

# Charakterisierung des Transport- und Assemblierungsverhaltens der Ferritine aus *Arabidopsis thaliana*

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

**Frau Manuela Sondermann**

geboren am 05.07.1979 in Leipzig

Gutachter:

1. Prof. Dr. Ralf Bernd Klösgen
2. Prof. Dr. Claus Wasternack
3. Prof. Dr. Roland Lill

Verteidigung am 15. April 2009 (Halle/Saale)

„Durch unser Wissen unterscheiden wir uns nur wenig, in unserer  
grenzenlosen Unwissenheit aber sind wir alle gleich.“

Karl Raimund Popper



2.2.2.4	Ferritinimport und Komplexassemblierung in Anwesenheit von Eisen(II) . . . . .	28
2.3	Ferritin - <i>dual targeting</i> in pflanzliche Organellen . . . . .	29
2.3.1	<i>In silico</i> Analyse der subzellulären Lokalisierung der Ferritine . . . . .	29
2.3.2	Reinheit der Organellen aus Erbse und Spinat . . . . .	31
2.3.2.1	Präparation von Mitochondrien und Chloroplasten aus Pflanzenmaterial . . . . .	31
2.3.2.2	Immunologische Analyse der Reinheit der isolierten Organellen . . . . .	32
2.3.3	<i>In vitro</i> Organelltransport der Ferritine . . . . .	34
2.3.3.1	Einzelorganellimport der <i>Arabidopsis</i> Ferritine . . . . .	34
2.3.3.2	<i>Dual targeting</i> der Ferritine im gemischten Importansatz . . . . .	37
2.3.4	Variationen des Ferritintransports in pflanzliche Organellen . . . . .	40
2.3.4.1	Zeitabhängigkeit des Organellimports der Ferritine . . . . .	40
2.3.4.2	Stabilität der importierten Ferritine in den Organellen . . . . .	41
2.3.4.3	Einfluss des Pflanzenalters auf den Import der Ferritine . . . . .	43
2.4	Lokalisierung und Assemblierung der Ferritine in beiden Organellen . . . . .	44
2.4.1	Analyse der Fraktionierung der Organellen . . . . .	44
2.4.2	Lokalisierung der Ferritine innerhalb der Organellen . . . . .	48
2.4.3	Ferritinkomplexe in Mitochondrien & Chloroplasten? . . . . .	49
2.5	Bestätigung des Organellimports der Ferritine . . . . .	53
2.5.1	<i>In vitro</i> Analyse des Organellimports . . . . .	53
2.5.1.1	Vergleich des Imports mit und ohne Lichtquelle . . . . .	53
2.5.1.2	Inhibition des Imports mit Valinomycin . . . . .	54
2.5.1.3	Kompetitionsexperimente des Organellimports der Ferritine . . . . .	56
2.5.2	<i>In vivo</i> Lokalisierung der <i>Arabidopsis</i> Ferritine . . . . .	58
2.5.2.1	Die Reporterproteinfusionen von AtFer1 und AtFer2 . . . . .	58
2.5.2.2	Lokalisierung der Reporterproteinfusionen von AtFer1 <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> . . . . .	60
2.5.2.3	Lokalisierung der Reporterproteinfusionen von AtFer2 <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> . . . . .	67
<b>3</b>	<b>Diskussion</b> . . . . .	<b>76</b>
3.1	Konservierung der Ferritine aus <i>Arabidopsis thaliana</i> . . . . .	76
3.2	Import- und Assemblierungsverhalten der Ferritine in isolierte Chloroplasten . . . . .	77
3.2.1	Plastidäre Lokalisierung der <i>Arabidopsis</i> Ferritine . . . . .	77
3.2.2	Funktionelle Ferritinkomplexe im Chloroplasten . . . . .	78

---

3.2.3	Spezielle Prozessierung von AtFer3 und AtFer4 . . . . .	79
3.3	<i>Dual targeting</i> Verhalten der Ferritine <i>in vitro</i> . . . . .	80
3.3.1	Import der Ferritine in Mitochondrien und Chloroplasten . . . . .	80
3.3.2	Lokalisierung und Komplexassemblierung der Ferritine in den Organellen . . . . .	83
3.3.3	Bestätigung des <i>in vitro</i> Imports in Mitochondrien und Chloroplasten . . . . .	84
3.4	Transportverhalten der Reporterfusionen von AtFer1 und AtFer2 . . . . .	85
3.4.1	<i>In vitro</i> Organellimport der Reporterproteinfusionen . . . . .	85
3.4.2	Die plastidäre Lokalisierung von AtFer1 und AtFer2 <i>in vivo</i> . . . . .	86
3.4.3	Vergleich des <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Importverhaltens der Ferritine . . . . .	88
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>93</b>
<b>5</b>	<b>Material &amp; Methoden</b>	<b>95</b>
5.1	Material . . . . .	95
5.1.1	Chemikalien . . . . .	95
5.1.2	Enzyme . . . . .	95
5.1.3	Molekularbiologische Kits . . . . .	96
5.1.4	Membranen für <i>Western</i> Analysen . . . . .	96
5.1.5	Längenstandards/Marker . . . . .	96
5.1.6	Antibiotika . . . . .	96
5.1.7	Nukleinsäuren und Oligonukleotide . . . . .	97
5.1.8	Bakterienstämme . . . . .	98
5.1.9	Vektoren . . . . .	98
5.1.10	cDNA-Klone zur <i>in vitro</i> Transkription und Translation . . . . .	98
5.1.11	cDNA-Klone zur biolistischen Transformation . . . . .	99
5.1.12	Antikörper . . . . .	100
5.1.13	Pflanzenmaterial . . . . .	100
5.2	Methoden . . . . .	101
5.2.1	Molekularbiologische Methoden . . . . .	101
5.2.1.1	Ferritine - Ursprung & Klonierung in den pBAT-Vektor . . . . .	101
5.2.1.2	Klonierungsstrategie der Reporterproteinfusionen . . . . .	102
5.2.1.3	<i>In vitro</i> Proteinsynthese . . . . .	103
5.2.2	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) . . . . .	104
5.2.2.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) . . . . .	104
5.2.2.2	Native Gelsysteme . . . . .	105
5.2.3	<i>Western Blot</i> Analyse . . . . .	108
5.2.3.1	Elektrotransfer . . . . .	108

---

5.2.3.2	Antikörperbindung und ECL-Entwicklung . . . . .	109
5.2.4	Färbemethoden . . . . .	109
5.2.4.1	Coomassie Färbung . . . . .	109
5.2.4.2	Coomassie-Colloidal-Färbung . . . . .	110
5.2.4.3	Silberfärbung . . . . .	110
5.2.5	Isolierung pflanzlicher Organellen . . . . .	110
5.2.5.1	Präparation von Chloroplasten aus <i>Spinacia oleracea</i> . .	110
5.2.5.2	Präparation von Chloroplasten aus <i>Pisum sativum</i> . . .	111
5.2.5.3	Parallelpräparation von Mitochondrien und Chloroplasten aus <i>Pisum sativum</i> . . . . .	111
5.2.5.4	Parallelpräparation von Mitochondrien und Chloroplasten aus <i>Spinacia oleracea</i> . . . . .	113
5.2.5.5	Bestimmung der Organellkonzentration . . . . .	114
5.2.6	<i>In vitro</i> Importexperimente mit isolierten Organellen . . . . .	114
5.2.6.1	Lösungen für <i>in vitro</i> Importexperimente . . . . .	114
5.2.6.2	Standard-Chloroplastenimport . . . . .	116
5.2.6.3	Stromaextrakt - Isolierung und Inkubation . . . . .	117
5.2.6.4	Importe - Einzelorganellansatz und gemischter Organellansatz . . . . .	117
5.2.6.5	Modifizierung der Importexperimente . . . . .	118
5.2.6.6	Fraktionierung der Organellen . . . . .	119
5.2.7	Biolistische Transformation von Blattgewebe . . . . .	121
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>123</b>
	<b>Anhang</b>	<b>147</b>

---

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Eisen-vermittelte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies . . . . .	2
1.2	Struktur der Ferritinkomplexe . . . . .	4
1.3	Darstellung der Struktur von Ferritin-Untereinheiten . . . . .	5
1.4	Vergleich von tierischem und pflanzlichem Ferritin . . . . .	7
1.5	Transport kerncodierter Organellproteine in Pflanzenzellen . . . . .	11
1.6	Schematische Darstellung der pflanzlichen Proteintransportkomplexe . . . . .	13
2.1	Aufbau der <i>Arabidopsis</i> Ferritine . . . . .	18
2.2	Alignment der Ferritine aus <i>Arabidopsis thaliana</i> . . . . .	19
2.3	<i>In organello</i> Import der Ferritine in isolierte Spinat- bzw. Erbsenchloroplasten . . . . .	21
2.4	Inkubation von Translationsprodukten mit Stromaextrakt im Vergleich zum <i>in organello</i> Import . . . . .	22
2.5	Assemblierung der Ferritine zu stromalen Komplexen . . . . .	24
2.6	2D-Analyse der stromalen Komplexe von AtFer3 . . . . .	25
2.7	2D-Analyse der stromalen Komplexe von AtFer4 . . . . .	26
2.8	Ferritinkomplexe an der Thylakoidmembran . . . . .	27
2.9	Import und Komplexe in Anwesenheit verschiedener Eisen(II) Konzentrationen . . . . .	29
2.10	Percollgradienten der Mitochondrien und Chloroplasten . . . . .	32
2.11	Nachweis der Organellen mit Mitochondrien spezifischen Antikörpern . . . . .	33
2.12	Nachweis der Organellen mit Plastiden spezifischen Antikörpern . . . . .	34
2.13	<i>In organello</i> Importe der Ferritine in Mitochondrien und Chloroplasten . . . . .	35
2.14	Thermolysinbehandlung der <i>in vitro</i> synthetisierten Vorläuferproteine . . . . .	37
2.15	Schema eines gemischten Organellimports . . . . .	38
2.16	Vergleich des Einzelimports mit dem gemischten Importansatz . . . . .	38
2.17	<i>Helical wheel</i> der Transitpeptide der Ferritine . . . . .	39
2.18	Zeitabhängiger Organelltransport der Ferritine . . . . .	41
2.19	Stabilität der importierten Ferritine innerhalb der Organellen . . . . .	42
2.20	Erbsenpflanzen unterschiedlichen Alters . . . . .	43

---

2.21	Import der Ferritine in Organellen aus verschieden alten Pflanzen . . . . .	44
2.22	Darstellung der Organellfraktionierung . . . . .	45
2.23	<i>Western</i> Analyse der fraktionierten Organellen . . . . .	46
2.24	<i>Western</i> Analyse der fraktionierten Organellen . . . . .	47
2.25	Lokalisierung der Ferritine innerhalb der Organellen . . . . .	48
2.26	BN-PAGE der Proteinkomplexe der fraktionierten Organellen . . . . .	50
2.27	2D-Analyse der mitochondrialen Proteinkomplexe . . . . .	51
2.28	Komplexe der Ferritine in Mitochondrien und Chloroplasten . . . . .	52
2.29	Organelltransport der Ferritine in Abhängigkeit einer Lichtquelle . . . . .	54
2.30	Schematische Darstellung von Valinomycin und dessen Wirkung auf den Proteinimport in Mitochondrien . . . . .	55
2.31	Einzelorganellimport der Ferritine in Anwesenheit von Valinomycin . . . . .	56
2.32	Schematische Darstellung eines Konkurrenzexperimentes . . . . .	57
2.33	Kompetition des Organellimports der Ferritine . . . . .	58
2.34	Aminosäuresequenz von AtFer1 und AtFer2 . . . . .	59
2.35	Darstellung der Reporterproteinfusionen von AtFer1 und AtFer2 . . . . .	60
2.36	<i>In organello</i> Import der AtFer1-Fusionsproteine . . . . .	61
2.37	Schema der biolistischen Transformation von Blattgewebe . . . . .	62
2.38	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Epidermiszellen nach transi- enter Expression von AtFer1TP-EYFP bzw. AtFer1TPmut-EGFP . . . . .	63
2.39	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Epidermiszellen nach transi- enter Expression von AtFer1-100-EYFP . . . . .	65
2.40	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Epidermiszellen nach transi- enter Expression von AtFer1fl-EYFP . . . . .	66
2.41	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Epidermiszellen nach transi- enter Expression von AtFer1fl-EYFP . . . . .	67
2.42	<i>In organello</i> Import der AtFer2-Fusionsproteine . . . . .	68
2.43	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Epidermiszellen nach transi- enter Expression von AtFer2-TP-EYFP . . . . .	70
2.44	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Epidermiszellen nach transi- enter Expression von AtFer2-100-EYFP . . . . .	71
2.45	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Epidermiszellen nach transi- enter Expression von AtFer2fl-EYFP . . . . .	72
2.46	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Epidermiszellen nach transi- enter Expression von AtFer2fl-EYFP . . . . .	73
3.1	Zusammenfassung der <i>in vivo</i> Lokalisierung der Reporterproteinfusionen	87
5.1	Klonierungsstrategie der AtFer1- und AtFer2-Fusionsproteine . . . . .	102

