Translation zu sehen ist. Eindeutig ist der Import von c1(1-77)/EYFP in die Chloroplasten zu detektieren. Es entsteht ein Prozessierungsprodukt von ca. 30 kDa. Die Fusion c1(1-141)/EYFP wird in beide Organellen transportiert und auch prozessiert. Die entstehenden Prozessierungsprodukte haben eine Größe von ca. 32 kDa in den Mitochondrien und ca. 39 kDa in den Chloroplasten. Die Volllängenfusion [c1(1-320)/EYFP] wird in die Mitochondrien transportiert und dort auch prozessiert. Bei den Chloroplasten lässt sich das nicht so eindeutig feststellen, da der Hintergrund des Autoradiogrammes ungewöhnlich stark ist. Dieser Hintergrund trat bei allen Importexperimenten mit c1(1-320)/EYFP auf. Dennoch ist bei den proteasebehandelten Chloroplasten eine Bande zu erkennen, die kleiner als der Vorläufer ist und nicht dem Prozessierungsprodukt in den Mitochondrien entspricht. Es kann sich hierbei also um in die Chloroplasten importiertes c1(1-320)/EYFP handeln.

Es zeigte sich, dass fast alle Proteine in beide Organellen importiert werden konnten. Allerdings war in Mitochondrien keine Prozessierung von c1(1-77)/EYFP und in Chloroplasten keine Prozessierung von c1(1-320)/EYFP eindeutig nachweisbar, sodass in diesen beiden Fällen der Nachweis des jeweiligen Organellimports noch nicht endgültig erbracht ist. Dennoch zeigt gerade das Ergebnis von c1(1-141)/EYFP, dass das Transportsignal von Cytochrom c1 in der Lage ist, sogar Fremdproteine *in vitro* in beide Organellen zu dirigieren.

3.10 Transiente Expression – *In vivo* Analysen

Für die *in vivo* Analyse des Transportverhaltens der Reporterfusionen wurde die Methode der transienten Transformation eingesetzt (Abb. 3.47). DNA, bestehend aus der Reporterfusion in einem geeigneten Vektor, der eine pflanzliche Expressionskassette enthält, wird an Goldpartikel präzipitiert und dann mittels Heliumdruck in das Zielgewebe geschossen. Dabei wird das Gewebe transient transformiert. Das entstehende Protein kann mittels Fluoreszenzmikroskopie innerhalb der Zellen detektiert werden.

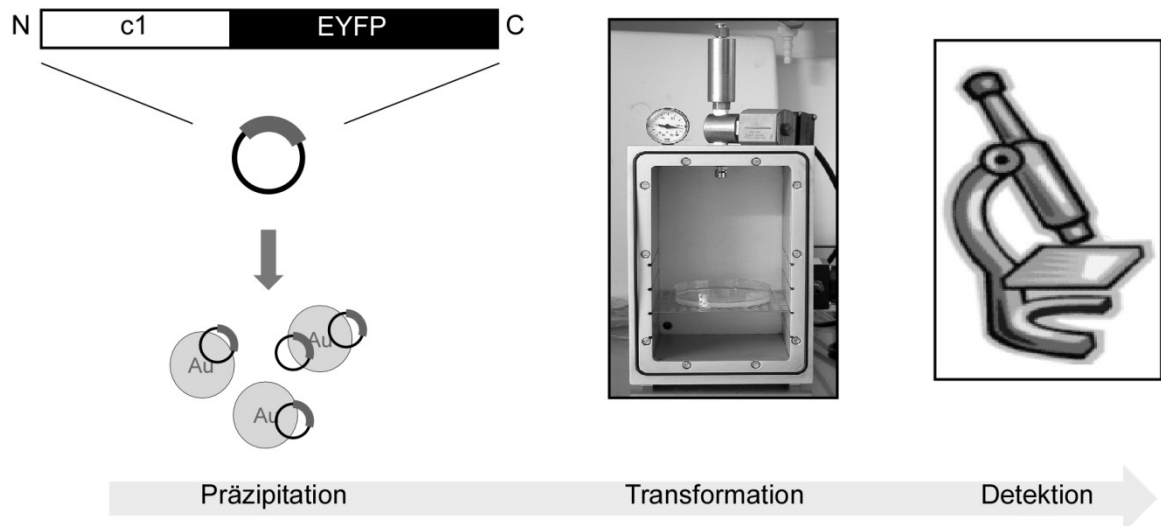


Abb. 3.47: Prinzip der biologischen Transformation. Die Konstrukte im pRT100mod-Vektor werden an Goldpartikel präzipitiert, Blattgewebe wird mittels biologischer Apparatur transformiert und abschließend erfolgt die Detektion transformierter Zellen durch Fluoreszenzmikroskopie.

Bei dem hier verwendeten Testsystem der transienten Transformation konnte das gleiche Pflanzenmaterial wie für die *in vitro* Experimente eingesetzt werden. Es wurden also Zellen der Blattepidermis von Erbse transformiert. Die EYFP-Fluoreszenz wurde über konfokale Mikroskopie visualisiert.

3.10.1 Transformation mit Cytochrom c1/Reporter-Fusionen

Alle drei Reporterfusionen von Cytochrom c1 im pRT100mod-Vektor wurden für die transiente Transformation von Erbsenblättern eingesetzt. Im Folgenden sind die Transformationsergebnisse der verkürzten EYFP-Fusionen c1(1-77)/EYFP (Abb. 3.48) und c1(1-141)/EYFP (Abb. 3.49 und Abb. 3.50), sowie der Vollängenfusion c1(1-320)/EYFP (Abb. 3.51) dargestellt. Dabei sind die EYFP-Fluoreszenz und die Chlorophyllfluoreszenz gezeigt. Die Organellen wurden aufgrund von Größe, Bewegung, Form bzw. Chlorophyllgehalt identifiziert. Mitochondrien sind dabei als zahlreiche kleine bewegliche Punkte oder Stäbchen zu beobachten, deren Form stark variieren kann (Logan and Leaver, 2000). Plastiden lassen sich durch ihre Chlorophyllfluoreszenz erkennen, können jedoch ebenfalls anhand ihrer Größe und Form identifiziert werden (Nelson et al., 2007).

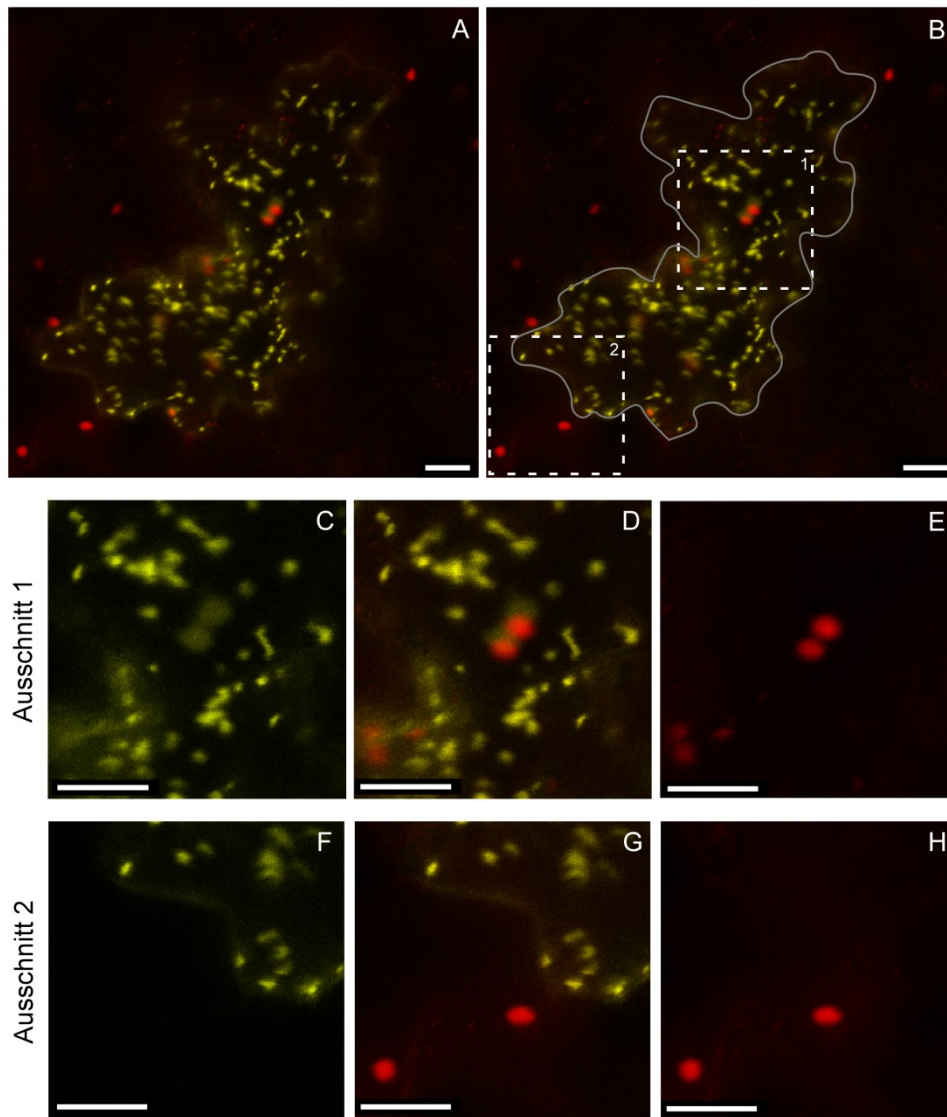


Abb. 3.48: Konfokale LSM – c1(1-77)/EYFP. Die DNA [c1(1-77)/EYFP] wurde für die transiente Transformation von Zellen der Epidermis von Erbsenblättern eingesetzt und mittels konfokalem Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Die transformierte Zelle allein (A), sowie mit eingezeichneter Zellkontur (B) ist in der Übersicht zu sehen. Die Vergrößerungen der in B angezeigten Ausschnitte zeigen die YFP-Fluoreszenz (C, F), die Chlorophyllfluoreszenz (E, H), bzw. die Überlagerungsbilder beider Fluoreszenzen (D, G) aus der transformierten Zelle (C-E; aus Ausschnitt 1) bzw. einer nicht-transformierten Nachbarzelle (F-H; aus Ausschnitt 2). Der Größenbalken entspricht 10 μm .

Bei der Fusion, die ausschließlich das Transportsignal von Cytochrom c1 trägt [c1(1-77)/EYFP], ist die EYFP-Fluoreszenz erwartungsgemäß in den Mitochondrien zu sehen (Abb. 3.48). Außerdem sind weitere Fluoreszenz-Signale in einem anderen Kompartiment zu finden, wenn auch deren Intensität schwächer ist. Diese Signale co-lokalisieren prinzipiell mit der Chlorophyll-Fluoreszenz. Da die Bilder nacheinander aufgenommen werden, kann es wie hier dazu kommen, dass die Fluoreszenzsignale nicht exakt übereinanderliegen. Zwischen den einzelnen Scanvorgängen liegt eine Zeitspanne von ca. 30 Sekunden und in diesem Zeitraum können sich die Plastiden bewegen. Der Grund dafür

ist die auf der Plasmaströmung basierende Organellbewegung. Das zeigt aber auch, dass die Zelle zum Zeitpunkt der Analyse vital war. Betrachtet man die Plastiden der nichttransformierten Nachbarzelle, ist ausschließlich die Chlorophyllfluoreszenz zu sehen, aber keine EYFP-Fluoreszenz. Das EYFP-Signal in den Plastiden der transformierten Zelle ist somit spezifisch auf die Reporterfusion zurückzuführen und resultiert nicht aus einer Autofluoreszenz. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass c1(1-77)/EYFP auch in die Plastiden transportiert wird.

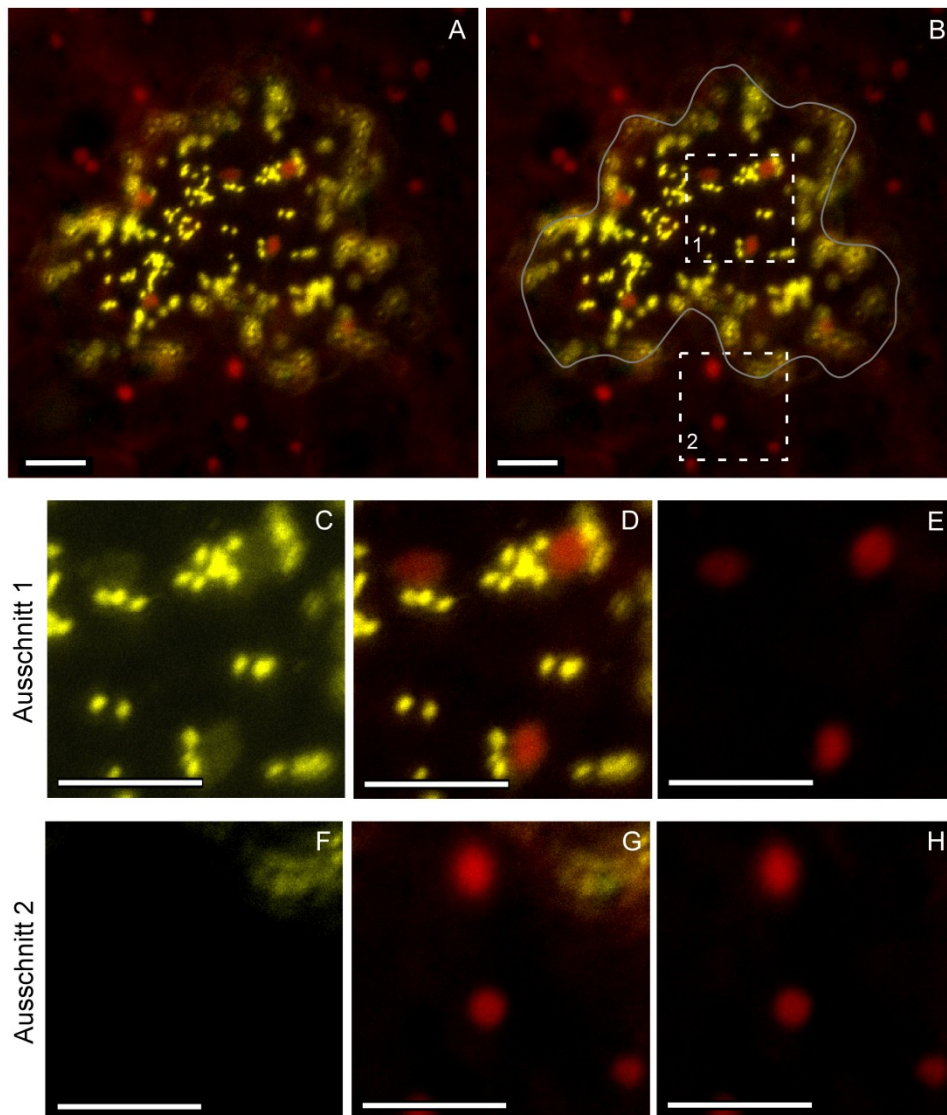


Abb. 3.49: Konfokale LSM – c1(1-141)/EYFP. Die DNA [c1(1-141)/EYFP] wurde für die transiente Transformation von Zellen der Epidermis von Erbsenblättern eingesetzt und mittels konfokalem Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Die transformierte Zelle allein (A), sowie mit eingezeichneter Zellkontur (B) ist in der Übersicht zu sehen. Die Vergrößerungen der in B angezeigten Ausschnitte zeigen die YFP-Fluoreszenz (C, F), die Chlorophyllfluoreszenz (E, H), bzw. die Überlagerungsbilder beider Fluoreszenzen (D, G) aus der transformierten Zelle (C-E; aus Ausschnitt 1) bzw. einer nicht-transformierten Nachbarzelle (F-H; aus Ausschnitt 2). Der Größenbalken entspricht 10 μm .

Die Fusion, die das Transportsignal und einen Teil des reifen Proteins von Cytochrom c1 trägt [c1(1-141)/EYFP], ist nach der Expression ebenfalls in den Mitochondrien zu detektieren (Abb. 3.49). Auch bei diesem Protein ist eine weitere Lokalisierung in den Plastiden festzustellen, was aufgrund der Chlorophyllfluoreszenz an gleicher Stelle gezeigt werden kann.

Bei der mikroskopischen Analyse von c1(1-141)/EYFP fiel eine transformierte Zelle auf (Abb. 3.50). Interessanterweise zeigen die Plastiden hier eine deutlich höhere Intensität der EYFP-Fluoreszenz als die Mitochondrien. Es handelt sich hier durchaus um einen Sonderfall, der nur vereinzelt beobachtet wurde. Dennoch zeigt dieser, dass die relative Verteilung des Fusionsproteins zwischen den Organellen nicht in jedem Fall gleich ist. Vorwiegend war bei den mit c1(1-141)/EYFP transformierten Zellen die Fluoreszenzintensität der mitochondriellen Signale aber erkennbar höher als die der Plastiden.

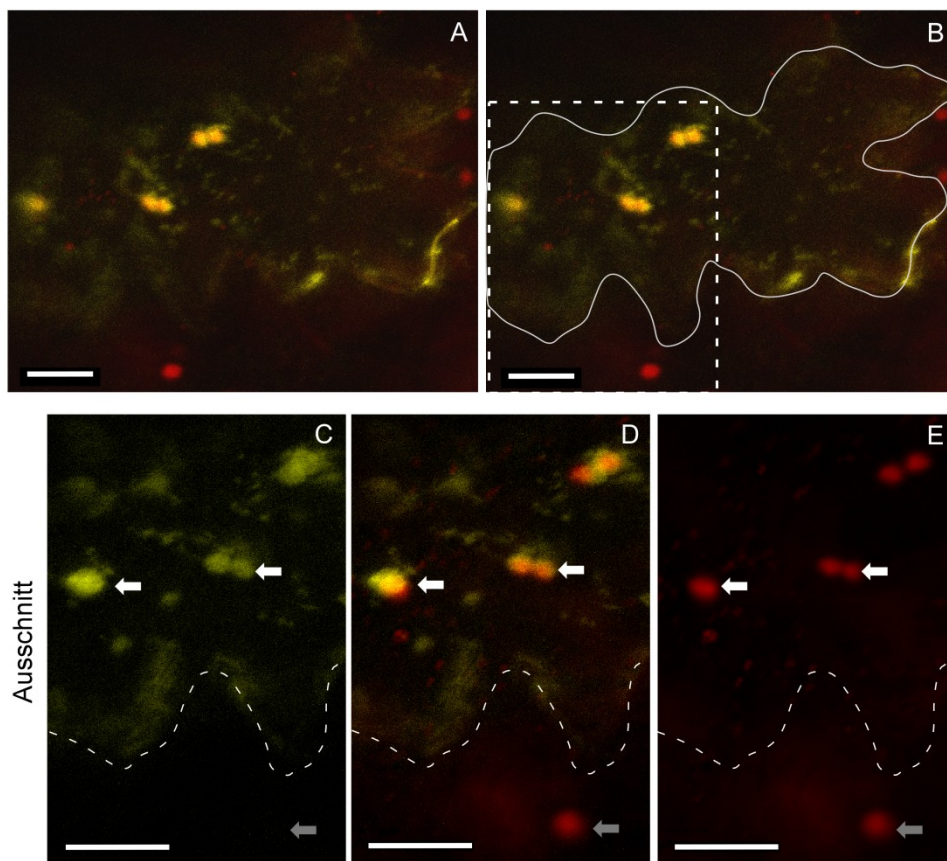


Abb. 3.50: Konfokale LSM – c1(1-141)/EYFP. Sonderfall der Verteilung der Signalintensitäten zwischen Mitochondrien und Plastiden. Die transformierte Zelle allein (A), sowie mit eingezeichneter Zellkontur (B) ist in der Übersicht zu sehen. Die Vergrößerungen des angezeigten Ausschnittes zeigen die YFP-Fluoreszenz (C), die Chlorophyllfluoreszenz (E) bzw. das Überlagerungsbild beider Fluoreszenzen (D). Die Pfeile markieren Plastiden in der transformierten Zelle (weiß) bzw. in der nicht-transformierten Nachbarzelle (grau). Der Größenbalken entspricht 10 µm.

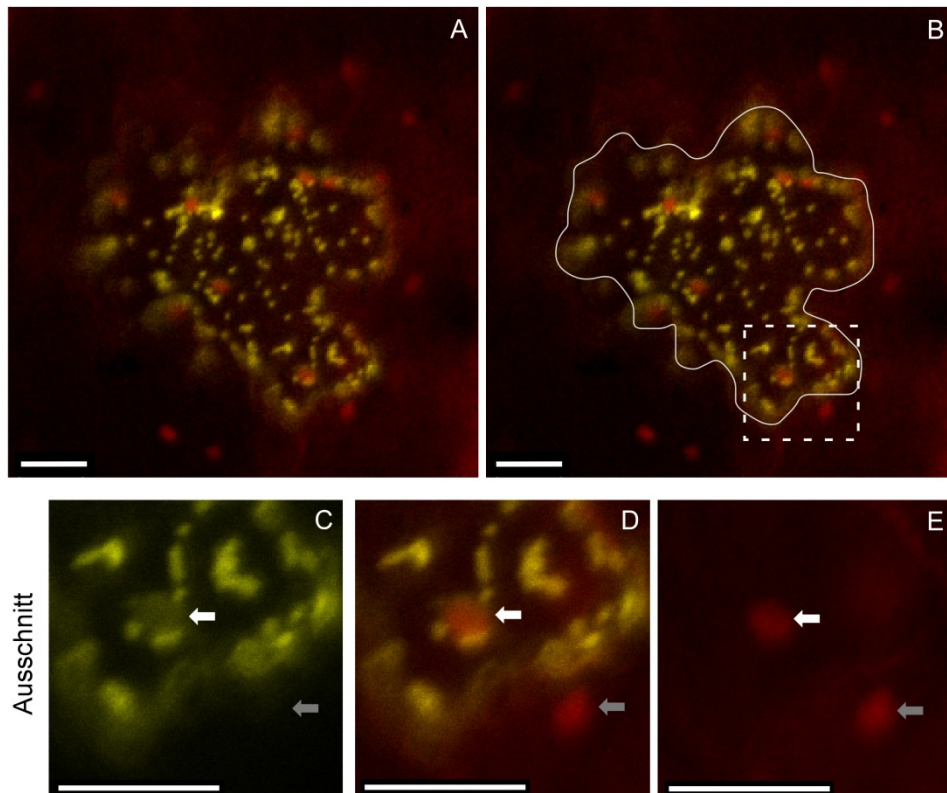


Abb. 3.51: Konfokale LSM – c1(1-320)/EYFP. Die DNA [c1(1-320)/EYFP] wurde für die transiente Transformation von Zellen der Epidermis von Erbsenblättern eingesetzt und mittels konfokalem Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Die transformierte Zelle allein (A), sowie mit eingezeichneter Zellkontur (B) ist in der Übersicht zu sehen. Die Vergrößerungen des angezeigten Ausschnittes zeigen die YFP-Fluoreszenz (C), die Chlorophyllfluoreszenz (E) bzw. das Überlagerungsbild beider Fluoreszenzen (D). Die Pfeile markieren Plastiden in der transformierten Zelle (weiß) bzw. in der nicht-transformierten Nachbarzelle (grau). Der Größenbalken entspricht 10 μ m.

Die Vollängenfusion [c1(1-320)/EYFP] unterscheidet sich bei der Lokalisierung grundsätzlich nicht von den verkürzten EYFP-Fusionen. Auch hier sind sowohl die Mitochondrien als auch die Plastiden durch das EYFP markiert (Abb. 3.51). Im Vergleich zu den beiden anderen Fusionen fällt allerdings auf, dass deutlich weniger transformierte Zellen zu finden waren. Außerdem war das EYFP-Signal schwächer und die Fluoreszenz bleichte deutlich schneller aus (verstärktes *photo bleaching*), was die Analyse erschwerte. Dies könnte ein Hinweis auf eine verminderte Stabilität dieser Fusion oder eine geringere Expressionsrate in der Zelle sein. Die Signale selbst bestätigen jedoch, dass c1(1-320)/EYFP wie schon c1(1-77)/EYFP und c1(1-141)/EYFP eine Lokalisierung sowohl in Mitochondrien als auch in Plastiden zeigt.

Im Ergebnis zeigen die Experimente die *dual targeting* Eigenschaften der drei Cytochrom c1-Fusionen c1(1-77)/EYFP, c1(1-141)/EYFP und c1(1-320)/EYFP. Alle drei Reporterfusionen von Cytochrom c1 werden *in vivo* sowohl in die Mitochondrien als auch in die Plastiden transportiert. Die Ergebnisse dieser *in vivo* Studien zeigen außerdem, dass

die ersten 77 Aminosäuren, also die mitochondrielle Präsequenz von Cytochrom c1 allein, ausreichen, um ein für die Zelle fremdes Protein, hier den Reporter EYFP, in die Organellen zu dirigieren.

3.10.2 Co-Transformation mit FNR/ECFP

Die Chlorophyllfluoreszenz repräsentiert nicht das komplette Stroma-Kompartiment der Plastiden. Daher wurde für eine Bestätigung der stromalen Lokalisierung das Konstrukt c1(1-77)/EYFP mit dem Plastidenmarker FNR/ECFP co-transformiert (Abb. 3.52). Die FNR ist ein stromales Protein und kann als Reporterfusion im Plastidenstroma detektiert werden (Marques et al., 2004).

Die Mitochondrien der co-transformierten Zelle zeigen ausschließlich EYFP-Fluoreszenz, während die Plastiden zusätzlich Chlorophyll und ECFP enthalten. FNR/ECFP und c1(1-77)/EYFP sind demnach beide in das Stroma der Plastiden transportiert worden.

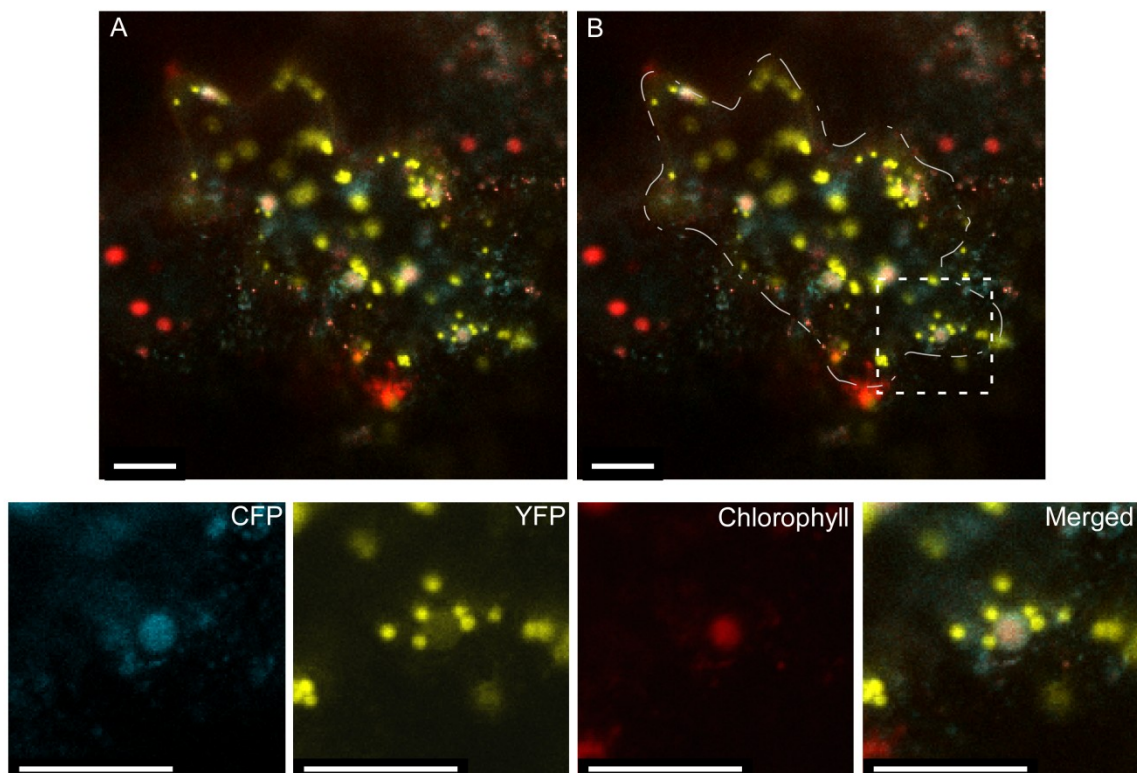


Abb. 3.52: Konfokale LSM – Co-Transformation mit c1(1-77)/EYFP und FNR/ECFP. Die co-transformierte Zelle allein (A), sowie mit eingezeichneter Zellkontur (B) ist in der Übersicht zu sehen. Die Vergrößerungen des angezeigten Ausschnittes zeigen die Fluoreszenzen von CFP, YFP und Chlorophyll, sowie das Überlagerungsbild der Fluoreszenzen (*Merged*). Der Größenbalken entspricht 10 μ m.

Auch die Fusion c1(1-141)/EYFP wurde mit FNR/ECFP co-transformiert, was zum gleichen Ergebnis führte. Hier konnte außerdem in einer transformierten Zelle ein Plastid mit einem Stromulus (*stroma filled tubulus*; Hanson and Sattarzadeh, 2008) beobachtet werden, der sowohl EYFP- als auch ECFP-Fluoreszenz zeigt (nicht gezeigt). Wenn die Reporterfluoreszenz in Stromuli detektierbar ist, kann eine Lokalisierung im Stroma vorausgesetzt werden.

Aufgrund der Co-Lokalisierung mit FNR/ECFP kann demnach auf eine stromale Lokalisierung der Cytochrom c1-Fusionen geschlossen werden.

3.10.3 *In vivo* Zeitreihe

Die *in vitro* Experimente haben gezeigt, dass Cytochrom c1 eine vergleichbare Kinetik für den Mitochondrien- bzw. Chloroplastenimport zeigt. Dies sollte auch *in vivo* analysiert werden. Dazu wurde Erbsenblattgewebe mit c1(1-77)/EYFP transient transformiert und die Expression der Reporterfusion in Abhängigkeit von der Zeit nach der Transformation überprüft (Abb. 3.53).