# Tabellenverzeichnis

1.1	Übersicht der Expressionsanalysen pflanzlicher Ferritine . . . . .	9
2.1	Übersicht der Ferritine aus <i>Arabidopsis thaliana</i> . . . . .	17
2.2	Homologie der Ferritine aus <i>Arabidopsis thaliana</i> . . . . .	18
2.3	Vorhersage der subzellulären Lokalisierung der <i>Arabidopsis</i> Ferritine . . .	30
2.4	Zusammenfassung der Lokalisierung von AtFer1 und AtFer2 . . . . .	74

# Abkürzungsverzeichnis

## Allgemeine Abkürzungen, Chemikalien, Nukleinsäuren & Masseinheiten

°C	Grad Celsius
$\alpha$ X	Anti-X-Antikörper
A	Adenin
Å	Ångström
ABA	Abscisinsäure
APS	Ammoniumperoxosulfat
AS	Aminosäure
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bistris	Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris-(hydroxymethyl)-methan
BN	<i>Blue native</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
c	Konzentration
C	Cytosin
CAP	m <sup>7</sup> G(5')ppp(5')G
cDNA	komplementäre DNA ( <i>copy DNA</i> )
CN	<i>Colorless native</i>
C-terminal	Carboxyterminal
Chl.	Chlorophyll
CLSM	konfokales Laser-Mikroskop ( <i>confocal laser scanning microscope</i> )
CTP	Cytosin-5'-triphosphat
d	Tag (e)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIC	Differentieller Interferenzkontrast (Durchlicht)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol

---

ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EP	Extensionspeptid ( <i>extension peptide</i> )
Fe/S	Eisen/Schwefel
FRE	<i>iron regulatory element</i>
g	Gramm
g	Schwerkraft
G	Guanin
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde (n)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-Ethansulfonsäure
kb, kDa	Kilobasen, Kilodalton
KO	<i>knockout</i>
KP	Kompetitorprotein
IDRS	<i>iron-dependent regulatory sequence</i>
IMM	innere Mitochondrienmembran
IMS	Intermembranraum
IRE	<i>iron response element</i>
l	Liter
$\mu\text{g}$ , $\mu\text{l}$ , $\mu\text{M}$	Mikrogramm, Mikroliter, Mikromolar
M	Molar
mA	Milliamper
MCS	<i>multi cloning site</i>
MF	Membranfraktion der Mitochondrien
mg, ml, mM	Milligramm, Milliliter, Millimolar
min	Minute
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> (Boten-) RNA
MW	Molekulargewicht ( <i>molecular weight</i> )
ng, nm	Nanogramm, Nanometer
N-terminal	Aminoterminal
Nt	<i>Nicotiana tabacum</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Phytosiderophor
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidone

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Stromaextrakt
s	Sekunde (n)
SF	lösliche Fraktion ( <i>soluble fraction</i> ) der Mitochondrien
T	Thymin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGN	<i>Tris Glycine Native</i>
TP	Transitpeptid
Tricin	N-Tris-(hydroxymethyl)-methylglycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	<i>transfer</i> -RNA
U	<i>Unit</i> , Einheit der Enzymaktivität
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen zu Volumen
Val	Valinomycin
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht zu Volumen
Zm	<i>Zea mays</i>

### Abkürzungen für Polypeptide & Proteinkomplexe

---

16 (23, 33) kDa	16 (23, 33) kDa -Untereinheit des Wasserspaltungsapparates
ATP-S.	ATP-Synthasekomplex
BFR	Bakterioferritin
CI	Komplex I der Atmungskette
CII	Komplex II der Atmungskette
CIII	Komplex III der Atmungskette
CIV	Komplex IV der Atmungskette
CV	Komplex V der Atmungskette
CoxII	Cytochrom Oxidase Untereinheit II
Cpn60	<i>Chaperonin 60</i>
Cytbf	Cytochrom b <sub>6</sub> /f-Komplex
Cytc1	Cytochrom c1
Dps	<i>DNA protection during starvation</i>

EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
FDH	Formiatdehydrogenase
Fer	Ferritin
FNR	Ferredoxin-NADP <sup>+</sup> -Reduktase
GDC-H	H-Untereinheit des Glycin-Decarboxylase Komplexes
GIP	<i>general import pore</i>
Hsp60/70/93	<i>heat shock protein 60/70/93</i>
Idh	Isocitratdehydrogenase
IMP	<i>inner membrane protease</i>
IRP	<i>iron regulatory protein</i>
LHCII	Antennenkomplex von Photosystem II
MIP	<i>mitochondrial intermediate peptidase</i>
MPP	mitochondrielle Prozessierungspeptidase
Oxa1	<i>oxidase assembly 1</i>
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
Sec	<i>secretory</i>
SPP	stromale Prozessierungspeptidase
SRP	Signalerkennungspartikel <i>signal recognition particle</i>
SSU	kleine Untereinheit der Rubisco
Tat	<i>twin arginine translocase</i>
TIC	<i>translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts</i>
TIM	<i>translocon of the inner mitochondrial membrane</i>
TOC	<i>translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts</i>
TOM	<i>translocon of the outer mitochondrial membrane</i>
TPP	Thylakoidprozessierungspeptidase
VDAC1	<i>Voltage-dependent anion-selective channel protein 1</i>

### Einbuchstaben- & (Dreibuchstaben-) Code der Aminosäuren

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

# 1 Einleitung

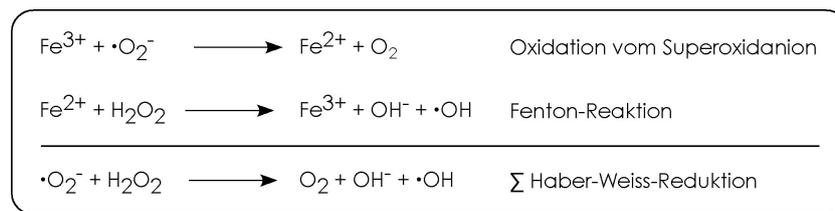
## 1.1 Eisen - ein essentielles Metall

Verschiedene Metalle sind an Stoffwechselfvorgängen beteiligt. Dazu gehören u.a. Molybdän (z.B. Nitrogenase), Magnesium (z.B. Chlorophyll), Kupfer (z.B. Plastocyanin) und Eisen (z.B. Häm). Eisen als Spurenelement ist sowohl für Tiere als auch Pflanzen essentiell. Es liegt unter anderem in Cofaktoren (z.B. Fe/S-Cluster, Häm-Gruppen) vor und ist daher maßgeblich an verschiedenen Stoffwechselfvorgängen beteiligt, beispielsweise an der Bindung von Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid am Häm des Hämoglobins. Für die biologische Nutzung steht Eisen nur begrenzt zur Verfügung. Diese Limitierung ist nicht auf die Häufigkeit des Metalls in der Erde zurückzuführen, sondern beruht auf dessen Löslichkeitseigenschaften. Eisen kommt vor allem als Eisen(III) ( $\text{Fe}^{3+}$ ) vor. Dieses ist im Gegensatz zu Eisen(II) ( $\text{Fe}^{2+}$ ) im physiologischen pH-Bereich nahezu unlöslich. Eisen(II) wird allerdings leicht zu Eisen(III) oxidiert und ist dann nicht mehr verfügbar. So beträgt die Konzentration an löslichem Eisen(III) bei pH 7 nur  $10^{-17}$  M (Theil (1987), Hell & Stephan (2003)). Eine Pflanze benötigt für Normalwachstum bereits Eisen(III)-Konzentrationen im Bereich von  $10^{-4}$ - $10^{-8}$  M (Mori (1999)).

Um den Eisenbedarf zu decken, haben Pflanzen zwei Mechanismen zur Eisenaufnahme entwickelt, welche als Strategie-I und Strategie-II bezeichnet werden (Römheld & Marschner (1986)). Alle höheren Pflanzen (z.B. *Arabidopsis thaliana*, Tomate und Erbse) mit Ausnahme der Gramineae sind Strategie-I-Pflanzen, welche sich durch drei Merkmale auszeichnen. Zum einen werden Protonen in die Rhizosphäre abgegeben, wodurch sich der pH erniedrigt und Eisen(III) besser löslich wird. Die nun verfügbaren Fe(III)-Ionen werden von membranständigen Eisen(III)chelatreduktasen zu Fe(II) reduziert und im Anschluss von spezifischen Eisentransportern der Plasmamembran in die Zellen aufgenommen (Römheld & Marschner (1986), Briat & Lobréaux (1997), Hell & Stephan (2003)). Gräser (z.B. Weizen, Gerste, Reis und Mais) gehören zu den Strategie-II Pflanzen, diese setzen chelatisierende Substanzen (Phytosiderophore, [PS]) frei. Phytosiderophore binden das im Boden vorkommende Eisen(III). Diese  $\text{Fe}^{3+}$ -PS-Komplexe werden anschließend von spezifischen Transportproteinen über die Plasmamembran transpor-

tiert.

Neben den für Stoffwechselprozesse förderlichen Eigenschaften kann Eisen die Zelle auch schädigen. Diese Wirkung zeigt sich bei der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*), welche sowohl DNA, Lipide als auch Proteine schädigen können (Briat & Lebrun (1999), Briat & Lobréaux (1997)). Bei der Reduktion von Sauerstoff zu Wasser entsteht ein Superoxidationion als Zwischenprodukt, welches Fe(III) zu Fe(II) reduzieren kann (Abb. 1.1). Im Anschluss reagiert das Fe(II) in der Fenton-Reaktion mit Wasserstoffperoxid zu Fe(III) und zum hochreaktiven Hydroxylradikal (Abb. 1.1).



**Abb. 1.1: Eisen-vermittelte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies.** Die Abbildung zeigt eine Auswahl an Reaktionen von Eisenionen mit Sauerstoffspezies (nach Staiger (2002)). Die Summe der Eisen(III)-Reduktion von Superoxidationion und der Fentonreaktion resultiert in der Entstehung eines Hydroxylradikals.

Folglich müssen ungebundene Eisenionen in lebenden Zellen vermieden werden. Dies wird durch Eisen-speichernde Proteine ermöglicht, welche überschüssige Eisenionen aufnehmen.

## 1.2 Eisen-speichernde Proteine

An der zellulären Eisenhomöostase sind die Eisen-speichernden Ferritine, Dps-Proteine (*DNA protection during starvation*) und Frataxine beteiligt. Bevor auf die in dieser Arbeit untersuchten Ferritine näher eingegangen wird, sollen zunächst Frataxine und Dps-Proteine vorgestellt werden.

Frataxine sind in die mitochondrielle Eisenspeicherung involviert und bilden Eisen-speichernde Komplexe, welche aus bis zu 48 Untereinheiten bestehen (Branda et al. (1999), Adamec et al. (2000), Cavadini et al. (2002), Gakh et al. (2002), Park et al. (2002)). Sie sind organismenübergreifend konserviert (Bakterien, Säuger, Pflanzen) und liegen in höheren Organismen als kerncodierte Mitochondrienproteine vor (Babcock et al. (1997), Koutnikova et al. (1997), Cavadini et al. (2000)). Mutationen im Frataxin-Gen führen beispielsweise beim Menschen zu einer degenerativen Erkrankung (*Friedreichs Ataxia*, Campuzano et al. (1996)). In Hefen wurde bei Frataxin-*knockout* Stämmen mittels Atomabsorptionsspektroskopie die Akkumulation von Eisen in Mitochondrien nachgewiesen (Babcock et al. (1997), Foury & Cazzalini (1997)). Des Weiteren sind Frataxine

an der Synthese von Fe/S-Clustern, sowie Häm-Guppen in Mitochondrien beteiligt (Lill & Mühlhoff (2005)). Bisherige Untersuchungen wurden vor allem mit Frataxin aus Hefe und Mensch durchgeführt. Zur Situation in Pflanzen ist dagegen wenig bekannt. In *Arabidopsis thaliana* wurde ein Gen identifiziert, welches für Frataxin codiert und das Protein aus Hefe funktionell komplementieren kann (Busi et al. (2004)). Das *Arabidopsis* Frataxin wird vor allem in Blüten und sich entwickelnden Embryos exprimiert (Busi et al. (2004), Vazzola et al. (2007)). *Arabidopsis* T-DNA-Insertionslinien zeigten, dass der Frataxin-*knockout* embryolethal ist (Busi et al. (2006), Vazzola et al. (2007)).

Dps-Proteine (*DNA protection during starvation*) wurden erstmals von Almirón et al. (1992) in *E. coli* beschrieben. Bei Anzucht unter Nährstoffmangel oder oxidativen Stress schützen Dps-Proteine die DNA vor oxidativer Schädigung (Almirón et al. (1992)). Ein Teil der Dps-Proteine ist in der Lage an DNA Moleküle zu binden, dies trifft allerdings nicht auf alle Vertreter der Dps-Familie zu (Peña & Bullerjahn (1995), Tonello et al. (1999), Papinutto et al. (2002)). Zudem zeigen Dps-Proteine Eigenschaften der Ferritine, beispielsweise Oxidation und Aufnahme von Eisen (Ren et al. (2003)). Die Verbindung zu Ferritin wurde durch die Isolierung des so genannten Listeria-Ferritins entdeckt. Dabei wurde versucht, Ferritin aus *Listeria innocua* zu isolieren. Es zeigte sich allerdings, dass das isolierte Protein deutlich kleiner als Ferritin war und anstelle der 24 nur 12 Untereinheiten besaß (Bozzi et al. (1997), Ilari et al. (2000)). Diese Komplexzusammensetzung deutete auf Dps-Proteine hin, von welchen bekannt war, dass sie aus 12 Untereinheiten aufgebaut sind (Grant et al. (1998)). Sequenzanalysen des Listeria-Ferritins zeigten Homologie zu Dps-Proteinen und nicht zu Ferritinen (Bozzi et al. (1997)). Dps-Proteine sind den Ferritinen funktionell ähnlich und werden daher auch als Mini-Ferritine bezeichnet.