Nach ca. vier Stunden lassen sich erste transformierte Zellen detektieren. Die EYFP-Fluoreszenz zeigt sich verstärkt im Cytosol. Diese cytosolische Lokalisierung ist zu späteren Zeitpunkten in geringerem Maße festzustellen. Nach ca. zwölf Stunden ist die Fluoreszenz im Cytosol im Vergleich zu den EYFP-markierten Organellen nur noch schwach zu sehen. Zusätzlich sind aber bei allen Zeitpunkten auch Organellen markiert, bei denen es sich sowohl um die Mitochondrien als auch die Plastiden handelt. Die Fusion c1(1-77)/EYFP wird demnach nicht zeitversetzt, sondern gleichzeitig in beide Organellen transportiert.

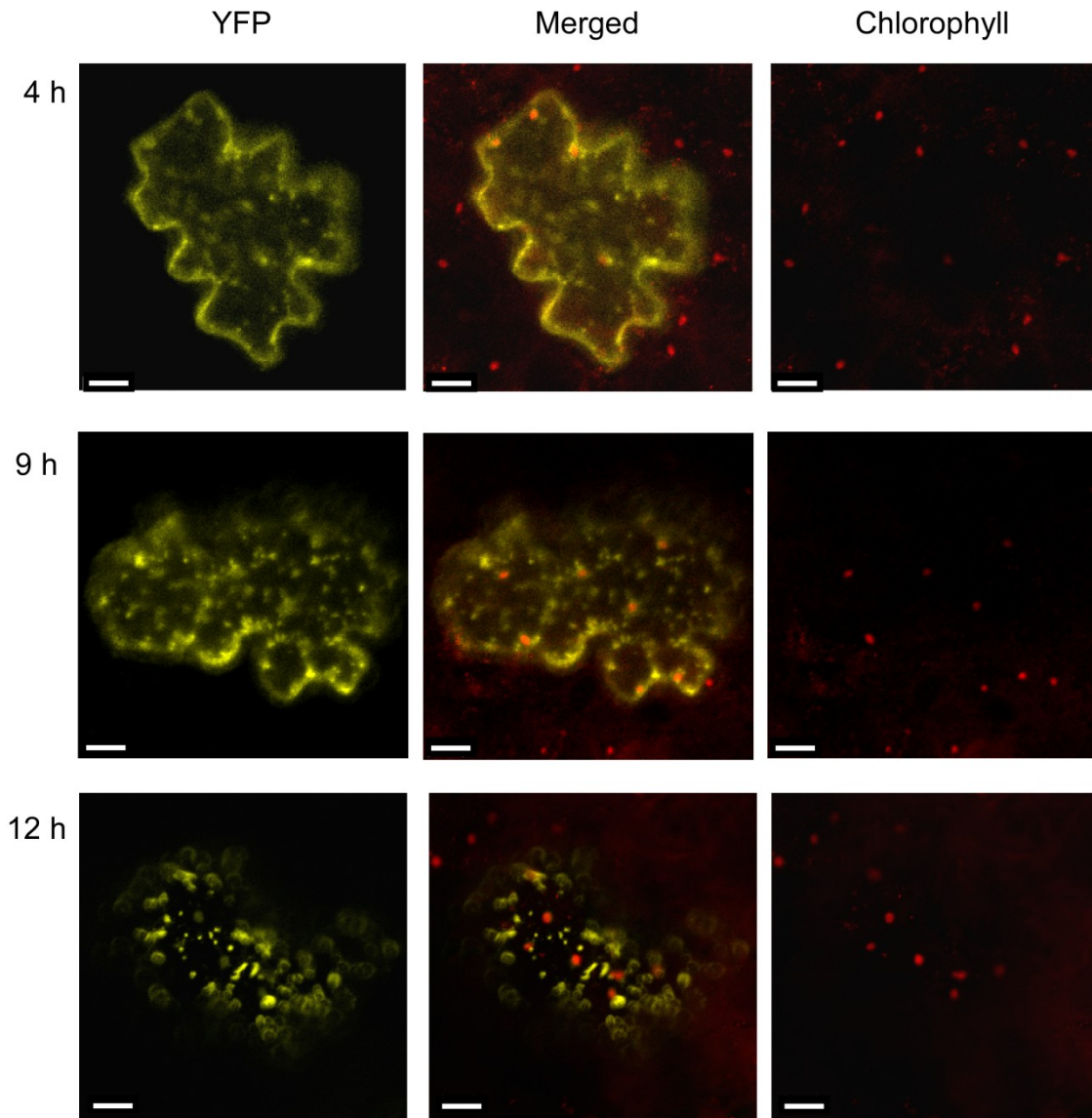


Abb. 3.53: *In vivo* Zeitreihe von c1(1-77)/EYFP. Verteilung der Fluoreszenzsignale in Abhängigkeit von der Zeit. Mikroskopische Analysen wurden 4 h, 9 h und 12 h nach dem biolistischen Beschuss der Erbsenblätter durchgeführt. Der Größenbalken entspricht 10 μm .

Zusammenfassend haben die Analysen der Reporterfusionen gezeigt, dass die Präsequenz von Cytochrom c1 im Stande ist, EYFP *in vitro* sowohl in die Mitochondrien als auch in die Plastiden zu dirigieren. Die Fusionsproteine zeigen wie schon das authentische Cytochrom c1 *dual targeting* Eigenschaften. Diese Fähigkeit konnte schließlich auch in den komplementierenden *in vivo* Untersuchungen bestätigt werden. Es wurde gezeigt, dass sich das gelb fluoreszierende Protein nach biolistischer Transformation von Erbsenblättern sowohl in den Mitochondrien als auch in den Plastiden der transgenen Zellen findet, d.h. das Transportsignal von Cytochrom c1 ist offensichtlich in der Lage, mit den Proteintransportmaschinerien beider endosymbiontischer Organellen zu interagieren und

den Transport des anhängenden Passagierproteins auch *in vivo* in beide Organellen zu vermitteln. Das beweist, dass das für das authentische Cytochrom c1 beobachtete Transportverhalten in den *in vitro* Ansätzen keine Eigenart des Versuchsansatzes ist, sondern nur die tatsächlichen Fähigkeiten dieses Proteins bzw. seines Transportsignals widerspiegelt.

4 DISKUSSION

4.1 Experimenteller Ansatz

4.1.1 Mitochondrien und Chloroplasten können aus einem Ansatz präpariert werden

Das Ziel war zunächst, ein Protokoll für die gemeinsame Präparation von Mitochondrien und Chloroplasten aus ein und demselben Gewebe zu entwickeln. Diese Herangehensweise gründet sich auf der Beobachtung, dass sich Organellen, in Abhängigkeit von ihrem physiologischen Hintergrund, teilweise unterschiedlich verhalten. Ein typisches Beispiel betrifft die Effizienz des Proteinimports, die mit steigendem Alter des verwendeten Pflanzenmaterials beträchtlich variieren kann (Dahlin and Cline, 1991; Murcha et al., 1999). Dies kann zu schwerwiegenden Fehlinterpretationen führen, insbesondere dann, wenn Eigenschaften unterschiedlicher Organellen verglichen werden. Bislang wurden die Importe in Mitochondrien und Plastiden zudem oft mit Organellen aus unterschiedlichen Pflanzenspezies durchgeführt (Menand et al., 1998; Chew et al., 2003a; Duchêne et al., 2005). Vergleicht man solche Importe miteinander, besteht die Möglichkeit, dass die verschiedenen Pflanzen einen Unterschied im Transportverhalten zeigen.

Ein weiterer Vorteil eines einzelnen Homogenats als Startmaterial bei der Isolierung der Organellen bezieht sich auf mögliche Präparationsartefakte. So sollten sich Abbauprozesse oder die proteolytische Degradation der Komponenten der Hüllmembranen bei einer gemeinsamen Präparation in vergleichbarem Ausmaß auf die Organellen auswirken.

Die Methode zur gemeinsamen Präparation von Mitochondrien und Chloroplasten wurde zunächst für Organellen aus Erbsenkeimlingen entwickelt, da dieses Gewebe eine verbreitete Quelle für Organellen ist, die für Proteintransportstudien eingesetzt werden. Die Identität und Reinheit der präparierten Organellen konnte mittels Mikroskopie und Western Analyse bestätigt werden. Die *in vitro* Importkompetenz wurde zudem mit verschiedenen Vorläuferproteinen gezeigt (Abb. 3.5, S. 61).

Das Protokoll konnte erfolgreich für Mitochondrien und Chloroplasten aus Kartoffel und, mit einigen Modifizierungen, aus Spinat angewandt werden. Diese beiden Pflanzen sind ebenfalls gängige Materialien für die Präparation von Organellen. Grundsätzlich lässt sich annehmen, dass die Methode für viele Pflanzenspezies adaptiert werden kann.

4.1.2 *In vitro* und *in vivo* Analysen sollten komplementierend durchgeführt werden

In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass es bei Mitochondrien zu einem Fehltransport (*mis-targeting*) chloroplastidärer Vorläuferproteine im *in vitro* Import kommen kann (Lister et al., 2001; Cleary et al., 2002). Im gemischten Importansatz, wie er von Rudhe et al., 2002a publiziert worden ist, kann dieser Fehltransport verhindert werden. Dies wurde beispielsweise für die SSU aus *Pisum sativum* gezeigt. Dieses plastidäre Vorläuferprotein wird importiert, wenn ausschließlich Mitochondrien im *in vitro* Import angeboten werden. Im gemischten Importansatz wird es dagegen nur noch in die Chloroplasten transportiert. Der gemischte Importansatz stellt also die Konkurrenzsituation zwischen Mitochondrien und Chloroplasten nach, wie sie auch innerhalb der Pflanzenzelle existiert. Dadurch kann ein Fehltransport von Proteinen verhindert werden. Duale Proteine, wie beispielsweise die Glutathionreduktase aus *Pisum sativum*, werden unter denselben experimentellen Bedingungen in beide Organellen importiert. Das verminderte *mis-targeting* im gemischten Importansatz ist demnach nicht darauf zurückzuführen, dass Chloroplasten Vorläuferproteine generell schneller importieren als Mitochondrien, sondern auf eine höhere Spezifität.

Um eine Aussage darüber treffen zu können, wie gut diese *in vitro* Methode die *in vivo* Situation repräsentiert, wurde das Mengenverhältnis der Organellen bestimmt (Abb. 3.8, S. 65). Es zeigte sich, dass das Organellverhältnis im Importansatz relativ gut mit dem in der Zelle übereinstimmt. Der *in vitro* Ansatz ist insofern mit der *in vivo* Situation vergleichbar.

Das Transportverhalten von Proteinen kann sowohl mit *in vitro* als auch mit *in vivo* Ansätzen untersucht werden. Beide Prinzipien haben Vor- und Nachteile. Bei *in vitro* Analysen wird mit isolierten Organellen gearbeitet. Im *in vivo* Ansatz besteht ein intaktes zelluläres System, dennoch unterliegt es einigen Limitierungen. Fusionsproteine sind notwendig, die aus dem zu analysierenden Polypeptid und einem Reporter bestehen, der *in vivo* detektiert werden kann. Es ist jedoch möglich, dass der Reporter als Passagier das Transportverhalten beeinflusst (Chew et al., 2003b). Zudem kann der reife Teil eines Proteins eine Rolle beim *targeting* spielen (Rudhe et al., 2002a). Außerdem ist die Expressionsrate der Fusionsproteine innerhalb der Pflanzenzelle variabel und kann nur bedingt beeinflusst werden, was Auswirkungen auf die Interpretation der Ergebnisse haben kann.

Obwohl im *in vitro* Ansatz die Möglichkeit von *mis-targeting* besteht, hat dieser Ansatz auch Vorzüge gegenüber der *in vivo* Analyse. Es können die authentischen Proteine und damit auch ein möglicher Einfluss des reifen Teils des Proteins analysiert werden. Die experimentellen Bedingungen sind sehr gut modifizierbar, sodass der

Transportmechanismus detailliert untersucht werden kann. Im Gegensatz dazu sind im *in vivo* Ansatz die Bedingungen von außen nur schwer gezielt zu verändern.

Die *in vivo* Lokalisierungsstudien ermöglichen jedoch die Analyse des Transportverhaltens in intakten Zellen, insbesondere wird auch der Einfluss des Cytosols untersucht. Es ist möglich, dass das Cytosol bzw. cytosolische Faktoren für ein korrektes *targeting* benötigt werden. Im Cytosol können Proteine oder Proteinkomplexe an der Spezifität des Organelltransports beteiligt sein. So wurde beispielsweise der sogenannte *guidance*-Komplex nachgewiesen, welcher einen effizienten Plastidenimport der SSU bewirkt (May and Soll, 2000). Die Organellespezifität von Vorläuferproteinen könnte von diesem Komplex oder anderen noch unbekanntem cytosolischen Faktoren abhängig sein.

Weiterhin kann sich bereits der Transport der Fusionsproteine von dem der authentischen Proteine unterscheiden (Rudhe et al., 2002a; Chew et al., 2003b). Daher ist es notwendig, auch den *in vitro* Import der Fusionsproteine zu analysieren.

Für eine umfassende Analyse des Transportverhaltens kerncodierter Proteine hat es sich als sinnvoll erwiesen, grundsätzlich die *in vitro* Experimente und *in vivo* Analysen komplementierend durchzuführen. Diese Herangehensweise kann falsch positive bzw. falsch negative Resultate minimieren. Für das Protein Cytochrom c1 hat sich gezeigt, dass der *in vitro* Import, einschließlich entsprechender Kontrollen, die *in vivo* Situation sehr gut repräsentiert.

4.2 Mitochondrieller Import von Cytochrom c1 aus *Solanum tuberosum*

Cytochrom c1 aus *Solanum tuberosum* wurde durch die Isolierung des mitochondrialen Cytochrom bc1-Komplexes nachgewiesen (Berry et al., 1991; Braun et al., 1992). Importanalysen wurden mit diesem Protein bisher nicht durchgeführt. Daten zum Transportverhalten von Cytochrom c1 stammen aus Analysen dieses Proteins aus anderen Organismen, in erster Linie *Saccharomyces cerevisiae* und *Neurospora crassa* (Gasser et al., 1982; van Loon and Schatz, 1987; Arnold et al., 1998; Nicholson et al., 1989; Römisch et al., 1987).

Die Importanalysen dieser Arbeit haben gezeigt, dass Cytochrom c1 aus *Solanum tuberosum* in Pflanzenmitochondrien importiert und dort auch zum reifen Protein prozessiert wird. In allen Experimenten war nur ein Prozessierungsprodukt zu detektieren. Für *Saccharomyces cerevisiae* und *Neurospora crassa* wurde hingegen beschrieben, dass die Prozessierung von Cytochrom c1 in zwei Schritten stattfindet. Dabei wird zunächst ein Intermediat gebildet, das anschließend zum reifen Protein prozessiert wird (Ohashi et al.,

1982; Hartl et al., 1987). Außerdem konnte gezeigt werden, dass gereinigte MPP das Vorläuferprotein aus *Neurospora crassa* zum Intermediat spaltet (Hawlitshchek et al., 1988). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen für das Cytochrom c1 aus *Solanum tuberosum*, dass neben dem reifen Protein keine weiteren Prozessierungsprodukte in den Mitochondrien entstehen. Falls während der Prozessierung von Cytochrom c1 aus *Solanum tuberosum* ein Transportintermediat auftritt, kann es entweder nicht vom Vorläuferprotein oder dem reifen Protein durch die elektrophoretische Auftrennung im verwendeten Gelsystem unterschieden werden. Alternativ ist es ebenso möglich, dass das Intermediat sehr schnell zum reifen Protein umgesetzt wird. Das Vorläuferprotein könnte aber auch ohne die Bildung eines Intermediats zum reifen Protein prozessiert werden. Bei Importanalysen für das Cytochrom c1 aus Säugern konnte ebenfalls kein solches Intermediat festgestellt werden (Kolarov and Nelson, 1984; Tanaka-Yamamoto et al., 1990).

Es ist bekannt, dass der Einsatz von Valinomycin zu einer Inhibierung des mitochondrialen Importes von Proteinen führt. Daher wird dieses Ionophor zur Bestätigung eines möglichen Importes in die Mitochondrien eingesetzt (Menand et al., 1998, Cleary et al., 2002, Duchêne et al., 2005). Die Zugabe von Valinomycin zum Importansatz führte zu einer erheblichen Verringerung des Mitochondrientransports von Cytochrom c1 (Abschnitt 2.4.9.3). Das Protein zeigt die für den Import mitochondrialer Vorläuferproteine typische Sensitivität gegenüber dem Ionophor. Cytochrom c1 wird also abhängig vom Membranpotential der inneren mitochondrialen Membran transportiert.

4.3 Cytochrom c1 wird ebenfalls in die Chloroplasten importiert

4.3.1 Der plastidäre Import basiert nicht auf *mis-targeting*

Cytochrom c1 wird *in vitro* nicht nur in die Mitochondrien, sondern auch in die Chloroplasten importiert. Eine Möglichkeit wäre, dass in der Chloroplastenpräparation Mitochondrien vorlagen, die diesen Import ermöglichen. Anhand der durchgeführten Western Analysen kann das aber ausgeschlossen werden (Abb. 3.3, S. 58). Die Erbsenmitochondrien enthielten keine Kontaminationen mit intakten Chloroplasten. Das Prozessierungsprodukt in den Chloroplasten ist zudem größer als das reife Protein in den Mitochondrien. Diese Prozessierung kann also nicht auf mitochondrielle Peptidasen zurückzuführen sein, da das Produkt dann auch in den Mitochondrien detektierbar sein müsste. Folglich zeigt Cytochrom c1 einen Import in isolierte Chloroplasten. Auch in Gegenwart von Mitochondrien lässt sich dieser plastidäre Import feststellen. Der gemischte Importansatz

zeigt keine Veränderungen im Transportverhalten von Cytochrom c1 in die Organellen (Abb. 3.9, S. 66). Der Import in die Chloroplasten ist demnach kein Fehltransport, der auf eine mangelnde Spezifität der Organellen in den Einzelimporten zurückzuführen wäre.

Organellen aus verschiedenen Pflanzenspezies können Unterschiede im Transportverhalten von Vorläuferproteinen bedingen. So wurde beispielsweise die plastidäre Ferrochelatase-I aus *Arabidopsis thaliana* auf Basis von *in vitro* Importen in isolierte Mitochondrien aus Erbse als duales Protein identifiziert (Chow et al., 1997). Allerdings wird dieses Protein nicht in Mitochondrien aus *Arabidopsis thaliana* oder anderen Pflanzen importiert (Lister et al., 2001).

Der *in vitro* Import von Cytochrom c1 in Mitochondrien und Plastiden ist nicht nur auf Erbse beschränkt, sondern kann ebenfalls für Organellen aus Spinat beobachtet werden (Abb. 3.34, S. 90). Der Transport in Organellen verschiedener Pflanzenspezies spricht gegen ein *in vitro mis-targeting* von Cytochrom c1.

4.3.2 Cytochrom c1 verhält sich wie ein authentisches plastidäres Protein

Aufgrund der Komplexität des Proteintransportes innerhalb der Zelle sind Fehler denkbar, die in der Fehlsortierung eines Proteins resultieren würden. Es wird angenommen, dass der Transport eines Proteins in ein falsches Kompartiment zum Abbau dieses Proteins führt. Dies konnte für das thylakoidäre Protein OEC33 gezeigt werden. Eine absichtliche Fehlsortierung von OEC33 ins Stroma bewirkt die rasche Degradation dieses Proteins (Halperin and Adam, 1996). Dafür wurde in diesen Studien das Transportsignal des OEC33 ersetzt, sodass ein Transport ins Stroma erfolgt. Während das authentische OEC33 nach dem *in vitro* Import in isolierte Chloroplasten in den Thylakoiden für mindestens zwei Stunden stabil bleibt, hat das chimäre Protein im Stroma eine Halbwertszeit von 60 Minuten.

Die Stabilität des importierten Cytochrom c1 innerhalb der Chloroplasten wurde untersucht (Abschnitt 3.7.2). Es zeigte sich, dass Cytochrom c1 eine ähnliche Stabilität wie die stromale FNR aufweist. Beide Proteine sind über zwei Stunden in vergleichbarem Maße stabil in den Chloroplasten. Demnach wird Cytochrom c1 in den Chloroplasten nicht als falsch erkannt und abgebaut.

Der chloroplastidäre Import von Cytochrom c1 wurde daraufhin analysiert, ob er dem authentischer plastidärer Vorläuferproteine entspricht. Der Effekt von Valinomycin und Nigericin auf den *in vitro* Import von Cytochrom c1 wurde daher untersucht (Abschnitt

3.4.1). Nigericin bewirkt eine Hemmung des plastidären Importes (Mould and Robinson, 1991; Chow et al., 1997). Für den Import von Cytochrom c1 in die Chloroplasten konnte diese Hemmung gezeigt werden, wie sie für authentische plastidäre Proteine typisch ist. Valinomycin hatte erwartungsgemäß kaum einen Einfluss auf den Import in die Chloroplasten. Diese Experimente zeigen, dass der plastidäre Transport von Cytochrom c1 in Abhängigkeit von internem ATP in den Chloroplasten stattfindet.

Um den Importweg von Cytochrom c1 in die Chloroplasten genauer zu analysieren, wurden *in vitro* Importe in Gegenwart von überexprimierten plastidären Proteinen durchgeführt (Abschnitt 3.6). Diese Konkurrenzexperimente zeigen, dass mit zunehmender Konzentration von OEC33 der Import von *in vitro* translatierten Vorläuferproteinen in die Chloroplasten immer stärker blockiert wird. Dies konnte sowohl für Cytochrom c1, als auch für die authentischen plastidären Kontrollproteine OEC23 und FNR beobachtet werden. Der Einsatz von überexprimierter FNR bestätigt die Ergebnisse. Auch dieses Kompetitorprotein beeinflusst den plastidären Import von Cytochrom c1. Der Import von Cytochrom c1 in die Mitochondrien bleibt dagegen stabil. Der plastidäre Kompetitor hat also keinen Einfluss auf den mitochondriellen Import. Überexprimiertes Cytochrom c1 kann allerdings *in vitro* sowohl mit dem mitochondriellen als auch dem chloroplastidären Import von *in vitro* translatiertem Cytochrom c1 konkurrieren. Der Vergleich der Konkurrenzexperimente lässt annehmen, dass der plastidäre Import von Cytochrom c1 bereits bei niedrigeren Kompetitorkonzentrationen reduziert wird als der authentischer plastidärer Substrate. Dies würde bedeuten, dass Cytochrom c1 eine geringere Affinität für die Transportmaschinerie der Chloroplasten hat. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die verschiedenen Kompetitorproteine in Abhängigkeit von ihrer individuellen Überexpression den unterschiedlich starken Einfluss bedingen.

Insgesamt haben die Konkurrenzexperimente gezeigt, dass sowohl FNR als auch OEC33 den chloroplastidären Import von Cytochrom c1 beeinflussen. Diese Proteine konkurrieren demnach um die Transportapparate der Chloroplasten. Cytochrom c1 benutzt also teilweise oder vollständig den gleichen Importweg wie auch authentische plastidäre Proteine. Das korreliert mit der Vorstellung, dass sich der Transportweg dualer Proteine nicht von dem anderer Vorläuferproteine der Organellen unterscheidet (Peeters and Small, 2001).

4.4 Spezielle Eigenschaften von Cytochrom c1 als duales Protein

4.4.1 Mitochondrieller und plastidärer Transport von Cytochrom c1 im Vergleich

Der Import von Cytochrom c1 findet sowohl in die Mitochondrien als auch in die Chloroplasten statt, allerdings mit deutlich unterschiedlicher Effizienz.

Auffällig war zudem, dass die Proteasebehandlung keine vollständige Degradation des Vorläuferproteins in den mitochondrialen Proben erreichte. Die Möglichkeit eines ineffektiven Thermolysinverdauens kann ausgeschlossen werden, da in den chloroplastidären Proben das Vorläuferprotein zumeist komplett abgebaut wurde. Dieser Unterschied bei der Degradation durch Thermolysin war nicht auf das authentische Protein beschränkt, sondern konnte auch für die Reporterfusionen beobachtet werden (Abb. 3.46, S. 100). Der relativ hohe Anteil an proteaseresistentem Vorläuferprotein kann also typisch für den Proteinimport in die Mitochondrien sein. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um importiertes aber noch nicht prozessiertes Protein.

Dies wurde beispielsweise auch für die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (GluRS, MetRS and PheRS) aus *Arabidopsis thaliana* gezeigt (Pujol et al., 2007). Eine Prozessierung zum reifen Protein findet ebenfalls nur teilweise statt, wenn die Vorläuferproteine in die Mitochondrien importiert werden. Im Gegensatz dazu werden in die Chloroplasten importierte Proteine direkt prozessiert und keine proteasestabilen Vorläuferproteine können detektiert werden.

Im Weiteren wurde die Zeitabhängigkeit des mitochondrialen und chloroplastidären Importes von Cytochrom c1 bestimmt (Abschnitt 3.7.3). Es sind vergleichbare Abhängigkeiten für den Import des Proteins in beide Organellen festzustellen. Cytochrom c1 wird zeitgleich in die Organellen transportiert. Das Verhältnis zwischen mitochondrialem und chloroplastidärem Import ist weitgehend unabhängig von der Inkubationszeit. Die Chloroplasten erreichen allerdings etwas eher eine Sättigung. Das entspricht anderen Studien, in denen festgestellt wurde, dass Chloroplasten schnellere Importkinetiken aufweisen, als sie für Mitochondrien zu beobachten sind (May and Soll, 2000; Schleiff and Soll, 2000).

Der Einfluss der Substratkonzentration auf den Import von Cytochrom c1 wurde ebenfalls untersucht (Abschnitt 3.7.1). Der Import erfolgt auch bei der geringsten eingesetzten Menge an Translationsprodukt sowohl in die Mitochondrien als auch in die Chloroplasten. Die Bindung des Vorläuferproteins an die Oberfläche der Organellen und die Menge an Prozessierungsprodukt sinkt in beiden Ansätzen mit abnehmender Menge an Translationsprodukt. Es besteht eine direkte Proportionalität zwischen Translationsmenge

und Importrate. Das relative Organell-*Targeting* von Cytochrom c1 ist unabhängig von der Substratkonzentration.

4.4.2 Cytochrom c1 wird in Mitochondrien und Chloroplasten unterschiedlich prozessiert

Die Prozessierung in den Mitochondrien und Chloroplasten ist für Cytochrom c1 unterschiedlich. In den Chloroplasten entsteht ein Prozessierungsprodukt, das ein höheres apparentes Molekulargewicht hat als das reife Protein in den Mitochondrien.

Für die Glutathionreduktase aus *Pisum sativum* wurde beobachtet, dass die Prozessierung sowohl durch die MPP als auch die SPP zu reifen Proteinen führt, deren Molekulargewicht nicht zu unterscheiden ist (Rudhe et al., 2004). Für die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (GluRS, MetRS and PheRS) aus *Arabidopsis thaliana* konnte aber gezeigt werden, dass die Prozessierung in den Mitochondrien und Chloroplasten auch an unterschiedlichen Stellen der Proteine stattfinden kann (Pujol et al., 2007). So werden zwei dieser drei Vorläuferproteine von den Prozessierungspeptidasen der Mitochondrien und Chloroplasten unterschiedlich gespalten. Die Peptidasen haben unterschiedliche Erkennungsstellen, wie auch für die Glutathionreduktase aus *Pisum sativum* gezeigt wurde (Rudhe et al., 2004). Bei Cytochrom c1 sind demnach sowohl die Erkennungs- als auch die Prozessierungsstellen für die Peptidasen der Mitochondrien und Chloroplasten verschieden.

Es konnte für andere mitochondrielle Proteine gezeigt werden, dass eine Prozessierung durch die SPP *in vitro* möglich ist (Bassham et al., 1994). Die Schnittstelle der SPP lag dabei jedoch N-terminal der MPP-Schnittstelle. Dies passt zum Ergebnis, dass das Prozessierungsprodukt von Cytochrom c1 in den Plastiden größer ist als das reife Protein in den Mitochondrien.

4.4.3 Cytochrom c1 ist im Stroma der Plastiden lokalisiert

Die Organellen wurden fraktioniert, um die Lokalisierung von Cytochrom c1 innerhalb dieser zu bestimmen (Abb. 3.17, S. 75). Die Mitochondrien wurden in lösliche und Membranfraktion und die Chloroplasten in Thylakoid- und Stromafraktion getrennt. Cytochrom c1 kann nach erfolgtem *in vitro* Import innerhalb der Membranfraktion der Mitochondrien detektiert werden. Das entspricht der erwarteten Lokalisierung als membranständige Untereinheit des Cytochrom bc1-Komplexes der inneren

Mitochondrienmembran. Nach dem Import in die Chloroplasten liegt Cytochrom c1 in der Stromafraktion vor.

Die suborganelläre Lokalisierung im Stroma der Plastiden wird auch durch die *in vivo* Experimente gestützt (Abschnitt 3.10.2). Die Reporterfusionen von Cytochrom c1 co-lokalisieren nach der Expression innerhalb der Zelle mit dem stromalen Plastidenmarker im Stroma der Plastiden. Es ist interessant, dass alle bisher bekannten dualen Proteine in den Plastiden ebenfalls eine stromale Lokalisierung zeigen (Peeters and Small, 2001).

Allerdings konnte eine Prozessierung von Cytochrom c1 *in vitro* durch Zugabe von Stromaextrakt nicht nachvollzogen werden (Abb. 3.18, S. 77). Das Unvermögen, plastidäre Vorläuferproteine durch Stromaextrakt zu prozessieren, ist nicht ungewöhnlich und wurde bereits für authentische plastidäre Vorläuferproteine beschrieben (James et al., 1989; Musgrove et al., 1989; Whelan et al., 1991). So kann das thylakoidäre OEC16 aus *Spinacia oleracea* weder durch Stroma- noch durch Thylakoidextrakt prozessiert werden (James et al., 1989), obwohl es im *in vitro* Import in isolierte Chloroplasten transportiert und dort auch prozessiert wird. Auch für die plastidären Proteine SSU und OEC33 konnte keine Prozessierung durch löslichen Chloroplastenextrakt festgestellt werden (Whelan et al., 1991). Es kann angenommen werden, dass einige Vorläuferproteine Konformationen im Translationssystem annehmen, die sich nachteilig auf eine Prozessierung durch isoliertes Stroma auswirken.