## 1.3 Ferritine

### 1.3.1 Die Anfänge der Ferritinforschung

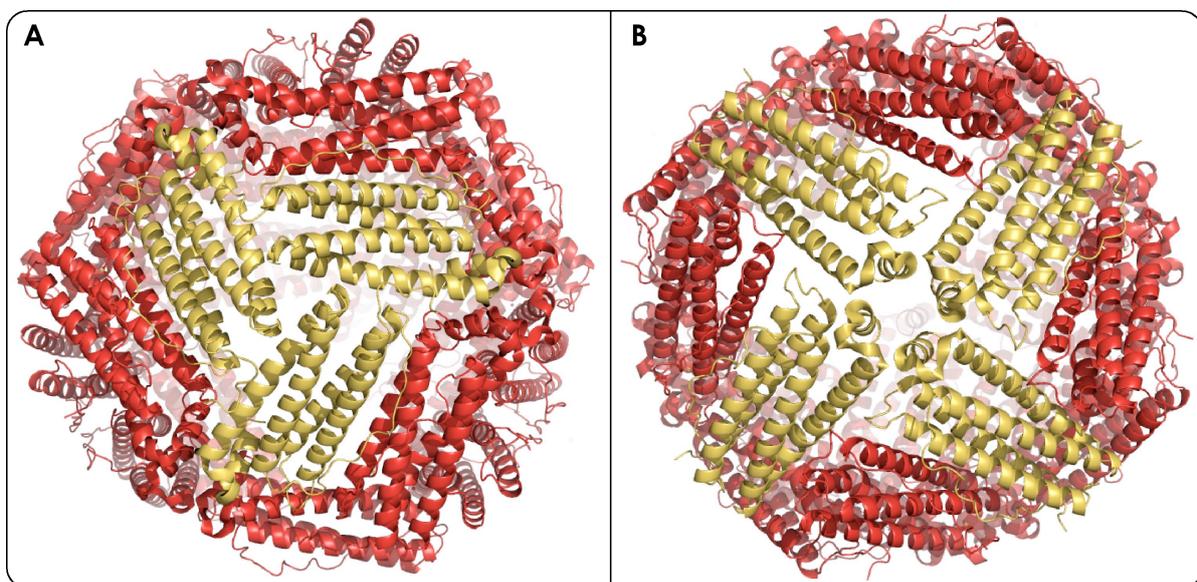
Dieses Kapitel beschäftigt sich mit den Eisen-speichernden Ferritinen. Die Anfänge der Ferritinforschung gehen bis auf die 1930iger Jahre zurück. Zu dieser Zeit wurde die Isolierung von Ferritin aus Pferdemiilz beschrieben (Laufberger (1937)). Aufgrund des hohen Eisengehaltes (20 % des Trockengewichts) wurde der Name Ferritin für dieses Protein geprägt. Diese Arbeiten konnten von Kuhn et al. (1940) bestätigt werden, wobei diese vermuteten, dass Eisen von Ferritin eingelagert wird. Granick & Michaelis (1943) zeigten, dass Eisen aus Ferritin entfernt werden kann. So war es möglich, das mit Eisen beladene, braune Ferritin in ein eisenfreies, farbloses Apoferritin zu überführen. Erste Röntgenbeugungsanalysen von Ferritin und Apoferritin wurden bereits 1943 durch-

geführt und zeigten keine strukturellen Unterschiede zwischen beiden Molekülen (Fankuchen (1943)). Diese und andere Studien legten den Grundstein zum heutigen Wissen über Ferritin (Granick (1942), Fankuchen (1943), Granick & Michaelis (1943), Granick (1943), Greenberg et al. (1943), Hahn et al. (1943), Michaelis et al. (1943), Granick & Hahn (1944), Granick (1946)).

### 1.3.2 Aufbau und Funktion von Ferritinen

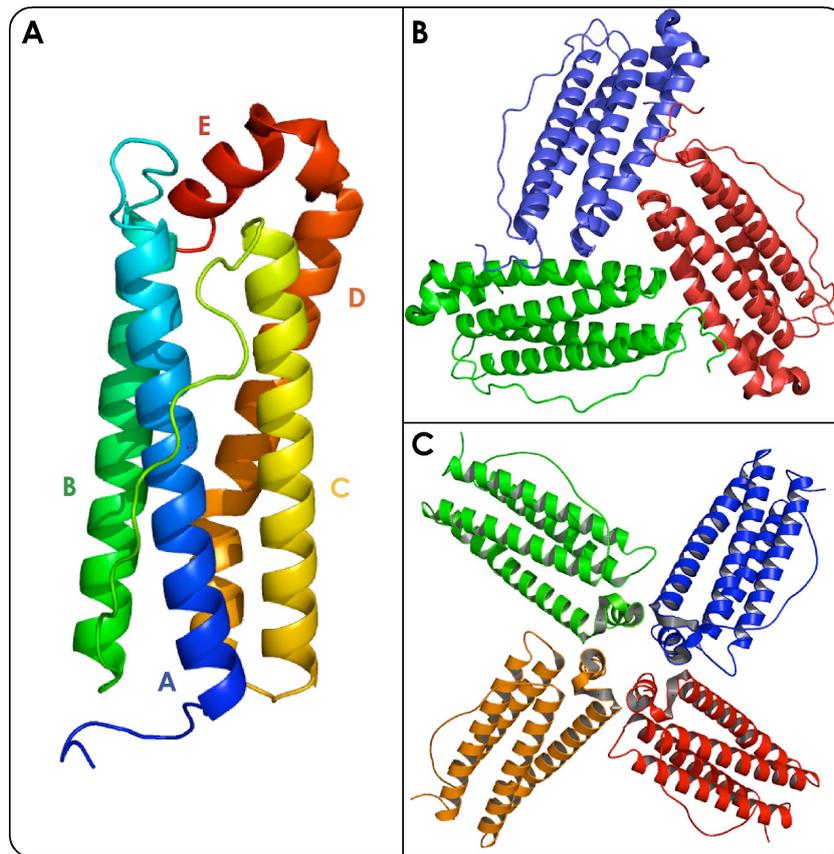
Ferritine sind stark konservierte und weit verbreitete Proteine. Sie kommen in Bakterien, Säugern und Pflanzen vor. Die einzige Ausnahme bildet dabei Hefe, welcher entsprechende homologe Gene fehlen (Theil (2004)).

Allen Ferritinen ist die Fähigkeit der Eisenspeicherung gemein und damit verbunden der Schutz der Zellen vor Eisen-bedingtem oxidativem Stress (vgl. Abschnitt 1.1). Diese Funktion wird von Ferritinkomplexen bewerkstelligt, welche aus 24 Ferritin-Untereinheiten aufgebaut sind und sowohl Homo- als auch Heteropolymere sein können (Abb. 1.2). Diese werden auch als *nano cage* (Nanokäfig), *spherical protein cage* (kugeliger Proteinkäfig) oder *hollow sphere* (Hohlkörper) bezeichnet.



**Abb. 1.2: Struktur der Ferritinkomplexe.** Gezeigt ist der Blick auf die *3-fold* (A) bzw. *4-fold channel* (B) des Ferritinkomplexes bestehend aus 24 Untereinheiten. Die porenbildenden Untereinheiten sind in gelb dargestellt. Die Strukturaufnahmen stellen das humane H-Ketten-Ferritin dar (*Protein Data Bank* [<http://www.pdb.org>], *accession number*: 2FHA). Die zugrunde liegenden Strukturdaten stammen aus der Veröffentlichung von Hempstead et al. (1997).

Innerhalb dieses Hohlkörpers, der ca. 120 Å im Außen- und ca. 80 Å im Innendurchmesser beträgt, wird Eisen eingelagert. Strukturuntersuchungen ergaben, dass eine Ferritin-Untereinheit (Größe ca. 20 kDa) insgesamt fünf  $\alpha$ -Helices ausbildet (Arosio et al. (1978)).



**Abb. 1.3: Darstellung der Struktur von Ferritin-Untereinheiten.** In (A) sind die fünf Helices (Helix A-E) einer Ferritin-Untereinheit dargestellt. Man erkennt, dass Helices A-D bündelartig angeordnet sind. Die porenbildenden Ferritin-Untereinheiten wurden zur besseren Veranschaulichung in (B) drei Untereinheiten (*3-fold channel*) und (C) vier Untereinheiten (*4-fold channel*) gezeigt. Weitere Details siehe Abbildung 1.2

Die ersten vier Helices (Helix A-D) liegen als „Bündel“ nebeneinander. Die kleinste Helix (E-Helix) ist zu diesem um  $60^\circ$  geneigt (Abb. 1.3, (A), Trikha et al. (1995), Hempstead et al. (1997), Takagi et al. (1998)). Im assemblierten Ferritin-Komplex von ca. 450 kDa entstehen an den Kontaktstellen zwischen drei bzw. vier Untereinheiten so genannte *3-fold* bzw. *4-fold channels* (Abb. 1.2, A bzw. B und 1.3, B bzw. C). In jedem Ferritinkomplex gibt es acht der *3-fold channels* mit überwiegend hydrophilem Charakter und sechs der *4-fold channels*, die vorwiegend aus hydrophoben Aminosäureresten bestehen (Harrison & Arosio (1996)). Eisen wird sehr wahrscheinlich über die hydrophilen Poren der *3-fold channels* aufgenommen (Stefanini et al. (1989), Lawson et al. (1991), Hempstead et al. (1997)). Diese Vermutung wird durch die experimentell nachgewiesene Metallionenbindung gestützt (Wardeska et al. (1986), Lawson et al. (1991)).

Eisen wird als Fe(II) aufgenommen und vom Ferroxidase-Zentrum der Ferritin-Untereinheiten zu Fe(III) oxidiert (Levi et al. (1988), Levi et al. (1989), Levi et al. (1992), Treffry et al. (1993), Treffry et al. (1995)). Der so gebildete mineralische Kern besteht aus Eisen(III)-Hydroxid (Ferrihydrat) mit unterschiedlichen Mengen an Phosphat (Roh-

rer et al. (1990), Chasteen & Harrison (1999)). Die theoretische, maximale Kapazität eines Ferritinkomplexes beträgt 4500 Eisen-Atome (in Form von Ferrihydrat). Von dieser weichen die experimentell ermittelten Werte ab und unterscheiden sich zwischen verschiedenen Organismengruppen (Übersicht siehe Chasteen & Harrison (1999) und Lewin et al. (2005)).

### 1.3.3 Bakteriellles Ferritin

Bakterien besitzen neben den bereits erwähnten Dps Proteinen auch Ferritin. Dabei können zwei Arten unterschieden werden: bakteriellles Ferritin und Bakterioferritin (BFR). Beide bilden Ferritinkomplexe bestehend aus 24 Ferritin-Untereinheiten, welche für die Eisenspeicherung verantwortlich sind. Das bakterielle Ferritin zeigt große Ähnlichkeit zu tierischen bzw. humanen Ferritinen, dabei insbesondere zum humanen H-Ketten Ferritin.

Stiefel & Watt (1979) entdeckten das im Bakterienreich weit verbreitete Bakterioferritin, dessen Besonderheit in der zusätzlichen Bindung von Häm-Gruppen liegt. So bindet beispielsweise das *E. coli* BFR (EcBFR) bis zu 12 Protoporphyrin IX-Gruppen (Cheesman et al. (1990), George et al. (1993), Frolow et al. (1994)).

### 1.3.4 Tierisches Ferritin

Die meisten Untersuchungen im Bereich der Ferritine liegen zu tierischen bzw. humanen Vertretern vor. Es ist bekannt, dass die tierischen Ferritinkomplexe Heteropolymere sind, die aus den H-Ketten- (*heavy chain*) und L-Ketten- (*light chain*) Ferritin-Untereinheiten bestehen. Das Verhältnis der H- und L-Ferritine im Komplex ändert sich gewebeabhängig (Arosio et al. (1978), Harrison & Arosio (1996)). H- und L-Ferritin sind sich strukturell ähnlich, weisen aber funktionelle Unterschiede auf. Während H-Ferritin das Ferroxidase-Zentrum zur Oxidation von Fe(II) zu Fe(III) trägt (Lawson et al. (1991)), fehlt diese in L-Ketten-Ferritin (Gallois et al. (1997)). Dagegen bildet L-Ferritin stabilere Komplexe aus (Gallois et al. (1997)). Zudem weisen L-Ketten reiche Komplexe eine insgesamt langsamere Oxidation von Fe(II) auf (Chasteen & Harrison (1999)).