4.4.4 Physiologische Aspekte beeinflussen den Transport

Der durchschnittliche Transport von Cytochrom c1 in die Mitochondrien liegt in den durchgeführten Experimenten generell höher als der in die Chloroplasten. Dennoch waren deutliche Schwankungen im Verhältnis von Mitochondrien- zu Chloroplastenimport festzustellen (Abb. 3.35, S. 91). Es ist bekannt, dass physiologische Aspekte die Importeffizienz beeinflussen können (Dahlin and Cline, 1991; Sommer et al., 1994; Murcha et al., 1999).

Ein interessanter Aspekt ist der Einfluss des Alters bzw. des Entwicklungszustandes der zur Organellisolierung eingesetzten Pflanzen auf das Importverhalten von Cytochrom c1. Mit höherem Alter der Pflanzen steigt der Import von Cytochrom c1 in die Mitochondrien deutlich an, während der Transport in die Chloroplasten abnimmt.

Literaturdaten lassen vermuten, dass die Organellen älterer Pflanzen eine geringere Importkapazität besitzen. Die Studien von Murcha et al., 1999 zeigen, dass der

mitochondrielle Import mit zunehmendem Entwicklungszustand der Pflanzen verringert wird. Dennoch konnten Unterschiede für verschiedene Vorläuferproteine festgestellt werden.

Auch eine Verbindung zwischen Plastidenentwicklung und Aktivität des Proteinimportapparates wurde publiziert (Dahlin and Cline, 1991). Während die Importkapazität von Proplastiden zunächst hoch ist, verringert sie sich deutlich, wenn sich die Plastiden zu reifen Etioplasten oder Chloroplasten entwickelt haben. Die Pflanzenzelle reguliert die Importapparate demnach in Abhängigkeit vom Proteinbedarf sich entwickelnder Plastiden.

Eine Möglichkeit zur Erklärung der veränderten Importrate von Cytochrom c1 ist, dass die Organellen älterer Pflanzen eine veränderte Dichte aufweisen. Dann wäre eine andere relative Menge an Organellen im Importansatz denkbar. Es ist auch möglich, dass eine Verschiebung im Verhältnis von Importkomponenten zu anderen organellären Proteinen mit zunehmendem Alter stattfindet. Die Anzahl an Rezeptoren an der Oberfläche bzw. an Transportkomplexen der Organellen würde dann variieren. Da jedoch der Transport des mitgeführten Kontrollproteins OEC23 kaum vom Alter der hier verwendeten Organellen beeinflusst wird, sind diese Möglichkeiten unwahrscheinlich.

Die Experimente zum Einfluss des Pflanzenalters auf den *in vitro* Import weisen auf eine Verbindung zwischen der Importrate von Cytochrom c1 und dem Entwicklungsgrad der Organellen und somit der Physiologie hin. Obwohl nur zwei verschiedene Alterstufen untersucht wurden, können Unterschiede bezüglich der Transporteffizienz festgestellt werden. Auch in den Arbeiten von Christensen et al., 2005 wurde *in vivo* beobachtet, dass die DNA Polymerase $\gamma 2$ in jungen meristematischen Gewebe *dual targeting* in Mitochondrien und Chloroplasten zeigt. Dagegen wird dieses Protein in vollentwickelten, älteren Blättern ausschließlich in Mitochondrien nachgewiesen. Vermutlich ist der Proteintransport in beide Organellen abhängig vom Bedarf der Pflanze an bestimmten Proteinen. Durch physiologische Veränderungen werden unterschiedliche Anforderungen an die Pflanzenzelle bzw. die Zellorganellen gestellt, daher ist eine Anpassung der Proteinzusammensetzung notwendig. Perspektivisch sollten weitere Untersuchungen zur Veränderung des Transportverhaltens in Abhängigkeit vom pflanzlichen Entwicklungszustand durchgeführt werden.

Eventuell ist aber nicht das Alter selbst, sondern die Wirkung abiotischer Faktoren ursächlich für die veränderte Importrate. Umweltfaktoren sind unter anderem Wasserverfügbarkeit, Nährstoffversorgung, Temperatur und Lichtmenge. Diese Einflüsse

können den Metabolismus, das Wachstum und die Entwicklung von Pflanzen erheblich verändern.

Der Einfluss von Umweltstress auf die Kapazität pflanzlicher Mitochondrien, Vorläuferproteine zu importieren, ist bekannt (Taylor et al., 2003). Es wurde gezeigt, dass verschiedene umweltbedingte Stressfaktoren, wie Trockenheit, Temperaturmaxima oder Herbizidbehandlung den Import mitochondrieller Proteine unterschiedlich beeinflussen. Auch für den plastidären Import sind Veränderungen in Abhängigkeit von Stressfaktoren publiziert (Dutta et al., 2009). Die Expression mehrerer Komponenten des plastidären Importapparates von *Pisum sativum* war verringert, wenn die Pflanzen Hitze- oder Kältestress ausgesetzt wurden. Dadurch wurde beispielsweise der Import der SSU in die Plastiden herunterreguliert. In weiteren Studien sollte daher der Einfluss von Umweltfaktoren bzw. Kulturbedingungen auf die Importrate von Cytochrom c1 untersucht werden.

4.4.5 Weizenkeimextrakt hat einen inhibierenden Effekt auf den Import von Cytochrom c1

Cytochrom c1 wird nur dann *in vitro* in die Organellen importiert, wenn die Translation im Retikulocytenlysat (*rabbit reticulocyte lysate* - RRL) erfolgt. Wird das Vorläuferprotein in Weizenkeimextrakt (*wheat germ extract* - WGE) synthetisiert, findet dagegen weder ein mitochondrieller noch ein chloroplastidärer Import statt. Es ist lediglich eine Bindung des Translationsproduktes an die Oberfläche der Organellen festzustellen (Abb. 3.15, S. 72). Die Ergebnisse zur Analyse der Importkompetenz von Cytochrom c1 aus den beiden Translationssystemen lassen auf stimulierende Eigenschaften von RRL und inhibierende Eigenschaften von WGE schließen.

Der Einfluss von WGE auf die Importkompetenz mitochondrieller Vorläuferproteinen ist aus der Literatur bekannt (Dessi et al., 2003). So werden die mitochondriellen Vorläuferproteine F1 β (Untereinheit der ATP-Synthase aus *Nicotiana plumbaginifolia*) und AOX (Alternative Oxidase 1 aus *Glycine max*) in isolierte Mitochondrien importiert, wenn sie in RRL synthetisiert wurden. Die gleichen Vorläuferproteine können jedoch als Translationsprodukte aus WGE nicht importiert werden. Im Gegensatz dazu ist die F_Ad Untereinheit der ATP-Synthase aus *Glycine max* aus beiden Translationssystemen importkompetent. Nach diesen Studien resultiert die Import-Inkompetenz einiger in WGE synthetisierter mitochondrieller Vorläuferproteine aus einer Interaktion von inhibierenden Faktoren des Weizenkeimextraktes mit dem reifen Teil von Vorläuferproteinen. Auch das

Fehlen cytosolischer Faktoren im WGE, die den Import stimulieren, indem eine Aggregation der Vorläuferproteine verhindert und ihre Löslichkeit aufrechterhalten wird, ist denkbar (Lain et al., 1994).

Auch für plastidäre Vorläuferproteine, z.B. SSU und OEC33, wurde bereits ein Einfluss von WGE auf den Import beschrieben (Schleiff et al., 2002). Der *in vitro* Import war drastisch reduziert, wenn Weizenkeimextrakt zum Importansatz zugegeben wurde. Desweiteren war die Importeffizienz des plastidären Proteins SSU deutlich geringer, wenn es in Weizenkeimextrakt synthetisiert wurde und nicht mittels Retikulocytenlysat. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass Weizenkeimextrakt eine Komponente enthält, die als Inhibitor des Proteinimports in die Chloroplasten fungieren kann. Diese Komponente interagiert mit dem Vorläuferprotein und verhindert eine Assoziation mit der Translokase. Dieser Inhibitor könnte Bestandteil eines Regulationssystems sein, das es der Pflanzenzelle ermöglicht, schnell auf unterschiedliche physiologische Bedürfnisse zu reagieren.

4.4.6 Das Transportsignal von Cytochrom c1 bedingt das *dual targeting*

Eine duale Lokalisierung in Mitochondrien und Chloroplasten (*dual targeting*) wurde inzwischen für mehrere Proteine gezeigt (Peeters and Small, 2001). Diese duale Lokalisierung kann durch sogenannte gemischte (*ambiguous*) oder zusammengesetzte Transportsignale vermittelt werden. Da nur ein Translationsprodukt gebildet wird, gehört Cytochrom c1 aus *Solanum tuberosum* vermutlich zu den Proteinen mit gemischtem Transportsignal am Aminoterminal. Dieses Transportsignal trägt dann Eigenschaften sowohl mitochondrieller als auch plastidärer Signale, wie es für gemischte Transportsignale beschrieben wurde (Peeters and Small, 2001; Pujol et al., 2007). Beim Vergleich verschiedener Vorhersageprogramme ist zwar grundsätzlich ein Trend für eine mitochondrielle Lokalisierung von Cytochrom c1 festzustellen. Das Transportsignal ist aber nicht absolut eindeutig einem bestimmten Kompartiment zuzuordnen (Abb. 3.10, S. 67). Es trägt also vermutlich nicht nur Eigenschaften typischer mitochondrieller Transportsignale.

Die *dual targeting* Eigenschaften von Cytochrom c1 wurden auch *in vivo* untersucht. Dafür wurden drei unterschiedlich lange Bereiche von Cytochrom c1 mit dem Reporter EYFP fusioniert. Die Befähigung dieser Fusionsproteine zum Organelltransport wurde zunächst *in vitro* überprüft. Es zeigte sich, dass die Proteine in beide Organellen importiert werden konnten. Allerdings war in Mitochondrien keine Prozessierung von c1(1-77)/EYFP und in Chloroplasten keine Prozessierung von c1(1-320)/EYFP eindeutig nachweisbar, sodass in diesen beiden Fällen der Nachweis des jeweiligen Organellimports noch nicht endgültig

erbracht ist. Da die Fusion c1(1-77)/EYFP nur die mitochondrielle Präsequenz von Cytochrom c1 enthält, ist es möglich, dass die Erkennungsstelle für die MPP nicht mehr zugänglich ist. Das Protein wird zwar importiert, kann dann aber nicht prozessiert werden. Für die Vollängenfusion c1(1-320)/EYFP ist es denkbar, dass eine Prozessierung in den Chloroplasten stattfindet. Ein mögliches Prozessierungsprodukt kann aber aufgrund der Größe des Proteins und des starken Hintergrundes im verwendeten Gelsystem nicht ausreichend aufgetrennt werden. Dennoch zeigt gerade das Ergebnis von c1(1-141)/EYFP, dass das Transportsignal von Cytochrom c1 in der Lage ist, sogar Fremdproteine *in vitro* in beide Organellen zu dirigieren. Ein Einfluss des Reporters bzw. der Fusionen selbst auf das *Targeting* kann aufgrund dieser Ergebnisse ausgeschlossen werden.

Die Fusionsproteine bestätigen die *dual targeting* Eigenschaften des authentischen Cytochrom c1. Diese Fähigkeit konnte auch in den komplementierenden *in vivo* Untersuchungen verifiziert werden. Alle drei Reporterfusionen von Cytochrom c1 werden sowohl in die Mitochondrien als auch in die Plastiden transportiert. Das Transportsignal von Cytochrom c1 ist offensichtlich in der Lage, mit den Proteintransportmaschinerien beider endosymbiontischer Organellen zu interagieren und den Transport des anhängenden Passagierproteins *in vitro* und *in vivo* in beide Organellen zu vermitteln.

Die Experimente mit den Reporterfusionen von Cytochrom c1 haben gezeigt, dass die mitochondrielle Präsequenz von Cytochrom c1, also die ersten 77 Aminosäuren, für das *dual targeting* dieses Proteins in Mitochondrien und Plastiden notwendig und hinreichend ist. Das reife Protein hat demzufolge keinen Effekt auf das grundsätzliche Importverhalten von Cytochrom c1. Für die Glutathionreduktase konnte gezeigt werden, dass der reife Teil des Proteins bzw. das Passagierprotein einer Fusion entscheidenden Einfluss auf das *Targeting* haben kann (Rudhe et al., 2002a; Chew et al., 2003b). Bei dualen Proteinen kann der reife Teil den Import in eines der beiden Organellen offenbar komplett unterdrücken. Bei Cytochrom c1 ist das aber nicht der Fall. Ein Einfluss des reifen Teils von Cytochrom c1 auf die Effizienz des Importes kann aber nicht vollständig ausgeschlossen werden.

4.5 Warum zeigt Cytochrom c1 *dual targeting*?

Die dualen Eigenschaften von Cytochrom c1 konnten durch *in vitro* Importexperimente und *in vivo* Transportstudien nachgewiesen werden. Diese Befähigung ist auch *in planta* wahrscheinlich, wie über immunologische Analysen mit dem Cytochrom c1 Antikörper gezeigt werden konnte.

Die Erkenntnis, dass das Cytochrom c1 Protein des mitochondrialen bc1-Komplexes der Atmungskette nicht nur in den Mitochondrien, sondern auch in den Plastiden lokalisiert ist, führt zur Frage nach einer Funktion dieses Proteins in den Plastiden. Dafür konnten keine klaren Hinweise gefunden werden. In den *in vitro* Experimenten ist für Cytochrom c1 keine Assemblierung in Komplexen innerhalb der Organellen nachweisbar (Abb. 3.19, S. 78). Dies war jedoch nicht nur bei den Chloroplasten, sondern auch bei den Mitochondrien der Fall. Das verwendete Gelsystem könnte einen Einfluss auf die Detektion möglicher Komplexe haben. Auch ist ein negativer Einfluss des Coomassie G250-Farbstoffes auf die Stabilität der Komplexe im Gel denkbar. Eventuell ist eine Optimierung der experimentellen Vorgehensweise notwendig.

Eine Aktivität im Chloroplasten ist für Cytochrom c1 eher unwahrscheinlich. Die Ergebnisse der Western Analysen mit dem Cytochrom c1 Antikörper deuten jedoch darauf hin, dass Cytochrom c1 in Erbse, Spinat und Kartoffel nicht nur in den Mitochondrien, sondern wahrscheinlich ebenfalls in den Chloroplasten lokalisiert ist (Abb. 3.43, S. 97). Es lässt sich also vermuten, dass nicht nur das Cytochrom c1 aus *Solanum tuberosum*, sondern auch die entsprechenden Proteine in anderen Pflanzen, wie *Pisum sativum* und *Spinacia oleracea dual targeting* zeigen. Dies ist als Indiz dafür zu sehen, dass dieses Protein unter Umständen nicht ausschließlich eine Funktion im mitochondrialen bc1-Komplex hat. Eine eventuelle Signalfunktion bei der Koordination zwischen Kern bzw. Cytosol und den Organellen kann beispielsweise spekuliert werden. Selbst wenn keine Funktion in den Chloroplasten besteht, ist die grundsätzliche *dual targeting* Fähigkeit von Cytochrom c1 überaus interessant.

Während zu Beginn dieser Arbeit nur wenige Proteine in der Literatur beschrieben waren, die *dual targeting* zeigen, wurden inzwischen immer mehr Proteine publiziert, die sowohl in den Mitochondrien als auch in den Chloroplasten lokalisiert sind. Um die tatsächliche Bedeutung des *dual targeting* Phänomens besser zu verstehen, wurde in unserer Arbeitsgruppe eine Auswahl geeigneter Kandidatenproteine systematisch hinsichtlich ihrer Transporteigenschaften *in vitro* und *in vivo* analysiert. Viele dieser Proteine konnten als mögliche duale Proteine identifiziert werden.

Eventuell kann ein latentes *dual targeting* bei vielen Proteinen angenommen werden, die bisher als monospezifisch angesehen werden. Als Beispiel seien hier Kreuzreaktionen bei Western Analysen angemerkt. Sind das Kontaminationen oder duale Proteine in beiden Organellen? Möglicherweise werden sowohl in diesen Analysen als auch bei der Erstellung von Proteomdaten eigentlich duale Proteine als Kontaminationen aussortiert (z.B. Friso et al., 2004). Der bei den Western Analysen zur Reinheit der präparierten Organellen eingesetzte Antikörper gegen das mitochondrielle Protein GDC könnte ein solcher Fall sein

(Abb. 3.3, S. 58). Ein Vergleich von Proteomanalysen könnte weitere duale Proteine identifizieren.

Dass mehr Proteine duale Eigenschaften aufweisen, als bisher angenommen, zeigt, dass dieses Verhalten möglicherweise keine Ausnahme ist. Dies lässt vermuten, dass die Fähigkeit zum *dual targeting* eine ursprüngliche Eigenschaft vieler Transportsignale war, die zumindest auf einem niedrigen Niveau oft erhalten blieb. Eine basale Fähigkeit von Proteinen zum dualem Transport ist eventuell sinnvoll, um auf physiologische Veränderungen schneller reagieren zu können. Nur in den Fällen, in denen bereits eine geringfügige Fehlsortierung von erheblichem Nachteil für die Zelle war, wurde diese Fähigkeit im Laufe der Evolution eliminiert. Solange der Transport eines Proteins in ein bestimmtes Kompartiment keinen Schaden bedeutet, könnte es keinen Selektionsdruck auf ein absolut monospezifisches Transportsignal gegeben haben. Andererseits kam es in einigen Fällen durch *dual targeting* vermutlich auch zur Leistungssteigerung und wurde dann positiv selektiert.

4.6 Zusammenfassendes Modell zum Transport von Cytochrom c1

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten zum Transport von Cytochrom c1 lassen sich in einem Modell zusammenfassend darstellen (Abb. 4.1). Das authentische Cytochrom c1 wird in Abhängigkeit vom Membranpotential der inneren mitochondrialen Membran in die Mitochondrien importiert und dort zum reifen Protein prozessiert. Das reife Protein akkumuliert in der Membranfraktion. Cytochrom c1 wird ebenfalls in die Chloroplasten importiert. Die Prozessierung erfolgt N-terminal der MPP-Schnittstelle. Der chloroplastidäre Import von Cytochrom c1 unterscheidet sich generell nicht von dem authentischer plastidärer Proteine. Er ist abhängig von internem ATP und erfolgt über die gleiche Maschinerie. Das Transportsignal von Cytochrom c1 kann den dualen Transport auch für Passagierproteine, wie den Reporter EYFP, vermitteln.

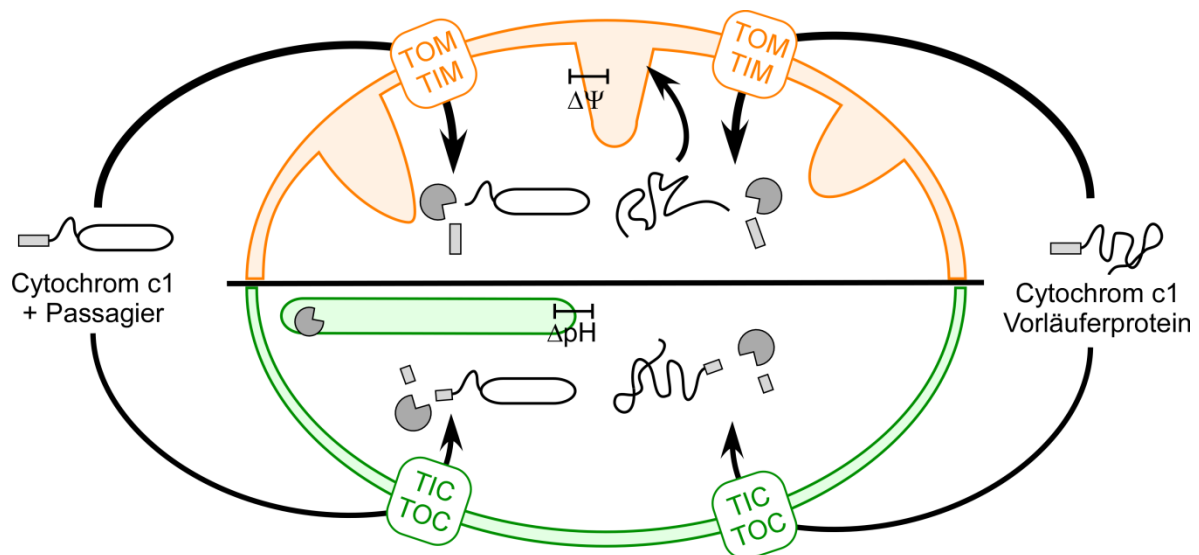


Abb. 4.1: Schematische Darstellung des Transportes von Cytochrom c1 in die Organellen. Die Darstellung stützt sich auf die in dieser Arbeit erhaltenen Daten zum *in vitro* und *in vivo* Transport von Cytochrom c1 aus *Solanum tuberosum* in pflanzliche Mitochondrien (orange) und Chloroplasten (grün).

LITERATURVERZEICHNIS

- Annweiler, A., Hipskind, R.A., and Wirth, T. (1991). A strategy for efficient in vitro translation of cDNAs using the rabbit beta-globin leader sequence. *Nucleic Acids Res* 19, 3750-3750.
- Arnold, I., Fölsch, H., Neupert, W., and Stuart, R.A. (1998). Two distinct and independent mitochondrial targeting signals function in the sorting of an inner membrane protein, cytochrome c1. *J Biol Chem* 273, 1469-1476.
- Arnon, D.I. (1949). Copper Enzymes in isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta Vulgaris*. *Plant Physiol* 24, 1-15.
- Asai, T., Shinoda, Y., Nohara, T., Yoshihisa, T., and Endo, T. (1999). Sec-dependent pathway and DeltapH-dependent pathway do not share a common translocation pore in thylakoidal protein transport. *J Biol Chem* 274, 20075-20078.
- Bassham, D.C., Creighton, A.M., Arretz, M., Brunner, M., and Robinson, C. (1994). Efficient but aberrant cleavage of mitochondrial precursor proteins by the chloroplast stromal processing peptidase. *Eur J Biochem* 221, 523-528.
- Baudisch, B. (2006). Subzelluläre Lokalisierung chimärer EGFP-Derivate nach transienter Transformation verschiedener Pflanzenspezies (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg).
- Becker, T., Jelic, M., Vojta, A., Radunz, A., Soll, J., and Schleiff, E. (2004a). Preprotein recognition by the Toc complex. *EMBO J* 23, 520-530.
- Becker, T., Hritz, J., Vogel, M., Caliebe, A., Bukau, B., Soll, J., and Schleiff, E. (2004b). Toc12, a novel subunit of the intermembrane space preprotein translocon of chloroplasts. *Mol Biol Cell* 15, 5130-5144.
- Berghöfer, J., and Klösgen, R.B. (1999). Two distinct translocation intermediates can be distinguished during protein transport by the TAT (Deltaph) pathway across the thylakoid membrane. *FEBS Lett* 460, 328-332.
- Berry, E.A., Huang, L.S., and DeRose, V.J. (1991). Ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase of higher plants. Isolation and characterization of the bc1 complex from potato tuber mitochondria. *J Biol Chem* 266, 9064-9077.
- Böhni, P., Gasser, S., Leaver, C., and Schatz, G. (1980). A matrix-localized mitochondrial protease processing cytoplasmically made precursors to mitochondrial proteins. In *The organisation and expression of the mitochondrial genome*, A.M. Kroon and C. Saccone, eds (Amsterdam: Elsevier Science Publishers), pp. 423-433.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Braun, H.P., and Schmitz, U.K. (1995). The bifunctional cytochrome c reductase/processing peptidase complex from plant mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 27, 423-436.

- Braun, H.P., Emmermann, M., Kruff, V., and Schmitz, U.K. (1992). Cytochrome c1 from potato: a protein with a presequence for targeting to the mitochondrial intermembrane space. *Mol Gen Genet* 231, 217-225.
- Brix, J., Dietmeier, K., and Pfanner, N. (1997). Differential recognition of preproteins by the purified cytosolic domains of the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70. *J Biol Chem* 272, 20730-20735.
- Caliebe, A., Grimm, R., Kaiser, G., Lübeck, J., Soll, J., and Heins, L. (1997). The chloroplastic protein import machinery contains a Rieske-type iron-sulfur cluster and a mononuclear iron-binding protein. *EMBO J* 16, 7342-7350.
- Chew, O., and Whelan, J. (2003). Dual targeting ability of targeting signals is dependent on the nature of the mature protein. *Functional Plant Biology* 30, 805–812.
- Chew, O., Whelan, J., and Millar, A.H. (2003a). Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in Arabidopsis mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. *J Biol Chem* 278, 46869-46877.
- Chew, O., Rudhe, C., Glaser, E., and Whelan, J. (2003b). Characterization of the targeting signal of dual-targeted pea glutathione reductase. *Plant Mol Biol* 53, 341-356.
- Chew, O., Lister, R., Qbadou, S., Heazlewood, J.L., Soll, J., Schleiff, E., Millar, A.H., and Whelan, J. (2004). A plant outer mitochondrial membrane protein with high amino acid sequence identity to a chloroplast protein import receptor. *FEBS Lett* 557, 109-114.
- Chou, M.-L., Fitzpatrick, L.M., Tu, S.-L., Budziszewski, G., Potter-Lewis, S., Akita, M., Levin, J.Z., Keegstra, K., and Li, H.-M. (2003). Tic40, a membrane-anchored co-chaperone homolog in the chloroplast protein translocon. *EMBO J* 22, 2970-2980.
- Chow, K.S., Singh, D.P., Roper, J.M., and Smith, A.G. (1997). A single precursor protein for ferrochelatase-I from Arabidopsis is imported in vitro into both chloroplasts and mitochondria. *J Biol Chem* 272, 27565-27571.
- Christensen, A.C., Lyznik, A., Mohammed, S., Elowsky, C.G., Elo, A., Yule, R., and Mackenzie, S.A. (2005). Dual-domain, dual-targeting organellar protein presequences in Arabidopsis can use non-AUG start codons. *Plant Cell* 17, 2805-2816.
- Clark, S.A., and Theg, S.M. (1997). A folded protein can be transported across the chloroplast envelope and thylakoid membranes. *Mol Biol Cell* 8, 923-934.
- Cleary, S.P., Tan, F.-C., Nakrieko, K.-A., Thompson, S.J., Mullineaux, P.M., Creissen, G.P., von Stedingk, E., Glaser, E., Smith, A.G., and Robinson, C. (2002). Isolated Plant Mitochondria Import Chloroplast Precursor Proteins in Vitro with the Same Efficiency as Chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 277, 5562-5569.
- Cline, K., and Henry, R. (1996). Import and routing of nucleus-encoded chloroplast proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12, 1-26.
- Cline, K., Ettinger, W.F., and Theg, S.M. (1992). Protein-specific energy requirements for protein transport across or into thylakoid membranes. Two luminal proteins are transported in the absence of ATP. *J Biol Chem* 267, 2688-2696.

- Creissen, G., Reynolds, H., Xue, Y., and Mullineaux, P. (1995). Simultaneous targeting of pea glutathione reductase and of a bacterial fusion protein to chloroplasts and mitochondria in transgenic tobacco. *Plant J* 8, 167-175.
- Cruciat, C.M., Hell, K., Fölsch, H., Neupert, W., and Stuart, R.A. (1999). Bcs1p, an AAA-family member, is a chaperone for the assembly of the cytochrome bc(1) complex. *EMBO J* 18, 5226-5233.
- Dahlin, C., and Cline, K. (1991). Developmental Regulation of the Plastid Protein Import Apparatus. *Plant Cell* 3, 1131-1140.
- Dessi, P., Pavlov, P.F., Wällberg, F., Rudhe, C., Brack, S., Whelan, J., and Glaser, E. (2003). Investigations on the in vitro import ability of mitochondrial precursor proteins synthesized in wheat germ transcription-translation extract. *Plant Molecular Biology* 52, 259-271.
- Duchêne, A.M., Giritch, A., Hoffmann, B., Cognat, V., Lancelin, D., Peeters, N.M., Zaepfel, M., Maréchal-Drouard, L., and Small, I.D. (2005). Dual targeting is the rule for organellar aminoacyl-tRNA synthetases in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 16484-16489.
- Dutta, S., Mohanty, S., and Tripathy, B.C. (2009). Role of temperature stress on chloroplast biogenesis and protein import in pea. *Plant Physiol* 150, 1050-1061.
- Emmermann, M., Clericus, M., Braun, H.P., Mozo, T., Heins, L., Kruff, V., and Schmitz, U.K. (1994). Molecular features, processing and import of the Rieske iron-sulfur protein from potato mitochondria. *Plant Mol Biol* 25, 271-281.
- Eubel, H., Jansch, L., and Braun, H.-P. (2003). New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant Physiol* 133, 274-286.
- Franklin, A.E., and Hoffman, N.E. (1993). Characterization of a chloroplast homologue of the 54-kDa subunit of the signal recognition particle. *J Biol Chem* 268, 22175-22180.
- Frey, T.G., and Mannella, C.A. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends in Biochemical Sciences* 25, 319-324.
- Friso, G., Giacomelli, L., Ytterberg, A.J., Peltier, J.-B., Rudella, A., Sun, Q., and Wijk, K.J.v. (2004). In-depth analysis of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts: new proteins, new functions, and a plastid proteome database. *Plant Cell* 16, 478-499.
- Gakh, O., Cavadini, P., and Isaya, G. (2002). Mitochondrial processing peptidases. *Biochim Biophys Acta* 1592, 63-77.
- Gasser, S.M., Ohashi, A., Daum, G., Böhni, P.C., Gibson, J., Reid, G.A., Yonetani, T., and Schatz, G. (1982). Imported mitochondrial proteins cytochrome b2 and cytochrome c1 are processed in two steps. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 267-271.
- Glaser, E., and Dessi, P. (1999). Integration of the mitochondrial-processing peptidase into the cytochrome bc1 complex in plants. *J Bioenerg Biomembr* 31, 259-274.
- Gray, M.W. (1999). Evolution of organellar genomes. *Curr Opin Genet Dev* 9, 678-687.
- Gray, M.W., Burger, G., and Lang, B.F. (1999). Mitochondrial evolution. *Science* 283, 1476-1481.
- Gutensohn, M., Fan, E., Frielingsdorf, S., Hanner, P., Hou, B., Hust, B., and Klösgen, R.B. (2006). Toc, Tic, Tat et al.: structure and function of protein transport machineries in chloroplasts. *J Plant Physiol* 163, 333-347.