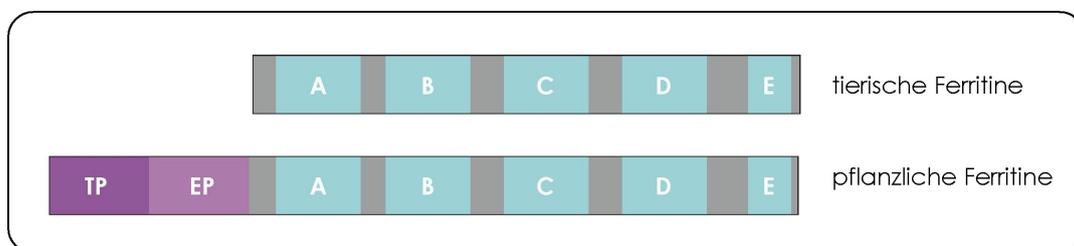
Die Ferritine liegen gewöhnlich im Cytosol vor, daneben wurden inzwischen auch humane Ferritine in Mitochondrien identifiziert (Levi et al. (2001)). Zu diesen existieren Homologe in Primaten, Ratte und Maus (Drysdale et al. (2002)). Das mitochondrielle Ferritin ist kerncodiert und besitzt eine N-terminale Transportsequenz, welche den Import in Mitochondrien vermittelt (Levi et al. (2001)). Im Vergleich zu den cytosolischen H- und L-Ketten-Ferritinen weist das mitochondrielle die größte Ähnlichkeit zu H-Ferritin auf (Drysdale et al. (2002), Levi & Arosio (2004)). Die beobachtete Expression dieses Ferritins beschränkt sich auf ausgewählte Gewebe, wie z.B. Testis und Spermatozoen (Levi &

Arosio (2004)). Interessanterweise kann das humane mitochondrielle Ferritin Frataxin-defiziente Hefen komplementieren (Campanella et al. (2004)). Dies zeigt auch, dass das mitochondrielle Ferritin in Hefemitochondrien transportiert wird (vgl. Abschnitt 1.2).

Die Regulation der humanen, cytosolischen Ferritine ist gut untersucht und findet sowohl auf transkriptioneller als auch auf translationeller Ebene statt (Tsuji et al. (2000), Eisenstein (2000), Torti & Torti (2002), Hentze et al. (2004), Hintze & Theil (2005)).

### 1.3.5 Pflanzliches Ferritin

In Pflanzen wurden Ferritine zunächst durch mikroskopische Untersuchungen identifiziert (Hyde et al. (1963), Seckbach (1968), Seckbach (1972)). Später konnten Ferritine u.a. aus Erbsen (*Pisum sativum*), Linsen (*Lens esculenta*), Mais (*Zea mays*) sowie Sojabohne (*Glycine max*) isoliert werden (Crichton et al. (1978), Laulhere et al. (1988)). Des Weiteren wurde pflanzliches Ferritin sowohl in Kuhbohne (*Vigna unguiculata*, Wardrop et al. (1999)) als auch in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen (Gaymard et al. (1996), Petit et al. (2001a)). Interessanterweise zeigte sich, dass die isolierten pflanzlichen Ferritine ein höheres Molekulargewicht aufweisen als die entsprechenden tierischen Ferritine. Dieser Größenunterschied betraf sowohl die Untereinheiten als auch den Ferritinkomplex (Crichton et al. (1978)). Vergleichende Sequenzanalysen pflanzlicher und tierischer Ferritine zeigten, dass pflanzliche Ferritine Ähnlichkeiten zu Mammalia Ferritinen aufweisen (Ragland et al. (1990), Spence et al. (1991), Proudhon et al. (1996)). Die pflanzlichen Ferritine enthalten Eigenschaften sowohl der H-Ketten- als auch L-Ketten-Ferritine, wobei die größte Homologie zum H-Ferritin besteht (Ragland et al. (1990)). Darüberhinaus tragen pflanzliche Ferritine am Aminoterminus einen zusätzlichen Sequenzabschnitt, welcher bei tierischen Ferritinen nicht vorhanden ist. Dieses *extension peptide* (Extensionspeptid, EP) ist Teil des reifen Proteins und für den beobachteten Größenunterschied verantwortlich (Abb. 1.4, Ragland et al. (1990)).



**Abb. 1.4: Vergleich von tierischem und pflanzlichem Ferritin.** Gezeigt ist der schematische Aufbau von tierischem und pflanzlichem Ferritin. Die fünf  $\alpha$ -Helices (A-E) sind blau unterlegt. Am Aminoterminus pflanzlicher Ferritine befindet sich eine Verlängerung. Der erste Teil entspricht dem Transitpeptid (TP) und der zweite Teil dem Extensionspeptid (EP, *extension peptide*), welches Teil der reifen Proteine ist.

Des Weiteren sind pflanzliche Ferritine kerncodiert und wahrscheinlich plastidär lokalisiert (van der Mark et al. (1983a), van der Mark et al. (1983b), van der Mark et al. (1983c)). Daher tragen diese Proteine am Aminoterminus zusätzlich zum Extensionspeptid ein so genanntes Transitpeptid (TP), welches den Transport ins Organell vermittelt (Abb. 1.4, Ragland et al. (1990)).

Ferritine aus Pflanzen kommen als Genfamilien vor. So wurden in Kuhbohne und Sojabohne je fünf Mitglieder (Wicks & Entsch (1993), Wardrop et al. (1999), Dong et al. (2008)) und in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* je vier Vertreter identifiziert (Petit et al. (2001a)). Pflanzliche Ferritinkomplexe bestehen aus Ferritin-Untereinheiten verschiedener Größe (Laulhere et al. (1988), Laulhere et al. (1989)). Diese können zum einen unterschiedliche Ferritine sein (Wardrop et al. (1999), Masuda et al. (2001), Dong et al. (2007)) und zum andern durch proteolytische Spaltung von Ferritin-Untereinheiten entstehen (Laulhere et al. (1989), Dong et al. (2007)). Die isolierten Ferritinkomplexe verschiedener Pflanzen liegen im Größenbereich von 550-600 kDa (Sczekan & Joshi (1987), Laulhere et al. (1988), Lescure et al. (1990), van Wuytswinkel et al. (1995), van Wuytswinkel & Briat (1995), Masuda et al. (2007)) und sind damit deutlich größer als die entsprechenden tierischen Ferritinkomplexe (430-480 kDa, Rothen (1944), Richter & Walker (1967), Bjork & Fish (1971), Crichton et al. (1973)). Bislang liegen ausschließlich Strukturen von tierischen Ferritinkomplexen vor. Anhand des H-Ketten-Ferritins wurde die Struktur des Erbsenferritins mit den entsprechenden Veränderungen modelliert (Lobréaux et al. (1992b)). Der Aufbau beider Komplexe ist sehr ähnlich. Das Erbsenferritin unterscheidet sich zum einen durch das zusätzliche Extensionspeptid, welches vermutlich teilweise eine  $\alpha$ -Helix ausbildet (P-Helix) und an der Oberfläche des Komplexes lokalisiert ist. Zum anderen ergeben sich Unterschiede bezüglich der *4-fold channels*, welche beim Erbsenferritin hydrophil und bei tierischen Ferritinen hydrophob vorliegen (Lobréaux et al. (1992b)).

Die Transkript-Akkumulation pflanzlicher Ferritine ist eiseninduziert und wurde u.a. mit Mais, Sojabohne, Tabak und *Arabidopsis thaliana* (AtFer1 und AtFer3) gezeigt (Proudhon et al. (1989), Lescure et al. (1991), Lobréaux et al. (1992a), Lobréaux et al. (1995), Gaymard et al. (1996), Petit et al. (2001b), Petit et al. (2001a), Jiang (2005)). In Mais wurde das entsprechende Ferritin ebenfalls immunologisch nachgewiesen. Dabei zeigte sich dass die mRNA Akkumulation mit der Ferritinsynthese korreliert (Lobréaux et al. (1992a)). Die Expression der mRNA pflanzlicher Ferritine wurde in verschiedenen Geweben gezeigt und ist in Tabelle 1.1 als Übersicht dargestellt. Eine systematische Untersuchung der Expression wurde für die vier *Arabidopsis* Ferritine durchgeführt (Petit et al. (2001a)). Dabei zeigte sich eine Expression der einzelnen Vertreter in unterschiedlichen Pflanzenorganen (siehe Tab. 1.1).

**Tab. 1.1: Übersicht der Expressionsanalysen pflanzlicher Ferritine.**

Pflanze	Ferritin	Expressionsort	Referenz
Erbse		Blüten, Schoten, Samen	Lobréaux & Briat (1991)
Tabak	NtFer1 NtFer2	Blätter, Wurzel Blätter	Jiang (2005)
<i>A. thaliana</i>	AtFer1 AtFer2 AtFer3 AtFer4	Blüte, vegetative Organe Rosettenblätter Samen, während Keimung Blüte, vegetative Organe, Rosettenblätter Blüte, vegetative Organe	Petit et al. (2001a)

Die Regulation der Ferritinexpression in Pflanzen ist weniger gut untersucht als bei Säugern. Es konnte gezeigt werden, dass pflanzliche Ferritine anders als bei Tieren nur auf Transkriptionsebene reguliert werden (Briat et al. (1999)). Umwelteinflüsse wie beispielsweise Eisen oder Wasserstoffperoxid können die Ferritinexpression induzieren (Arnaud et al. (2006)). Die eisenabhängige Expression beruht dabei wahrscheinlich auf eiseninduziertem oxidativen Stress, da Antioxidantien eine eiseninduzierte Genexpression von Mais-Ferritin inhibieren können (ZmFer1, Lobréaux et al. (1995), Savino et al. (1997)). Weiterhin fördern auch Oxidantien wie Wasserstoffperoxid die Ferritintranskriptakkumulation und wirken in Kombination mit Eisengabe additiv (Lobréaux et al. (1995), Savino et al. (1997)). Eisen führt zudem zur Bildung von Abscisinsäure (ABA), welche zur Transkriptakkumulation bestimmter Ferritine beiträgt (Lobréaux et al. (1993), Fobis-Loisy et al. (1995), Petit et al. (2001a)). So wird in Mais die Genexpression von ZmFer2, nicht aber ZmFer1, ABA-abhängig induziert, zusätzlich sind beide Transkripte eiseninduziert (Lobréaux et al. (1992a), Fobis-Loisy et al. (1995)). In *Arabidopsis thaliana* wird AtFer1, welches analog zu ZmFer1 ist, ebenfalls nur durch Eisen reguliert (Gaymard et al. (1996)). AtFer2, AtFer3 und AtFer4 werden hingegen unter Starklichtbedingungen verstärkt exprimiert (Tarantino et al. (2003)).

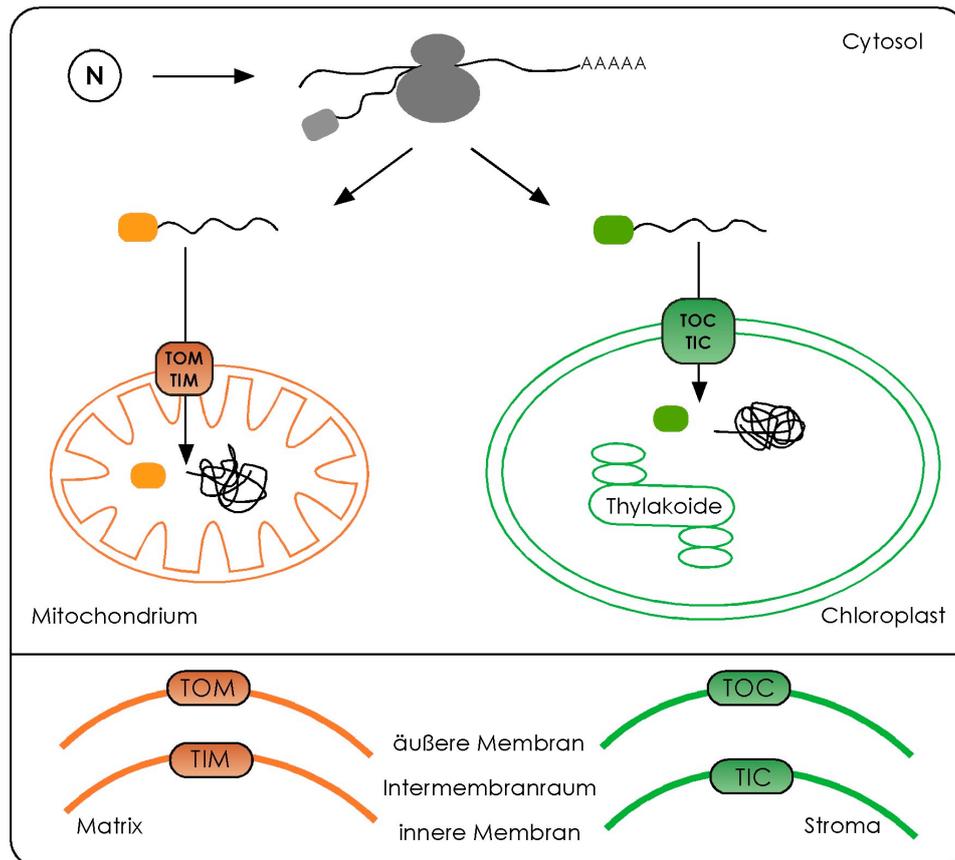
An der Regulation der Pflanzenferritine sind eisenabhängige Promotorsequenzen beteiligt (Wei & Theil (2000), Petit et al. (2001b)). Bisher wurden zwei verschiedene Sequenzabschnitte identifiziert. Zum einen das FRE (*iron regulatory element*) im Ferritinpromotor der Sojabohne (Wei & Theil (2000)) und zum anderen das IDRS (*iron-dependent regulatory sequence*) in Mais und *Arabidopsis thaliana* (Petit et al. (2001b)). Letzteres reprimiert die Expression der ZmFer1- und AtFer1-Gene (Petit et al. (2001b)). Das IDRS von AtFer1 vermittelt zudem eine Expression des Gens in frühen Stadien der Seneszenz (Tarantino et al. (2003)) und ist an der Stickstoffmonoxid induzierten Ferritinexpression in *Arabidopsis thaliana* beteiligt (Murgia et al. (2002), Arnaud et al. (2006)).

Während tierische Ferritine auch auf translationeller Ebene durch das so genannte *iron response element* (IRE) der Ferritin mRNA reguliert werden (Sierzputowska-Gracz et al. (1995), Address et al. (1997), Gdaniec et al. (1998), Ke et al. (2000)), fehlen diese Mechanismen bei Pflanzen (Arnaud et al. (2007)). Zudem konnten keine homologen Proteine zu den an die IRE-Bereiche bindenden Repressorproteinen (IRP1 und IRP2, *iron regulatory protein*) identifiziert werden (Arnaud et al. (2007)).

## 1.4 Proteintransport in endosymbiontische Organellen

Ferritine sind kerncodierte Proteine, welche im Cytosol (bakterielle und tierische Ferritine), in Mitochondrien (mitochondrielle, tierische Ferritine) und wahrscheinlich in Plastiden (pflanzliche Ferritine) lokalisiert sind. Kerncodierte Organellproteine müssen nach ihrer Synthese im Cytosol in das entsprechende Zellorganell transportiert werden (Abb. 1.5). Die Transportapparate der beiden endosymbiontischen Pflanzenorganellen, Mitochondrien und Chloroplasten, werden daher kurz vorgestellt.

In Pflanzenzellen entwickelten sich die Organellen in zwei aufeinanderfolgenden endosymbiontischen Ereignissen. Zuerst wurde der Vorläufer der Mitochondrien, ein  $\alpha$ -Proteobakterium, aufgenommen (Gray (1999), Dyall et al. (2004)). In einem zweiten Endosymbiosevorgang erfolgte die Aufnahme des Chloroplastenvorgängers, bei welchem es sich vermutlich um ein Cyanobakterium handelte (Cavalier-Smith (2000), Cavalier-Smith (2002), Dyall et al. (2004)). Der im Laufe des Endosymbiosevorgangs erfolgte umfangreiche Gentransfer führte zu einer Verlagerung der Organellgene in den Zellkern. Daher müssen die nun kerncodierten Proteine an ihren Wirkort transportiert werden. Voraussetzung für einen solchen Transport ist zum einen die Generierung von organellspezifischen Transportsignalen und zum anderen die Entwicklung entsprechender Transportkomplexe. Daher werden kerncodierte Organellproteine im Cytosol als Vorläuferproteine synthetisiert. Diese tragen am Aminoterminus ein Transportsignal, welches die Information für die organell-vermittelte Erkennung enthält. Die Transportkomplexe der Mitochondrien werden als TOM- (*translocon of the outer mitochondrial membrane*) bzw. TIM-Komplex (*translocon of the inner mitochondrial membrane*) und die Transportapparate der Plastiden als TOC- (*translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts*) bzw. TIC-Komplex (*translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts*) bezeichnet (Abb. 1.5).



**Abb. 1.5: Transport kerncodierter Organellproteine in Pflanzenzellen.** Im Kern (N) codierte Proteine der Mitochondrien bzw. Chloroplasten werden im Cytosol mit einer aminoterminalen Verlängerung (TP, Transitpeptid) translatiert, diese ist für den Transport ins jeweilige Organell verantwortlich. Mitochondrielle Vorläuferproteine werden über den TOM-/TIM-Komplex (*translocon of the outer/inner mitochondrial membrane*) der äußeren bzw. inneren Mitochondrienmembran in die Mitochondrien transportiert. Der TOC-/TIC-Komplex (*translocon at the outer/inner envelope membrane of chloroplasts*) der äußeren bzw. inneren Hüllmembran der Chloroplasten importiert plastidäre Vorstufenproteine in die Plastiden.

### 1.4.1 Proteintransportkomplexe der Mitochondrien und Chloroplasten

Die Struktur der Transportkomplexe sowie der Importmechanismus der Mitochondrien wurde zuerst an Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) aufgeklärt. Der pflanzliche mitochondrielle Importapparat ist dagegen weniger gut untersucht und unterscheidet sich teilweise stark vom Komplex aus Hefen und Tieren. So weist insbesondere der Aufbau des TOM-Komplexes in Pflanzen größere Unterschiede auf (Macasev et al. (2000), Macasev et al. (2004), Lister & Whelan (2006), Perry et al. (2006)). Dagegen sind die Komponenten des TIM-Komplexes verschiedener Organismen konserviert (Lister et al. (2003), Lister et al. (2004)). Im Folgenden werden die TOM- und TIM-Komplexe aus Hefe und Pflanzen vorgestellt. Dabei sollen vor allem die Unterschiede zwischen beiden herausgestellt werden.

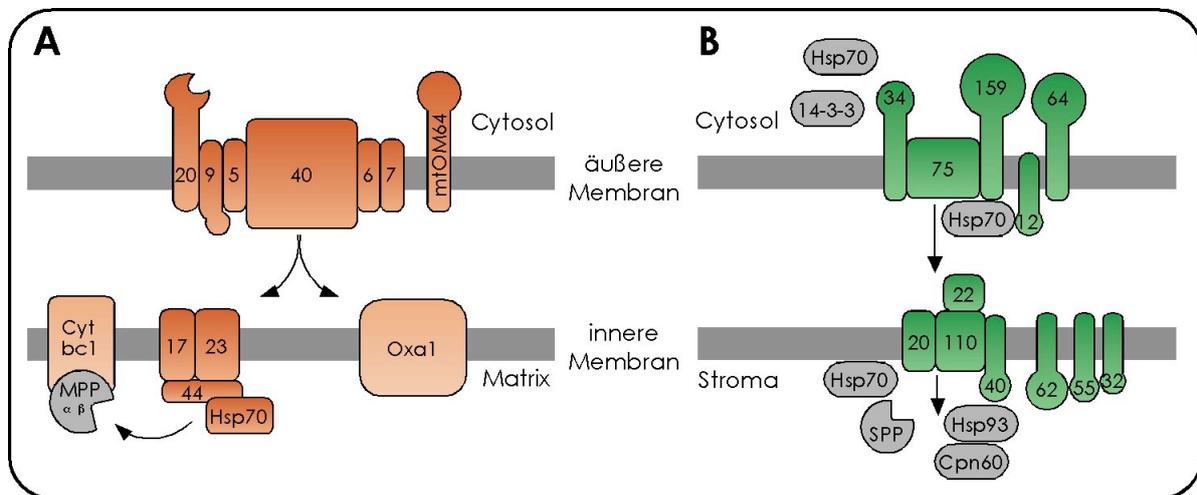
Der TOM-Komplex besteht aus Rezeptorproteinen und dem TOM-*core*-Komplex, welcher auch als *general import pore* (GIP) bezeichnet wird. Der TOM-*core*-Komplex aus Hefe besteht aus den integralen Membranproteinen Tom40, Tom22, Tom7, Tom6 und Tom5 (Ahting et al. (1999)). Als Rezeptorproteine wurden Tom20 sowie Tom70 identifiziert (Dekker et al. (1998), Meisinger et al. (2001)). Die Erkennung mitochondrialer Vorläuferproteine wird durch die cytosolischen Domänen beider Rezeptorproteine (Tom20, Tom70) und Tom22 vermittelt (Söllner et al. (1990), Ramage et al. (1993), Chan et al. (2006)). Im Anschluss daran werden die Proteine mit Hilfe des TOM-*core*-Komplexes über die äußere Membran transportiert. In Pflanzen wurden homologe Proteine zu Tom40, Tom22 und Tom7 gefunden (Perryman et al. (1995), Jänsch et al. (1998), Macasev et al. (2000), Macasev et al. (2004)), sowie potentielle Tom6- und Tom5-Vertreter (Abb. 1.6, Lister et al. (2003)). Dagegen konnten zu den Tom70- und Tom20-Rezeptoren keine pflanzlichen Homologe identifiziert werden (Likic et al. (2005), Chan et al. (2006), Perry et al. (2006)). Das zu Tom22 homologe, pflanzliche Protein ist Tom9, welches aufgrund der fehlenden *cis*-Domäne stark verkürzt vorliegt (Perryman et al. (1995), Jänsch et al. (1998), Macasev et al. (2004)). In Pflanzen wurde ein ca. 20 kDa großes Tom-Protein (Tom20) identifiziert, welches die gleiche Funktion wie das tierische Tom20 übernimmt, aber zu diesem nicht homolog ist (Heins & Schmitz (1996), Werhahn et al. (2001), Perry et al. (2005), Perry et al. (2006)). Zum Tom70-Rezeptor scheinen keine pflanzlichen Homologe zu existieren (Perry et al. (2008)). Eine dem Tom70-ähnliche Funktion wird für mtOM64 diskutiert (Chew et al. (2004)).

In Hefen wurden zwei TIM-Komplexe, der TIM23- und der TIM22-Komplex, nachgewiesen. Der TIM23-Komplex besteht aus den Proteinen Tim50, Tim44, Tim23, Tim21, Tim17 und Hsp70. Dieser ist für den Transport von Vorläuferproteinen mit abspaltbarer Transportsequenz über die innere Membran verantwortlich (Berthold et al. (1995)). Die Öffnung der Importpore, bestehend aus Tim17 und Tim23, ist abhängig vom elektrochemischen Gradienten über die innere Mitochondrienmembran (Rassow et al. (1999)). Des Weiteren arbeitet Tim44 zusammen mit mitochondrialem Hsp70 als Importmotor (Schneider et al. (1994)). Dabei wird das Vorstufenprotein unter ATP-Verbrauch durch die Importpore „gezogen“ (Neupert & Herrmann (2007)). Die Aufgabe von Tim50 ist vermutlich die Weitergabe des im Intermembranraum ankommenden Vorstufenproteins zum TIM23-Komplex. Das Tim21-Protein stellt das Bindeglied zwischen TOM- und TIM23-Komplex dar und kann mit Tom22-Domänen interagieren (Neupert & Herrmann (2007)). Die Insertion hydrophober *Carrier*-Proteine in die innere Membran wird vom TIM22-Komplex bewerkstelligt (Kerscher et al. (1997), Koehler et al. (1998), Adam et al. (1999)). Dieser besteht in Hefe aus Tim22, Tim54, Tim18, sowie peripher assoziierter kleiner Tim-Proteine (Tim8, Tim9, Tim10, Tim12, Tim13, Gentle et al. (2007), Neupert & Herrmann (2007)). In Pflanzen wurde ein TIM23-homologer Komplex nachgewiesen

(Abb. 1.6). Zum TIM22-Komplex wurde dagegen nur ein dem Tim22 homologes Protein im Genom von *Arabidopsis thaliana* gefunden, allerdings fehlen die am TIM22-Komplex beteiligten Proteine Tim54, Tim18 und Tim12 (Murcha et al. (2005), Gentle et al. (2007)). Dies deutet auf einen anderen Insertionsmechanismus von *Carrier*-Proteinen in die innere Membran pflanzlicher Mitochondrien hin.

Das Oxa1-Protein (*oxidase assembly*) stellt eine weitere Komponente der inneren Membran dar und ist für die Insertion von Membranproteinen in diese verantwortlich (Hell et al. (1997)). Homologe dieses Proteins kommen sowohl in Hefen als auch Pflanzen vor (Abb. 1.6, Hamel et al. (1997)).

Nach erfolgtem Transport in die Matrix wird das Transportsignal des Vorstufenproteins abgespalten. Diese Prozessierung erfolgt durch die MPP (mitochondrielle Prozessierungspeptidase). 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 et al. (1992b), Braun et al. (1995), Glaser & Desi (1999)). In Mitochondrien existieren noch weitere Prozessierungspeptidasen, die IMP (*inner membrane protease*) und die MIP (*mitochondrial intermediate peptidase*) (Schneider et al. (1991), Kalousek et al. (1992)).



**Abb. 1.6: Schematische Darstellung der pflanzlichen Proteintransportkomplexe.** In (A) sind die Komponenten des mitochondrialen Transportapparates (TOM/TIM) und in (B) die plastidären Komplexe (TOC/TIC) gezeigt. Die Darstellung der TOM/TIM-Komplexe erfolgte nach Braun & Schmitz (1999), Lister & Whelan (2006) und Perry et al. (2008). Nach Inaba & Schnell (2008) und Jarvis (2008) wurde das Schema der TOC/TIC-Komplexe erstellt.