- Halperin, T., and Adam, Z. (1996). Degradation of mistargeted OEE33 in the chloroplast stroma. *Plant Mol Biol* 30, 925-933.
- Hamel, P., Sakamoto, W., Wintz, H., and Dujardin, G. (1997). Functional complementation of an *oxa1-* yeast mutation identifies an *Arabidopsis thaliana* cDNA involved in the assembly of respiratory complexes. *Plant J* 12, 1319-1327.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166, 557-580.
- Hanson, M.R., and Sattarzadeh, A. (2008). Dynamic morphology of plastids and stromules in angiosperm plants. *Plant Cell Environ* 31, 646-657.
- Hartl, F.U., Ostermann, J., Guiard, B., and Neupert, W. (1987). Successive translocation into and out of the mitochondrial matrix: targeting of proteins to the intermembrane space by a bipartite signal peptide. *Cell* 51, 1027-1037.
- Hawlitsek, G., Schneider, H., Schmidt, B., Tropschug, M., Hartl, F.U., and Neupert, W. (1988). Mitochondrial protein import: identification of processing peptidase and of PEP, a processing enhancing protein. *Cell* 53, 795-806.
- Heins, L., Mehrle, A., Hemmler, R., Wagner, R., K uchler, M., H ormann, F., Sveshnikov, D., and Soll, J. (2002). The preprotein conducting channel at the inner envelope membrane of plastids. *EMBO J* 21, 2616-2625.
- Hell, K., Herrmann, J.M., Pratje, E., Neupert, W., and Stuart, R.A. (1998). Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2250-2255.
- Henry, R., Kapazoglou, A., McCaffery, M., and Cline, K. (1994). Differences between lumen targeting domains of chloroplast transit peptides determine pathway specificity for thylakoid transport. *J Biol Chem* 269, 10189-10192.
- Herrmann, R.G., Steppuhn, J., Herrmann, G.S., and Nelson, N. (1993). The nuclear-encoded polypeptide Cfo-II from spinach is a real, ninth subunit of chloroplast ATP synthase. *FEBS Letters* 326, 192-198.
- Hill, K., Model, K., Ryan, M.T., Dietmeier, K., Martin, F., Wagner, R., and Pfanner, N. (1998). Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins [see comment]. *Nature* 395, 516-521.
- H ormann, F., K uchler, M., Sveshnikov, D., Oppermann, U., Li, Y., and Soll, J. (2004). Tic32, an essential component in chloroplast biogenesis. *J Biol Chem* 279, 34756-34762.
- James, H.E., Bartling, D., Musgrove, J.E., Kirwin, P.M., Herrmann, R.G., and Robinson, C. (1989). Transport of proteins into chloroplasts. Import and maturation of precursors to the 33-, 23-, and 16-kDa proteins of the photosynthetic oxygen-evolving complex. *J Biol Chem* 264, 19573-19576.
- J ansch, L., Kruff, V., Schmitz, U.K., and Braun, H.P. (1996). New insights into the composition, molecular mass and stoichiometry of the protein complexes of plant mitochondria. *Plant J* 9, 357-368.
- J ansch, L., Kruff, V., Schmitz, U.K., and Braun, H.-P. (1998). Unique Composition of the Preprotein Translocase of the Outer Mitochondrial Membrane from Plants. *J. Biol. Chem.* 273, 17251-17257.

- Jansen, T., Reiländer, H., Steppuhn, J., and Herrmann, R. (1988). Analysis of cDNA clones encoding the entire precursor-polypeptide for ferredoxin: NADP⁺ oxidoreductase from spinach. *Current Genetics* 13, 517-522.
- Jansen, T., Rother, C., Steppuhn, J., Reinke, H., Beyreuther, K., Jansson, C., Andersson, B., and Herrmann, R.G. (1987). Nucleotide sequence of cDNA clones encoding the complete '23 kDa' and '16 kDa' precursor proteins associated with the photosynthetic oxygen-evolving complex from spinach. *FEBS Letters* 216, 234-240.
- Jensen, R.E., and Dunn, C.D. (2002). Protein import into and across the mitochondrial inner membrane: role of the TIM23 and TIM22 translocons. *Biochim Biophys Acta* 1592, 25-34.
- Joyard, J., Billecocq, A., Bartlett, S.G., Block, M.A., Chua, N.H., and Douce, R. (1983). Localization of polypeptides to the cytosolic side of the outer envelope membrane of spinach chloroplasts. *J Biol Chem* 258, 10000-10006.
- Kalousek, F., Isaya, G., and Rosenberg, L.E. (1992). Rat liver mitochondrial intermediate peptidase (MIP): purification and initial characterization. *EMBO J* 11, 2803-2809.
- Kang, P.J., Ostermann, J., Shilling, J., Neupert, W., Craig, E.A., and Pfanner, N. (1990). Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature* 348, 137-143.
- Karniely, S., and Pines, O. (2005). Single translation--dual destination: mechanisms of dual protein targeting in eukaryotes. *EMBO Rep* 6, 420-425.
- Kessler, F., and Blobel, G. (1996). Interaction of the protein import and folding machineries of the chloroplast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7684-7689.
- Kessler, F., and Schnell, D.J. (2006). The function and diversity of plastid protein import pathways: a multilane GTPase highway into plastids. *Traffic* 7, 248-257.
- Kirwin, P.M., Elderfield, P.D., and Robinson, C. (1987). Transport of proteins into chloroplasts. Partial purification of a thylakoidal processing peptidase involved in plastocyanin biogenesis. *J Biol Chem* 262, 16386-16390.
- Kirwin, P.M., Elderfield, P.D., Williams, R.S., and Robinson, C. (1988). Transport of proteins into chloroplasts. Organization, orientation, and lateral distribution of the plastocyanin processing peptidase in the thylakoid network. *J Biol Chem* 263, 18128-18132.
- Klöggen, R.B. (1997). Protein transport into and across the thylakoid membrane. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 38, 1-9.
- Klöggen, R.B., Brock, I.W., Herrmann, R.G., and Robinson, C. (1992). Proton gradient-driven import of the 16 kDa oxygen-evolving complex protein as the full precursor protein by isolated thylakoids. *Plant Mol Biol* 18, 1031-1034.
- Kolarov, J., and Nelson, B.D. (1984). Import and processing of cytochrome b-c1 complex subunits in isolated hepatoma ascites cells. Inhibition by Rhodamine 6G. *Eur J Biochem* 144, 387-392.
- Kouranov, A., and Schnell, D.J. (1997). Analysis of the interactions of preproteins with the import machinery over the course of protein import into chloroplasts. *J Cell Biol* 139, 1677-1685.
- Kouranov, A., Chen, X., Fuks, B., and Schnell, D.J. (1998). Tic20 and Tic22 are new components of the protein import apparatus at the chloroplast inner envelope membrane. *J Cell Biol* 143, 991-991002.

- Kovermann, P., Truscott, K.N., Guiard, B., Rehling, P., Sepuri, N.B., Müller, H., Jensen, R.E., Wagner, R., and Pfanner, N. (2002). Tim22, the essential core of the mitochondrial protein insertion complex, forms a voltage-activated and signal-gated channel. *Mol Cell* 9, 363-373.
- Kozjak, V., Wiedemann, N., Milenkovic, D., Lohaus, C., Meyer, H.E., Guiard, B., Meisinger, C., and Pfanner, N. (2003). An Essential Role of Sam50 in the Protein Sorting and Assembly Machinery of the Mitochondrial Outer Membrane. *J. Biol. Chem.* 278, 48520-48523.
- Küchler, M., Decker, S., Hörmann, F., Soll, J., and Heins, L. (2002). Protein import into chloroplasts involves redox-regulated proteins. *EMBO J* 21, 6136-6145.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lain, B., Iriarte, A., and Martinez-Carrion, M. (1994). Dependence of the folding and import of the precursor to mitochondrial aspartate aminotransferase on the nature of the cell-free translation system. *J. Biol. Chem.* 269, 15588-15596.
- Lang, B.F., Gray, M.W., and Burger, G. (1999). Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu Rev Genet* 33, 351-397.
- Leister, D. (2003). Chloroplast research in the genomic age. *Trends Genet* 19, 47-56.
- Lister, R., Murcha, M.W., and Whelan, J. (2003). The Mitochondrial Protein Import Machinery of Plants (MPIMP) database. *Nucleic Acids Res* 31, 325-327.
- Lister, R., Chew, O., Rudhe, C., Lee, M.N., and Whelan, J. (2001). Arabidopsis thaliana ferrochelatase-I and -II are not imported into Arabidopsis mitochondria. *FEBS Lett* 506, 291-295.
- Logan, D.C., and Leaver, C.J. (2000). Mitochondria-targeted GFP highlights the heterogeneity of mitochondrial shape, size and movement within living plant cells. *J Exp Bot* 51, 865-871.
- Lübeck, J., Soll, J., Akita, M., Nielsen, E., and Keegstra, K. (1996). Topology of IEP110, a component of the chloroplastic protein import machinery present in the inner envelope membrane. *EMBO J* 15, 4230-4238.
- Ma, Y., Kouranov, A., LaSala, S.E., and Schnell, D.J. (1996). Two components of the chloroplast protein import apparatus, IAP86 and IAP75, interact with the transit sequence during the recognition and translocation of precursor proteins at the outer envelope. *J Cell Biol* 134, 315-327.
- Macasev, D., Newbigin, E., Whelan, J., and Lithgow, T. (2000). How Do Plant Mitochondria Avoid Importing Chloroplast Proteins? Components of the Import Apparatus Tom20 and Tom22 from Arabidopsis Differ from Their Fungal Counterparts. *Plant Physiol.* 123, 811-816.
- Mackenzie, S.A. (2005). Plant organellar protein targeting: a traffic plan still under construction. *Trends Cell Biol* 15, 548-554.
- Mant, A., Schmidt, I., Herrmann, R.G., Robinson, C., and Klösgen, R.B. (1995). Sec-dependent thylakoid protein translocation. Delta pH requirement is dictated by passenger protein and ATP concentration. *J Biol Chem* 270, 23275-23281.
- Margulis, L. (1970). Origin of eukaryotic cells : evidence and research implications for a theory of the origin and evolution of microbial, plant, and animal cells on the precambrian earth. (New Haven: Yale Univ. Press).
- Marques, J.P., Dudeck, I., and Klösgen, R.B. (2003). Targeting of EGFP chimeras within chloroplasts. *Mol Genet Genomics* 269, 381-387.

- Marques, J.P., Schattat, M.H., Hause, G., Dudeck, I., and Klösgen, R.B. (2004). In vivo transport of folded EGFP by the DeltapH/TAT-dependent pathway in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 55, 1697-1706.
- May, T., and Soll, J. (2000). 14-3-3 proteins form a guidance complex with chloroplast precursor proteins in plants. *Plant Cell* 12, 53-64.
- Menand, B., Maréchal-Drouard, L., Sakamoto, W., Dietrich, A., and Wintz, H. (1998). A single gene of chloroplast origin codes for mitochondrial and chloroplastic methionyl-tRNA synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11014-11019.
- Meyer, E.H., Taylor, N.L., and Millar, A.H. (2008). Resolving and identifying protein components of plant mitochondrial respiratory complexes using three dimensions of gel electrophoresis. *J Proteome Res* 7, 786-794.
- Michl, D., Robinson, C., Shackleton, J.B., Herrmann, R.G., and Klösgen, R.B. (1994). Targeting of proteins to the thylakoids by bipartite presequences: CFoll is imported by a novel, third pathway. *EMBO J* 13, 1310-1317.
- Millar, A.H., Whelan, J., and Small, I. (2006). Recent surprises in protein targeting to mitochondria and plastids. *Curr Opin Plant Biol* 9, 610-615.
- Moore, M., Harrison, M.S., Peterson, E.C., and Henry, R. (2000). Chloroplast Oxa1p homolog albino3 is required for post-translational integration of the light harvesting chlorophyll-binding protein into thylakoid membranes. *J Biol Chem* 275, 1529-1532.
- Mori, H., Summer, E.J., Ma, X., and Cline, K. (1999). Component specificity for the thylakoidal Sec and Delta pH-dependent protein transport pathways. *J Cell Biol* 146, 45-56.
- Mould, R.M., and Robinson, C. (1991). A proton gradient is required for the transport of two luminal oxygen-evolving proteins across the thylakoid membrane. *Journal of Biological Chemistry* 266, 12189-12193.
- Murcha, M.W., Huang, T., and Whelan, J. (1999). Import of precursor proteins into mitochondria from soybean tissues during development. *FEBS Lett* 464, 53-59.
- Murcha, M.W., Lister, R., Ho, A.Y.Y., and Whelan, J. (2003). Identification, expression, and import of components 17 and 23 of the inner mitochondrial membrane translocase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 131, 1737-1747.
- Murcha, M.W., Elhafez, D., Lister, R., Tonti-Filippini, J., Baumgartner, M., Philippar, K., Carrie, C., Mokranjac, D., Soll, J., and Whelan, J. (2007). Characterization of the preprotein and amino acid transporter gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 143, 199-212.
- Musgrove, J.E., Elderfield, P.D., and Robinson, C. (1989). Endopeptidases in the Stroma and Thylakoids of Pea Chloroplasts. *Plant Physiol* 90, 1616-1621.
- Nelson, B.K., Cai, X., and Nebenführ, A. (2007). A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants. *Plant J* 51, 1126-1136.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., and Ehrhardt, W. (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9, 255-262.