Die Proteintransportkomplexe der Chloroplasten, der TOC- bzw. TIC-Komplex, wurden erstmals aus Erbse isoliert (Hirsch et al. (1994), Kessler et al. (1994), Perry & Keegstra (1994), Schnell et al. (1994), Wu et al. (1994), Tranel et al. (1995)). Der TOC-Komplex der äußeren Hüllmembran besteht aus der Transportpore, Toc75, und

den beiden Rezeptorproteinen Toc159 und Toc34 (Hirsch et al. (1994), Kessler et al. (1994), Perry & Keegstra (1994), Ma et al. (1996)), sowie dem Toc64 und dem Toc12-Protein (Becker et al. (2004), Qbadou et al. (2006), Qbadou et al. (2007)). Des Weiteren wurden für einige Vorstufenproteine eine Interaktion mit dem *guidance*-Komplex, bestehend aus 14-3-3-Proteinen und Hsp70, nachgewiesen (May & Soll (2000)). In einem ersten energieunabhängigen Schritt erfolgt die Bindung der Vorstufenproteine an die Toc-Rezeptorproteine (Perry & Keegstra (1994), Ma et al. (1996)). Im sich anschließenden Schritt wird Energie (GTP, ATP) für die Translokation benötigt (Olsen et al. (1989), Olsen & Keegstra (1992), Kouranov & Schnell (1997), Young et al. (1999)). Der weitere Transport erfolgt über den TIC-Komplex, welcher mit dem TOC-Komplex interagiert (Schnell & Blobel (1993), Akita et al. (1997), Becker et al. (2004)). Die am TIC-Komplex beteiligten Proteine sind Tic110, Tic40, Tic55, Tic62, Tic32, Tic22 und Tic20. Es gibt Hinweise darauf, dass sowohl Tic110 als auch Tic20 Teil des Translokationskanals sind (Kouranov et al. (1998), Chen et al. (2002), Heins et al. (2002)). Als *Co-Chaperone* fungiert Tic40, ein integrales Membranprotein (Lübeck et al. (1996), Akita et al. (1997), Chou et al. (2003)). Das lösliche Tic22 befindet sich im Intermembranraum und ist am Transportprozess beteiligt (Kouranov & Schnell (1997), Kouranov et al. (1998)). Die mit dem TIC-Komplex assoziierten Proteine (Tic55, Tic62, Tic32) sind Redoxproteine. Diese sind vermutlich an der Regulation des Proteintransports beteiligt (Caliebe et al. (1997), Kückler et al. (2002), Hörmann et al. (2004), Kessler & Schnell (2006)). Auf der stromalen Seite sind Hsp93 und Cpn60 gebunden, beide tragen unter ATP-Verbrauch zur Translokation des Vorläuferproteins bei (Pain & Blobel (1987), Theg et al. (1989), Olsen & Keegstra (1992), Akita et al. (1997), Nielsen et al. (1997)). Das Transport-signal des Vorstufenproteins wird im Stroma von der stromalen Prozessierungspeptidase (SPP) abgespalten, und das reife Protein entsteht (Richter & Lamppa (1998), Richter & Lamppa (2003)). Der Transportprozess für stromale Proteine ist damit beendet. Dagegen müssen Thylakoidproteine zusätzlich in die Thylakoide transportiert werden. Dies erfolgt auf einem von vier bekannten Wegen. Diese werden als SRP-, Sec-abhängiger, Tat-abhängiger bzw. spontaner Weg bezeichnet (Übersicht in Gutensohn et al. (2006) und Schünemann (2007)).

### 1.4.2 *Dual targeting* in Pflanzenzellen

Die Lokalisierung von Proteinen innerhalb der Zelle wird durch deren Proteinsequenz festgelegt, welche Signale für den Transport zum Zielort enthalten können. Die Mehrzahl der Proteine besitzt nur einen Zielort. Abweichend davon wurden Proteine mit mehreren Zielorten bzw. Zielorganellen identifiziert. Man unterscheidet Proteine mit mehr als zwei Zielorten (*multiple targeting*) und Proteine mit dualer Lokalisierung (*dual targeting*) (Small et al. (1998), Silva-Filho (2003), Millar et al. (2006)). Eine Form

von *dual targeting* ist die Lokalisierung in beiden endosymbiontischen Organellen, den Mitochondrien und Chloroplasten. Dual lokalisierte Proteine sind beispielsweise viele Aminoacyl-tRNA-Synthetasen oder an Organellreplikation bzw. -transkription beteiligte Proteine (Small et al. (1998), Duchêne et al. (2005)). Die duale Organelllokalisierung wird entweder durch zusammengesetzte (*twin*) oder durch gemischte (*ambiguous*) Transportsignale vermittelt. Zusammengesetzte Transportsignale bestehen aus nacheinander angeordneten mitochondriellen und plastidären Signalen (Peeters & Small (2001), Mackenzie (2005)). Durch alternative Transkription, alternatives *splicing* bzw. alternative Translation können aus einem Gen zwei Proteine gebildet werden, welche unterschiedliche aminoterminalen Transportsignale tragen (Peeters & Small (2001)). Dagegen wird bei gemischten Transportsignalen nur ein Vorläuferprotein synthetisiert. Dessen Transportsignal ist in der Lage, sowohl den Import in die Mitochondrien als auch den Import in die Chloroplasten zu vermitteln (Small et al. (1998), Peeters & Small (2001)). Zur Funktionsweise der gemischten Transportsignale wurden zwei Mechanismen vorgeschlagen (Peeters & Small (2001)). Einerseits könnten diese Signale durch einen Rezeptor erkannt werden, welcher in beiden Organellen vorhanden ist. Andererseits ist es möglich, dass gemischte Transportsignale Eigenschaften von mitochondriellen und plastidären Signalen tragen und daher von den bekannten Importapparaten beider Organellen erkannt werden. Letztere Merkmale konnten bereits in gemischten Transportsignalen gezeigt werden (Peeters & Small (2001), Pujol et al. (2007)).

## 1.5 Zielstellung

Zur Bestimmung des Zielortes kerncodierter Organellproteine können *in organello* Importexperimente durchgeführt werden. Für die Analyse der Lokalisierung pflanzlicher Ferritine wurden solche Untersuchungen bislang kaum genutzt. Bisher wurde nur ein Ferritin aus Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*) *in vitro* in isolierte Chloroplasten importiert (van der Mark et al. (1983c)). Im Weiteren fehlen genauere Analysen bezüglich der Lokalisierung der Ferritine innerhalb der Plastiden sowie die Untersuchung weiterer pflanzlicher Ferritine auf deren Importverhalten in Plastiden. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit eine umfassende Analyse des Transportverhaltens der vier Ferritine aus der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* durchgeführt werden. Der Fokus lag hierbei auf der Charakterisierung des Import- und Assemblierungsverhaltens dieser Proteine mittels *in vitro* Importexperiment. Dabei sollte auch die innerplastidäre Lokalisierung und das Vorhandensein funktioneller Eisen-speichernder Ferritinkomplexe untersucht werden.

Während der Anfertigung dieser Arbeit wurden Daten publiziert, die erstmals auf eine mitochondrielle Lokalisierung pflanzlicher Ferritine hinwiesen (Zancani et al. (2004)). Es stellte sich daher die Frage, ob die pflanzlichen Vertreter analog dem humanen mitochondrialen Ferritin (Levi et al. (2001)) in Mitochondrien transportiert werden können. Dazu sollten *in organello* Importexperimente der *Arabidopsis* Ferritine mit isolierten Mitochondrien und Chloroplasten durchgeführt werden und diese *in vitro* Experimente mittels transienter Expression geeigneter Reporterproteininfusionen der Ferritine *in vivo* ergänzt werden.

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Ferritine in *Arabidopsis thaliana*

Die Eisen-speichernden Ferritine sind weit verbreitete Proteine, welche sowohl in Pflanzen, als auch Bakterien, Tieren und Menschen vorkommen. Eine Besonderheit der pflanzlichen Ferritine ist das so genannte Extensionspeptid (*EP-extension peptide*, Hintze & Theil (2006)), welches bakteriellen und tierischen Ferritinen fehlt (Abb. 1.4). Pflanzliche Ferritine sind als plastidär lokalisiert beschrieben und tragen am Aminoterminal ein so genanntes Transitpeptid (TP, Ragland et al. (1990), Masuda et al. (2001)). Im Kerngenom der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* finden sich vier Gene für Ferritin (Tab. 2.1, Gaymard et al. (1996), Petit et al. (2001a)). Die entsprechenden Proteine sollen zunächst kurz vorgestellt werden.

**Tab. 2.1:** Übersicht der Ferritine aus *Arabidopsis thaliana*. Für jedes Ferritin ist die Gen- und Proteinnummer, sowie die Proteinnlänge und das Molekulargewicht angegeben.

Bezeichnung	Gennummer	Proteinnummer	Länge	MW
AtFer1	At5g01600	Q39101	255 AS	28,2 kDa
AtFer2	At3g11050	Q9SRL5	253 AS	28,4 kDa
AtFer3	At3g56090	Q9LYN2	259 AS	28,8 kDa
AtFer4	At2g40300	Q9S756	259 AS	29 kDa

Betrachtet man nun im Detail den Aufbau der vier *Arabidopsis* Ferritine (Abb. 1.4 und 2.1), so wird deutlich, dass das Transitpeptid (TP) aller vier Ferritine in etwa gleich lang ist (zwischen 45 und 49 Aminosäuren). Die einzige Ausnahme bildet AtFer4, welches eine um ca. 10 Aminosäuren längere Transportsequenz besitzt (Abb. 2.1). Das Extensionspeptid der *Arabidopsis* Ferritine ist dagegen ähnlich groß. Die nach Abspaltung der Transitpeptide resultierenden, reifen Proteine sind zwischen 202 und 210 Aminosäuren lang. Die vergleichende Analyse der Proteinsequenzen mittels Alignment (ClustalW) zeigt die Ähnlichkeit der vier Ferritine zueinander (Abb. 2.2). Sie weisen eine sehr starke Konservierung auf, so dass sich die größten Sequenzunterschiede im aminoterminalen Bereich befinden, vor allem im Bereich des Transportsignals. Interessanterweise zeigt sich, dass AtFer3 und AtFer4 im Transitpeptid stark homolog zueinander sind (Abb. 2.2).

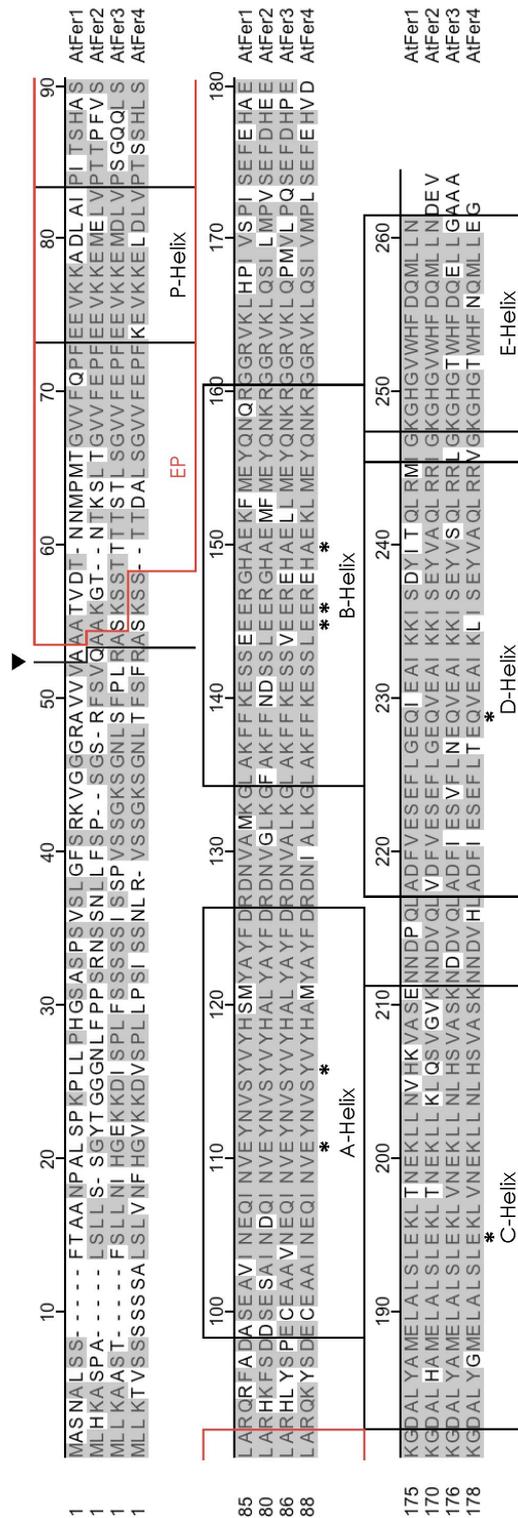


**Abb. 2.1: Aufbau der *Arabidopsis* Ferritine.** Für jedes der vier Ferritine ist schematisch der Ort für das Transitpeptid (TP), das Extensionspeptid (EP) und den reifen Teil eingezeichnet. Die Kennzeichnung erfolgte nach SwissProt-Datenbankeintrag (<http://www.expasy.org/sprot/>) bzw. TargetP-Vorhersage. Zusätzlich sind die Größen der reifen Proteine angegeben.

So sind beide Transportsignale zu 63 % identisch (Daten nicht gezeigt). Dagegen liegt die Homologie der Transitpeptide in anderen Fällen unter 30 %. Die reifen Proteinanteile sind zu 70-80 % identisch, wobei erneut die höchste Ähnlichkeit zwischen AtFer3 und AtFer4 vorliegt (Tab. 2.2). Insgesamt weisen die Ferritine aus *Arabidopsis thaliana* eine hohe Homologie zueinander auf, welche im Fall von AtFer3 und AtFer4 besonders deutlich wird.

**Tab. 2.2: Homologie der Ferritine aus *Arabidopsis thaliana*.** Die angegebenen Werte stellen die Aminosäureidentität der Ferritine dar und wurden für das in Abbildung 2.2 gezeigte Alignment erhalten.

	Vorläuferprotein			reifer Teil		
	AtFer2	AtFer3	AtFer4	AtFer2	AtFer3	AtFer4
AtFer1	62,0 %	62,0 %	61,6 %	72,0 %	69,6 %	71,0 %
AtFer2	-	66,8 %	67,6 %	-	74,0 %	74,0 %
AtFer3	-	-	<b>78,0 %</b>	-	-	<b>79,5 %</b>
AtFer4	-	-	-	-	-	-



**Abb. 2.2: Alignment der Ferritine aus *Arabidopsis thaliana*.** Das gezeigte Alignment der Proteinsequenzen der Ferritine wurde mit dem Programm MegAlign (DNA Star, Lasergene Software) generiert. Die  $\alpha$ -Helices und die Aminosäuren des Ferroxidasezentrums (\*) wurden nach Petit et al. (2001a) markiert. Das Extensionspeptid (EP) und die Schnittstelle der Stromaprozessierungspeptidase (SPP, schwarzer Pfeil) wurden analog zu Abbildung 2.1 eingezeichnet. Im Alignment sind identische Aminosäurereste grau unterlegt.

## 2.2 Lokalisierung der *Arabidopsis* Ferritine in Chloroplasten

### 2.2.1 Transportverhalten der Ferritine in Chloroplasten

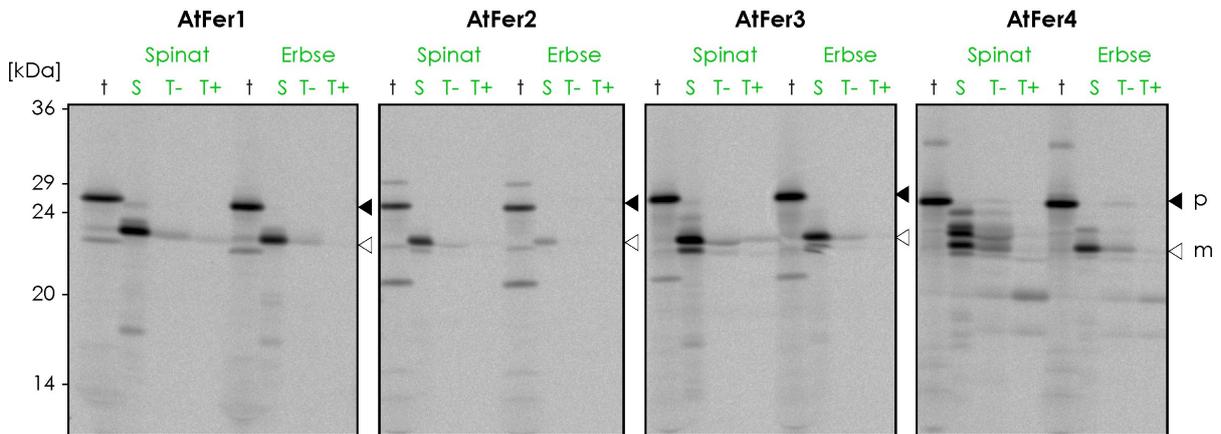
Seit vielen Jahren wird die Lokalisierung pflanzlicher Ferritine untersucht, beispielsweise mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen. Dabei gelang die Visualisierung nur, wenn die Pflanzen unter hohen Eisenkonzentrationen angezogen wurden (Gartenbohne [*Phaseolus vulgaris*], Seckbach (1968)). Weitere mikroskopische Untersuchungen wurden z.B. mit Klette (*Xanthium pensylvanicum*, Seckbach (1972)), Erbse (*Pisum sativum*, Hyde et al. (1963)) und Kokosnusspalme (*Cocos nucifera*, Maramorosch & Hirumi (1973)) durchgeführt. Daraus ergaben sich Hinweise darauf, dass pflanzliche Ferritine wahrscheinlich plastidär lokalisiert sind. Allerdings fehlen weitergehende Analysen bezüglich der Lokalisierung beispielsweise mittels *in vitro* Importexperimenten.

Zunächst sollte im Rahmen dieser Arbeit die Lokalisierung pflanzlicher Ferritine analysiert werden. Dazu wurden die vier Ferritine der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* *in vitro* synthetisiert, wobei die Proteine radioaktiv markiert wurden. Um eine effiziente Translation im Retikulozytenlysatz zu gewährleisten, wurde der pBAT-Vektor verwendet (Annweiler et al. (1991)). Die radioaktiv markierten Vorläuferproteine konnten dann direkt für *in organello* Importexperimente mit isolierten Chloroplasten verwendet werden. Die *Arabidopsis* Ferritine wurden entweder innerhalb dieser Arbeit aus cDNA amplifiziert (AtFer1, AtFer2) bzw. beim RIKEN Institut erworben (AtFer3, AtFer4; <http://www.brc.riken.jp/lab/epd/catalog/cdnaclone.html>, Seki et al. (1998), Seki et al. (2002), vgl. Abschnitt 5.2.1.1 und 5.1.10).

Das Transportverhalten pflanzlicher Ferritine in Organellen wurde bisher nur für ein Ferritin aus Gartenbohne untersucht (van der Mark et al. (1983c)). Aufgrund der methodischen Umsetzung dieser Transportuntersuchung sind die erhaltenen Signale nur sehr schwach. So wurde u.a. Gesamt-RNA für die *in vitro* Synthese des Vorläuferproteins genutzt. Um die Ferritin-spezifischen Signale detektieren zu können, musste im Anschluss an den Import eine Co-Immunpräzipitation durchgeführt werden. Abgesehen vom schwachen Ferritinsignal fehlt eine weitergehende Analyse der subplastidären Lokalisierung sowie die Untersuchung des Transportverhaltens weiterer Ferritine anderer Pflanzenspezies.

Daher sollte in dieser Arbeit zunächst untersucht werden, ob die Ferritine aus *Arabidopsis thaliana* in isolierte Chloroplasten importiert werden können. Dazu wurden die radioaktiv markierten Vorläuferproteine mit isolierten Chloroplasten aus Erbse und Spinat für 20 min im Licht inkubiert. Anschließend erfolgte eine Thermolysinbehandlung, um

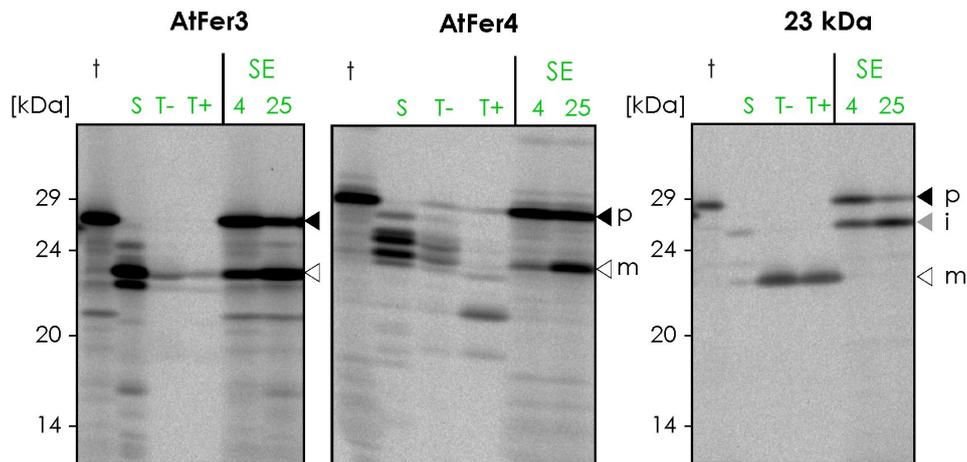
die außen an die Organellen assoziierten Proteine abzubauen. Die importierten Proteine sind dagegen vor der Protease geschützt und können nicht abgebaut werden. Die Chloroplasten wurden anschließend durch osmotischen Schock lysiert und durch Zentrifugation in Stroma und Thylakoide fraktioniert. Ein Teil der Thylakoide wurde zusätzlich mit Thermolysin behandelt. Dies diente zur Unterscheidung zwischen Thylakoid-assoziierten Proteinen und in die Thylakoide transportierten Proteinen.



**Abb. 2.3: *In organello* Import der Ferritine in isolierte Spinat- bzw. Erbsenchloroplasten.** Dargestellt sind Expositionen von 10-15 %igen SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli (1970)). *In vitro* synthetisierte, radioaktiv markierte Vorläuferproteine (**t**-Translation) wurden mit isolierten Chloroplasten aus Erbse bzw. Spinat für 20 min bei 25 °C im Licht inkubiert. Anschließend erfolgte eine Thermolysinbehandlung, und die intakten Chloroplasten wurden mittels 35 %igen Percollkissen reisoliert. Im Anschluss daran wurde eine Fraktionierung der Plastiden in Stroma (**S**) und Thylakoide durchgeführt. Es erfolgte eine weitere Thermolysinbehandlung eines Teils der Thylakoide (**T+**), während die andere Hälfte unbehandelt blieb (**T-**). Die Stroma- und Thylakoidfraktionen wurden in stöchiometrischen Mengen (jeweils 12,5  $\mu$ g Chlorophyll entsprechend; mit 1  $\mu$ l des zum Import eingesetzten Translationsansatzes) aufgetragen und mittels SDS-PAGE getrennt. Die Größen des mitgeführten Markers sind in kDa angegeben. Die schwarze Pfeilspitze markiert das Vorläuferprotein (**p-precursor**), die weiße Spitze das reife Protein (**m-mature**).

Es zeigt sich, dass alle vier Vorläuferproteine der Ferritine ins Stroma der Plastiden importiert und dort zum reifen Protein prozessiert werden (Abb. 2.3, weiße Pfeile). Interessanterweise zeigen die Ferritine auch eine Assoziation mit der Thylakoidmembran, welche von der stromalen Seite aus erfolgt, da diese nach Thermolysinbehandlung nicht mehr vorhanden ist (Abb. 2.3, T+ Spur). Einzig für AtFer1 und AtFer3 wurden geringe Mengen proteaseresistenter Proteine in den Thermolysin-behandelten Thylakoiden detektiert. Es ist zu sehen, dass die reifen Proteine nicht komplett proteolytisch abgebaut werden konnten und vermutlich ein Teil der reifen AtFer1 und AtFer3 Proteine für die Protease nicht zugänglich war. Die Prozessierung der Ferritine im Stroma führt zu ungewöhnlichen Bandenmustern. Bisher untersuchte plastidäre Proteine werden nach einem solchen *in organello* Import durch die Stromaprozessierungspeptidase (SPP) zu einem reifen Protein prozessiert. Während AtFer1 und AtFer2 nur eine reife Proteinbande von ca. 24 kDa aufweisen, zeigen AtFer3 und AtFer4 komplexere Bandenmuster

im Bereich von ca. 23 kDa bis 26 kDa. Nach dem Import ins Stroma der Chloroplasten werden für AtFer3 zwei Banden detektiert, eine prominente und eine etwas schwächere, kleinere Bande. Im Fall von AtFer4 findet man sogar vier bis fünf verschieden große Banden in Spinatplastiden, von denen zwei im Bereich von 23-24 kDa sehr prominent auftreten. Hingegen werden nach dem Import in Erbsenchloroplasten nur zwei stromale Banden von AtFer4 detektiert.



**Abb. 2.4: Inkubation von Translationsprodukten mit Stromaextrakt im Vergleich zum *in organello* Import.** Dargestellt sind Expositionen von 10-15 %igen SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli (1970)). Die Vorläuferproteine von AtFer3, AtFer4 und dem 23 kDa Protein wurden wie in Abb. 2.3 beschrieben in Spinatchloroplasten importiert. Die Vorstufenproteine wurden zudem für 20 min bei 4°C (4) bzw. 25°C (25) mit isoliertem Spinatstromaextrakt (SE-Stromaextrakt) inkubiert. Die schwarze Pfeilspitze kennzeichnet das Vorstufenprotein, die weiße Spitze das reife Protein und die graue Spitze das Stromaintermediat (*i-intermediate*) des 23 kDa Proteins. Für weitere Details siehe Abbildung 2.3.

Um nun zu prüfen, ob diese komplexen Bandenmuster von AtFer3 und AtFer4 allein durch die SPP generiert werden, wurden die *in vitro* Translationsprodukte mit isoliertem Stromaextrakt inkubiert (Abb. 2.4). Sowohl für AtFer3 als auch für AtFer4 wird nur ein SPP-Spaltprodukt beobachtet. Die bei AtFer3 auftretende Bande korreliert mit der intensiven Importbande bei 23 kDa (Abb. 2.4, weißer Pfeil), weshalb die kleinere Bande wahrscheinlich durch eine weitere Spaltung hervorgerufen wird. Die nach dem Import von AtFer4 beobachtete kleinere prominente Bande entspricht dem Produkt der SPP-Prozessierung (Abb. 2.4, weißer Pfeil). Da es sich bei den verbliebenen Banden zumeist um größere Produkte handelt, sind diese womöglich das Resultat anderer plastidärer Proteasen. Als Kontrolle für eine erfolgreiche SPP-Spaltung mittels Stromaextrakt wurde die 23 kDa Untereinheit des Wasserspaltungsapparates genutzt, welche in den Thylakoiden lokalisiert ist (Abb. 2.4). Nach dem Transport ins Stroma erfolgte die SPP-Spaltung zu einem Stromaintermediat (Abb. 2.4, grauer Pfeil) und anschließend der Weitertransport in die Thylakoide (Abb. 2.4, weißer Pfeil). Dort findet eine zweite Spaltung durch die Thylakoidprozessierungspeptidase (TPP) zum reifen 23 kDa Protein statt. Im Importansatz ist das Stromaintermediat vom 23 kDa Protein nur schwach detektierbar, da

ein sofortiger Weitertransport in die Thylakoide eine stärkere Akkumulation im Stroma verhindert.