- Nicholson, D.W., Stuart, R.A., and Neupert, W. (1989). Biogenesis of cytochrome c1. Role of cytochrome c1 heme lyase and of the two proteolytic processing steps during import into mitochondria. *J Biol Chem* 264, 10156-10168.
- Obara, K., Sumi, K., and Fukuda, H. (2002). The use of multiple transcription starts causes the dual targeting of Arabidopsis putative monodehydroascorbate reductase to both mitochondria and chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 43, 697-705.
- Ohashi, A., Gibson, J., Gregor, I., and Schatz, G. (1982). Import of proteins into mitochondria. The precursor of cytochrome c1 is processed in two steps, one of them heme-dependent. *J Biol Chem* 257, 13042-13047.
- Olsen, L.J., and Keegstra, K. (1992). The binding of precursor proteins to chloroplasts requires nucleoside triphosphates in the intermembrane space. *J Biol Chem* 267, 433-439.
- Peeters, N., and Small, I. (2001). Dual targeting to mitochondria and chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 1541, 54-63.
- Peeters, N.M., Chapron, A., Giritch, A., Grandjean, O., Lancelin, D., Lhomme, T., Vivrel, A., and Small, I. (2000). Duplication and quadruplication of Arabidopsis thaliana cysteinyl- and asparaginyl-tRNA synthetase genes of organellar origin. *J Mol Evol* 50, 413-423.
- Perry, S.E., and Keegstra, K. (1994). Envelope membrane proteins that interact with chloroplastic precursor proteins. *Plant Cell* 6, 93-9105.
- Pfanner, N., and Geissler, A. (2001). Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 339-349.
- Pon, L., Moll, T., Vestweber, D., Marshallsay, B., and Schatz, G. (1989). Protein import into mitochondria: ATP-dependent protein translocation activity in a submitochondrial fraction enriched in membrane contact sites and specific proteins. *J Cell Biol* 109, 2603-2616.
- Pujol, C., Maréchal-Drouard, L., and Duchêne, A.-M. (2007). How can organellar protein N-terminal sequences be dual targeting signals? In silico analysis and mutagenesis approach. *J Mol Biol* 369, 356-367.
- Qbadou, S., Becker, T., Bionda, T., Reger, K., Ruprecht, M., Soll, J., and Schleiff, E. (2007). Toc64-- a preprotein-receptor at the outer membrane with bipartite function. *J Mol Biol* 367, 1330-1346.
- Rapaport, D. (2002). Biogenesis of the mitochondrial TOM complex. *Trends Biochem Sci* 27, 191-197.
- Richter, S., Zhong, R., and Lamppa, G. (2005). Function of the stromal processing peptidase in the chloroplast import pathway. *Physiologia Plantarum* 123, 362-368.
- Robinson, C., and Klösgen, R.B. (1994). Targeting of proteins into and across the thylakoid membrane--a multitude of mechanisms. *Plant Mol Biol* 26, 15-24.
- Robinson, C., Cai, D., Hulford, A., Brock, I.W., Michl, D., Hazell, L., Schmidt, I., Herrmann, R.G., and Klösgen, R.B. (1994). The presequence of a chimeric construct dictates which of two mechanisms are utilized for translocation across the thylakoid membrane: evidence for the existence of two distinct translocation systems. *EMBO J* 13, 279-285.
- Robinson, D., Karnauchov, I., Herrmann, R.G., Klösgen, R.B., and Robinson, C. (1996). Protease-sensitive thylakoidal import machinery for the Sec-, DeltapH- and signal recognition particle-

- dependent protein targeting pathways, but not for CFoll integration. *The Plant Journal* 10, 149-155.
- Rodermel, S. (2001). Pathways of plastid-to-nucleus signaling. *Trends Plant Sci* 6, 471-478.
- Römisch, J., Tropschug, M., Sebald, W., and Weiss, H. (1987). The primary structure of cytochrome c1 from *Neurospora crassa*. *Eur J Biochem* 164, 111-115.
- Rudhe, C., Chew, O., Whelan, J., and Glaser, E. (2002a). A novel in vitro system for simultaneous import of precursor proteins into mitochondria and chloroplasts. *The Plant Journal* 30, 213-220.
- Rudhe, C., Clifton, R., Whelan, J., and Glaser, E. (2002b). N-terminal domain of the dual-targeted pea glutathione reductase signal peptide controls organellar targeting efficiency. *J Mol Biol* 324, 577-585.
- Rudhe, C., Clifton, R., Chew, O., Zemam, K., Richter, S., Lamppa, G., Whelan, J., and Glaser, E. (2004). Processing of the dual targeted precursor protein of glutathione reductase in mitochondria and chloroplasts. *J Mol Biol* 343, 639-647.
- Rudolph, R., Böhm, G., Lilie, H., and Jaenicke, R. (1997). Folding Proteins. In *Protein Function: A Practical Approach*, T.E. Creighton, ed (Oxford University Press), pp. 57-99.
- Sambrook, J., and Russell, D. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schägger, H., and von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* 199, 223-231.
- Schägger, H., Cramer, W.A., and von Jagow, G. (1994). Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem* 217, 220-230.
- Schatz, G., and Dobberstein, B. (1996). Common principles of protein translocation across membranes. *Science* 271, 1519-1526.
- Schleiff, E., and Soll, J. (2000). Travelling of proteins through membranes: translocation into chloroplasts. *Planta* 211, 449-456.
- Schleiff, E., Motzkus, M., and Soll, J. (2002). Chloroplast protein import inhibition by a soluble factor from wheat germ lysate. *Plant Molecular Biology* 50, 177-185.
- Schleyer, M., and Neupert, W. (1985). Transport of proteins into mitochondria: translocational intermediates spanning contact sites between outer and inner membranes. *Cell* 43, 339-350.
- Schleyer, M., Schmidt, B., and Neupert, W. (1982). Requirement of a membrane potential for the posttranslational transfer of proteins into mitochondria. *Eur J Biochem* 125, 109-116.
- Schneider, A., Behrens, M., Scherer, P., Pratje, E., Michaelis, G., and Schatz, G. (1991). Inner membrane protease I, an enzyme mediating intramitochondrial protein sorting in yeast. *EMBO J* 10, 247-254.
- Schnell, D.J., and Blobel, G. (1993). Identification of intermediates in the pathway of protein import into chloroplasts and their localization to envelope contact sites. *J Cell Biol* 120, 103-115.
- Silva-Filho, M.C. (2003). One ticket for multiple destinations: dual targeting of proteins to distinct subcellular locations. *Curr Opin Plant Biol* 6, 589-595.
- Small, I., Wintz, H., Akashi, K., and Mireau, H. (1998). Two birds with one stone: genes that encode products targeted to two or more compartments. *Plant Mol Biol* 38, 265-277.

- Small, I., Akashi, K., Chapron, A., Dietrich, A., Duchêne, A.M., Lancelin, D., Maréchal-Drouard, L., Menand, B., Mireau, H., Moudden, Y., Ovesna, J., Peeters, N., Sakamoto, W., Souciet, G., and Wintz, H. (1999). The strange evolutionary history of plant mitochondrial tRNAs and their aminoacyl-tRNA synthetases. *J Hered* 90, 333-337.
- Sohrt, K., and Soll, J. (2000). Toc64, a new component of the protein translocon of chloroplasts. *J Cell Biol* 148, 1213-1221.
- Sommer, A., Ne'eman, E., Steffens, J.C., Mayer, A.M., and Harel, E. (1994). Import, targeting, and processing of a plant polyphenol oxidase. *Plant Physiol* 105, 1301-1311.
- Tanaka-Yamamoto, T., Nishikimi, M., and Ozawa, T. (1990). In vitro processing of the precursor to human mitochondrial cytochrome c1. *Biochim Biophys Acta* 1019, 257-260.
- Taylor, N.L., Rudhe, C., Hulett, J.M., Lithgow, T., Glaser, E., Day, D.A., Millar, A.H., and Whelan, J. (2003). Environmental stresses inhibit and stimulate different protein import pathways in plant mitochondria. *FEBS Lett* 547, 125-130.
- Töpfer, R., Matzeit, V., Gronenborn, B., Schell, J., and Steinbiss, H.H. (1987). A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucleic Acids Res* 15, 5890-5890.
- Truscott, K.N., Brandner, K., and Pfanner, N. (2003). Mechanisms of Protein Import into Mitochondria. *Current Biology* 13, R326-R337.
- Truscott, K.N., Kovermann, P., Geissler, A., Merlin, A., Meijer, M., Driessen, A.J., Rassow, J., Pfanner, N., and Wagner, R. (2001). A presequence- and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by Tim23. *Nat Struct Biol* 8, 1074-1082.
- Tyagi, A., Hermans, J., Steppuhn, J., Jansson, C., Vater, F., and Herrmann, R.G. (1987). Nucleotide sequence of cDNA clones encoding the complete "33 kDa" precursor protein associated with the photosynthetic oxygen-evolving complex from spinach. *Molecular and General Genetics MGG* 207, 288-293.
- Überlacker, B., and Werr, W. (1996). Vectors with rare-cutter restriction enzyme sites for expression of open reading frames in transgenic plants. *Molecular Breeding* 2, 293-295.
- van Loon, A.P., and Schatz, G. (1987). Transport of proteins to the mitochondrial intermembrane space: the 'sorting' domain of the cytochrome c1 presequence is a stop-transfer sequence specific for the mitochondrial inner membrane. *EMBO J* 6, 2441-2448.
- van Wilpe, S., Ryan, M.T., Hill, K., Maarse, A.C., Meisinger, C., Brix, J., Dekker, P.J., Moczko, M., Wagner, R., Meijer, M., Guiard, B., Honlinger, A., and Pfanner, N. (1999). Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase. *Nature* 401, 485-489.
- von Heijne, G. (1985). Signal sequences. The limits of variation. *J Mol Biol* 184, 99-9105.
- von Heijne, G. (1986). Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *EMBO J* 5, 1335-1342.
- von Heijne, G., Steppuhn, J., and Herrmann, R.G. (1989). Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *European Journal of Biochemistry* 180, 535-545.
- Watanabe, N., Che, F.S., Iwano, M., Takayama, S., Yoshida, S., and Isogai, A. (2001). Dual targeting of spinach protoporphyrinogen oxidase II to mitochondria and chloroplasts by alternative use of two in-frame initiation codons. *J Biol Chem* 276, 20474-20481.

- Werhahn, W., Niemeyer, A., Jansch, L., Kruff, V., Schmitz, U.K., and Braun, H.-P. (2001). Purification and Characterization of the Preprotein Translocase of the Outer Mitochondrial Membrane from Arabidopsis. Identification of Multiple Forms of TOM20. *Plant Physiol.* 125, 943-954.
- Whelan, J., Knorrpp, C., Harmey, M.A., and Glaser, E. (1991). Specificity of leaf mitochondrial and chloroplast processing systems for nuclear-encoded precursor proteins. *Plant Mol Biol* 16, 283-292.
- Wiedemann, N., Pfanner, N., and Ryan, M.T. (2001). The three modules of ADP/ATP carrier cooperate in receptor recruitment and translocation into mitochondria. *EMBO J* 20, 951-960.
- Wiedemann, N., Kozjak, V., Chacinska, A., Schönfisch, B., Rospert, S., Ryan, M.T., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2003). Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature* 424, 565-571.
- Wimmer, B., Lottspeich, F., van der Klei, I., Veenhuis, M., and Gietl, C. (1997). The glyoxysomal and plastid molecular chaperones (70-kDa heat shock protein) of watermelon cotyledons are encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13624-13629.
- Zhang, X.-P., and Glaser, E. (2002). Interaction of plant mitochondrial and chloroplast signal peptides with the Hsp70 molecular chaperone. *Trends Plant Sci* 7, 14-21.
- Zhang, X.P., Elofsson, A., Andreu, D., and Glaser, E. (1999). Interaction of mitochondrial presequences with DnaK and mitochondrial hsp70. *J Mol Biol* 288, 177-190.
- Zhao, J., Onduka, T., Kinoshita, J.-y., Honsho, M., Kinoshita, T., Shimazaki, K.-i., and Ito, A. (2003). Dual subcellular distribution of cytochrome b5 in plant, cauliflower, cells. *J Biochem* 133, 115-121.

DANKSAGUNG

Ich habe diese Arbeit am Institut für Pflanzenphysiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ralf Bernd Klösgen angefertigt. Ich danke ihm für die Unterstützung, die kritischen und motivierenden Gespräche und die Ideen, welche zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Frau Prof. Dr. Ulla Bonas und dem SFB 648 (Molekulare Mechanismen der Informationsverarbeitung in Pflanzen) möchte ich mich für die Anmerkungen zum Projekt bei den Meetings, sowie die finanzielle Unterstützung durch die DFG bedanken.

Gern würde ich mich auch bei João Marques bedanken, der mir, trotz der viel zu kurzen Zeit, viel beigebracht hat.

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Dabei danke ich insbesondere Bianca Baudisch für die Entscheidung zum *dual targeting* Projekt und die Unterstützung bei der biologistischen Transformation. Mein Dankeschön für den Verzicht auf Sonnenlicht an den Mikroskopiertagen. Bei Dr. Mario Jakob bedanke ich mich für seine fachliche Hilfe bei allen Problemen rund um die Proteinbiochemie. Mein Dank gilt auch Manuela Sondermann für die gemeinsamen Aktionen z.B. zur Isolierung von Organellen aus Spinat oder aus unterschiedlich alten Erbsenpflanzen. Stefanie Max danke ich für die Unterstützung bei den Western Analysen mit dem Cytochrom c1 Antikörper nach meiner aktiven Laborzeit.

Frau Dr. Angelika Schierhorn danke ich für die massenspektrometrische Analyse der Proteine.

Bei Frau Rose, Birgit und Frau Kuhnert bedanke ich mich für die Unterstützung in technischen Fragen des Laboralltags. Ebenso möchte ich Frau Kitze danke sagen für die unermüdliche Hilfe bei der Bewältigung des Papierkrams. Herrn Platzer danke ich für die liebevolle Versorgung unserer Pflanzen.

Meinen herzlichen Dank an Bianca, Roman, Jürgen und Daniela für die geopfert Zeit beim Lesen und Korrigieren dieser Arbeit.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der AG Rabe danke ich ganz herzlich für die sehr gute Arbeitsatmosphäre, für die kleinen Tipps und hilfreichen Diskussionen, für die entspannten Pausen und die gemeinsamen Aktivitäten außerhalb der Arbeit.

Meiner Familie, ganz besonders meinen Eltern, und meinen Freunden danke ich im Besonderen für ihren Rückhalt und die vielseitige Unterstützung in allen Lebenslagen.

Ein ganz besonderer Dank gilt Marko, der mich immer, wie auch bei den Höhen und Tiefen dieser Arbeit unglaublich unterstützt hat.

PUBLIKATIONEN

Krause, K., Kilbiński, I., Mulisch, M., Rödiger, A., Schäfer, A., Krupinska, K. (2005) DNA binding proteins of the Whirly family in *Arabidopsis thaliana* are targeted to the organelles. *FEBS Lett*; 579(17):3707-3712.

Rödiger, A., Baudisch, B., Klösgen, R.B. (2009) Simultaneous isolation of intact mitochondria and chloroplasts from a single pulping of plant tissue. *Journal of Plant Physiology*, in press, corrected proof.

Rödiger, A., Baudisch, B., Klösgen, R.B. Unexpected dual targeting of cytochrome c1.
(in Vorbereitung)

LEBENS LAUF

Zur Person

Name Anja Rödiger
Geboren am 6. September 1979 in Karl-Marx-Stadt
Anschrift Carl-von-Ossietzky-Strasse 6
06114 Halle/Saale

Studium und Beruf

08/2008 – 04/2009 Wissenschaftlicher Mitarbeiter
IBS GmbH (Medizinische Mikrobiologie)
2004 - 2008 Praktische Arbeiten zur vorliegenden Dissertation im Rahmen der
Beschäftigung als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für
Biologie, Institutsbereich Pflanzenphysiologie der Martin-Luther-
Universität Halle-Wittenberg
01/2004 Abschluss: Diplom
Thema der Diplomarbeit: Die Rieske-Fe/S-Proteine aus Chloroplasten
und Mitochondrien: Charakterisierung der funktionellen Domänen für
Organellspezifität, Membrantransport und Assemblierung.
1998 – 2004 Studiengang Biochemie am Fachbereich Biochemie/Biotechnologie
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Schulbildung

1998 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
1992 – 1998 Gymnasium (Chemnitz)
1986 – 1992 Polytechnische Oberschule (Karl-Marx-Stadt)

Anja Rödiger

ERKLÄRUNG

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

Halle/Saale,

Anja Rödiger