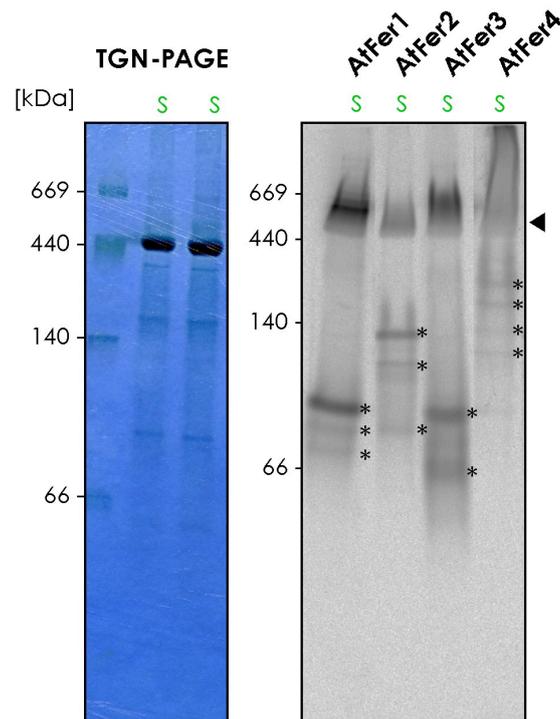
Es zeigt sich, dass es sich bei den vier *Arabidopsis* Ferritinen um plastidäre Proteine handelt, welche im Stroma der Chloroplasten lokalisiert sind und an die Thylakoidmembran assoziieren können. Obwohl die *Arabidopsis* Ferritine sehr homolog zueinander sind, so zeigen sich dennoch deutliche Unterschiede bei der Prozessierung der Vorläuferproteine im Stroma. Auffällig ist das komplexe Proteinbandenmuster der reifen AtFer3 und AtFer4 Proteine, welche nicht allein durch die SPP gebildet werden, sondern vermutlich durch andere Proteasen generiert werden.

## 2.2.2 Komplexassemblierung der Ferritine aus *Arabidopsis thaliana*

### 2.2.2.1 Komplexe der Ferritine im Stroma

Nachdem das Transportverhalten der vier *Arabidopsis* Ferritine untersucht wurde, sollte nun geklärt werden, ob sie nach ihrem Import ins Stroma höhermolekulare Komplexe bilden. Es ist bereits bekannt, dass Ferritine zu Komplexen bestehend aus 24 Ferritin-Untereinheiten assemblieren (Lawson et al. (1991), Lobréaux et al. (1992b)). Im Inneren dieser Komplexe werden die Eisenionen als Eisen(III)-Hydroxide gespeichert (Chasteen & Harrison (1999), Jameson et al. (2002)). Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob solche funktionellen Komplexe auch mit den frisch importierten Ferritinen aus *Arabidopsis thaliana* beobachtet werden können.

Zur Detektion löslicher Proteinkomplexe (für Stromaprobe) wurde das *Tris-Glycine-Native* Gelsystem (TGN) verwendet. Die TGN-PAGE stellt eine SDS-freie Variante des Laemmli Gelsystems dar (Molik (2005)) und wurde für die elektrophoretische Trennung der Stromaproteine verwendet. In Abbildung 2.5 (linke Seite) ist ein solches Coomassie gefärbtes TGN-Gel zu sehen. Auffällig ist eine prominente Bande bei 440 kDa von der bekannt ist, dass es sich um den im Stroma stark vertretenen Rubiscomplex handelt. Im Autoradiogramm (Abb. 2.5, rechte Seite) werden für alle Ferritine Komplexe bei ca. 670 kDa detektiert (schwarzer Pfeil). Ansonsten unterscheidet sich das Bandenmuster (Abb. 2.5, mit Stern gekennzeichnet) trotz der großen Homologie der Proteine (Tab. 2.2) z.T. stark voneinander. AtFer1 und AtFer3 besitzen beide einen ca. 100 kDa großen Komplex, unterscheiden sich aber in den verschiedenen großen Komplexen unter 100 kDa. AtFer2 bildet einen größeren Komplex von etwa 140 kDa, sowie zwei kleinere von ca. 130 kDa bzw. 80 kDa. Ein gänzlich anderes Bild weist AtFer4 auf. Für dieses Ferritin wird ein eher „leiterartiges“ Bandenmuster detektiert. Zudem zeigen sich bei AtFer4 Probleme beim Übergang ins Trenngel, wodurch möglicherweise der zu beobachtende



**Abb. 2.5: Assemblierung der Ferritine zu stromalen Komplexen.** Es ist die Exposition eines 5-13,5%igen *Tris-Glycine-Native* (TGN) Gels (rechts) und das entsprechend Coomassie gefärbte Gel (links) dargestellt. Das Stroma aus Spinatplastiden (Menge entsprechend 25  $\mu\text{g}$  Chlorophyll) wurde nach dem Import der Ferritine unter nativen Bedingungen aufgetrennt. Im gefärbten Gel wird eine Bande bei 440 kDa detektiert, dabei handelt es sich um den Rubiscokomplex. Für weitere Details siehe Abbildung 2.3.

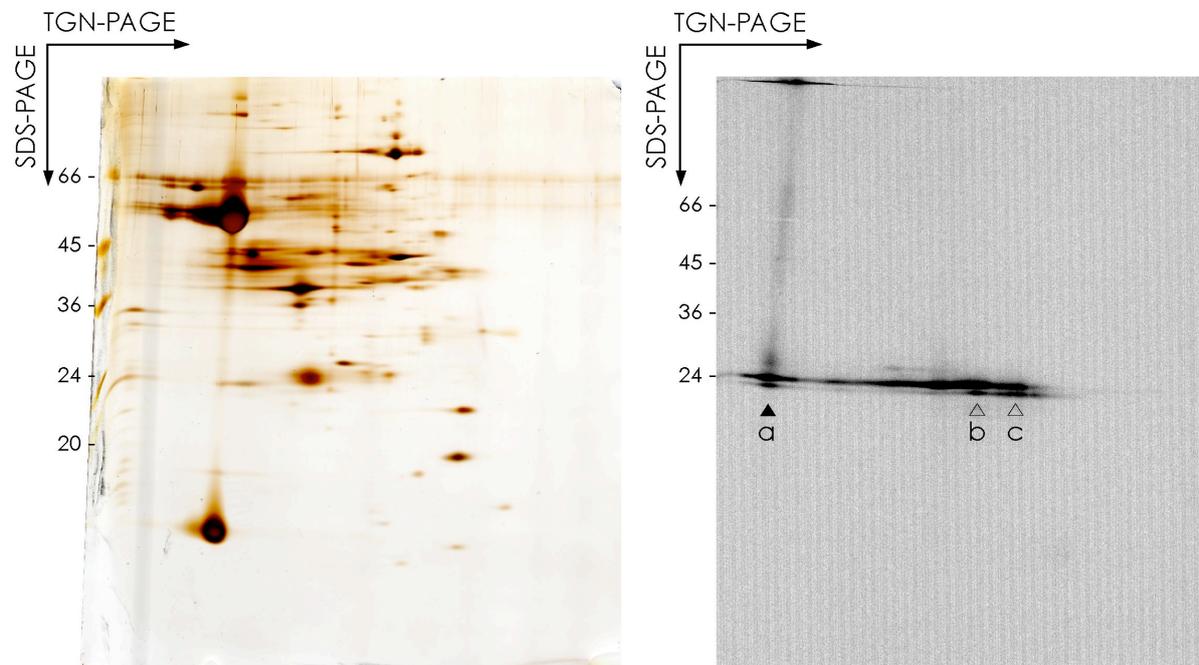
„Schmier“ entsteht.

Die gebildeten Ferritinkomplexe von ca. 670 kDa Größe stellen wahrscheinlich funktionelle Komplexe dar, demnach sollten die importierten Ferritine in der Lage sein, Eisen zu speichern und bei Bedarf abzugeben (z.B. zur Synthese von Fe/S-Clustern). Bei den kleineren Ferritinkomplexen im Stroma könnte es sich um im Auf- bzw. Abbau befindliche Komplexe handeln.

#### 2.2.2.2 2D-Analyse der stromalen Komplexe von AtFer3 und AtFer4

Die stromalen Ferritinkomplexe von AtFer3 und AtFer4, nicht aber AtFer1 und AtFer2, wurden weiter analysiert, da AtFer3 und AtFer4 im *in organello* Import (Abb. 2.3) ein komplexes Bandenmuster aufwiesen, welches nicht allein auf die SPP-Spaltung zurückzuführen ist (Abb. 2.4). Daraus ergab sich die Fragestellung, ob alle beobachteten Prozessierungsprodukte in die funktionellen Ferritinkomplexe eingebaut werden (Abb. 2.5), oder ob nur die durch SPP Prozessierung generierten Banden die aktiven AtFer3 bzw. AtFer4 Proteine darstellen. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden ausgeschnittene Gelstreifen entsprechender nativer Gele von AtFer3 und AtFer4 (Abb. 2.5)

unter denaturierenden Bedingungen in der zweiten Dimension aufgetrennt (Abb. 2.6 und 2.7).

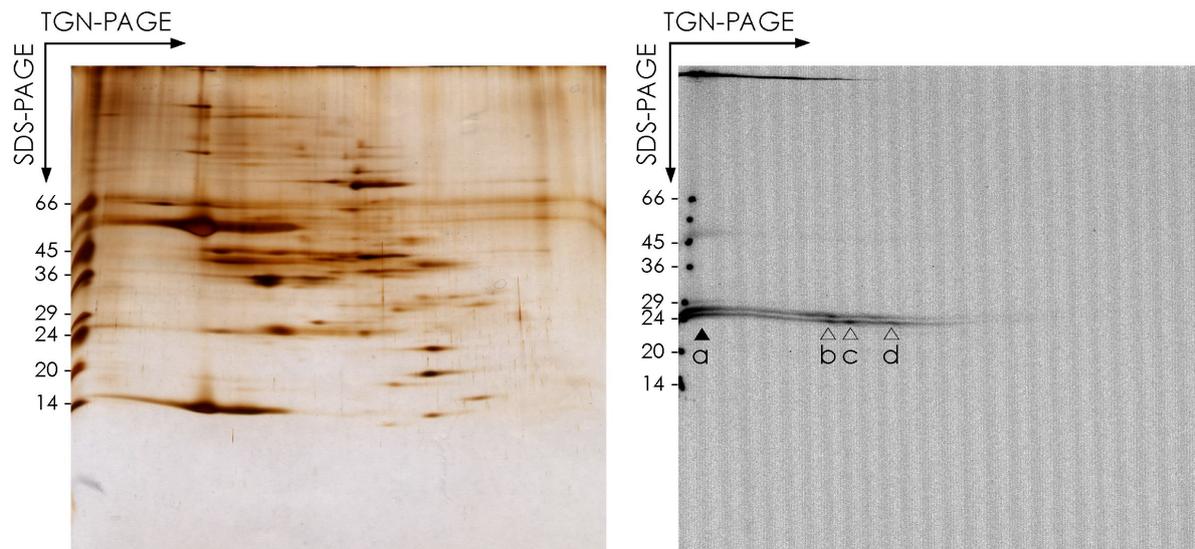


**Abb. 2.6: 2D-Analyse der stromalen Komplexe von AtFer3.** Nach Import von AtFer3 in Spinat-chloroplasten und anschließender TGN-PAGE des Stromas wurde der entsprechende Gelstreifen einer zweiten denaturierenden Elektrophorese unterzogen. Dargestellt ist die Silberfärbung (links) und die Exposition (rechts) des 15%igen SDS-Polyacrylamidgels (Laemmli (1970)). Für weitere Details siehe Abbildungen 2.3 und 2.5.

Im silbergefärbten SDS-Gel ist die Trennung der nativen Komplexe in die einzelnen Proteine zu beobachten (Abb. 2.6 und 2.7). Die am stärksten gefärbten Proteinspots stellen die beiden Untereinheiten des Rubisco-Komplexes dar, welcher im TGN-Gel etwa 440 kDa groß ist (Abb. 2.5). Neben diesen dominanten Spots können noch weitere stromale Proteine detektiert werden.

Nach 2D-PAGE zeigt sich, dass die aufgetrennten Ferritinkomplexe von AtFer3 aus zwei Banden bestehen (Abb. 2.6). In den Ferritinkomplexen ist sowohl die von der SPP generierte Bande als auch die etwas kleinere Bande enthalten. Insbesondere der 670 kDa Komplex (Abb. 2.6, a), welcher den eigentlichen funktionellen Ferritinkomplex darstellt, ist aus beiden Prozessierungsprodukten aufgebaut. Dies lässt den Schluss zu, dass nicht nur das von der SPP prozessierte AtFer3 (Abb. 2.4, weißer Pfeil), sondern auch das kleinere AtFer3 Protein zur Funktion des AtFer3-Komplexes beiträgt. Welche Aufgabe die kleineren Ferritinkomplexe übernehmen ist noch nicht geklärt, möglicherweise sind dies Zwischenstufen des 670 kDa-Komplexes (Abb. 2.6, b, c).

Auch im Falle von AtFer4 finden sich zwei Banden im Ferritinkomplex (Abb. 2.7, a). Diese entsprechen den beiden prominenten Importbanden von AtFer4 (Abb. 2.3 und

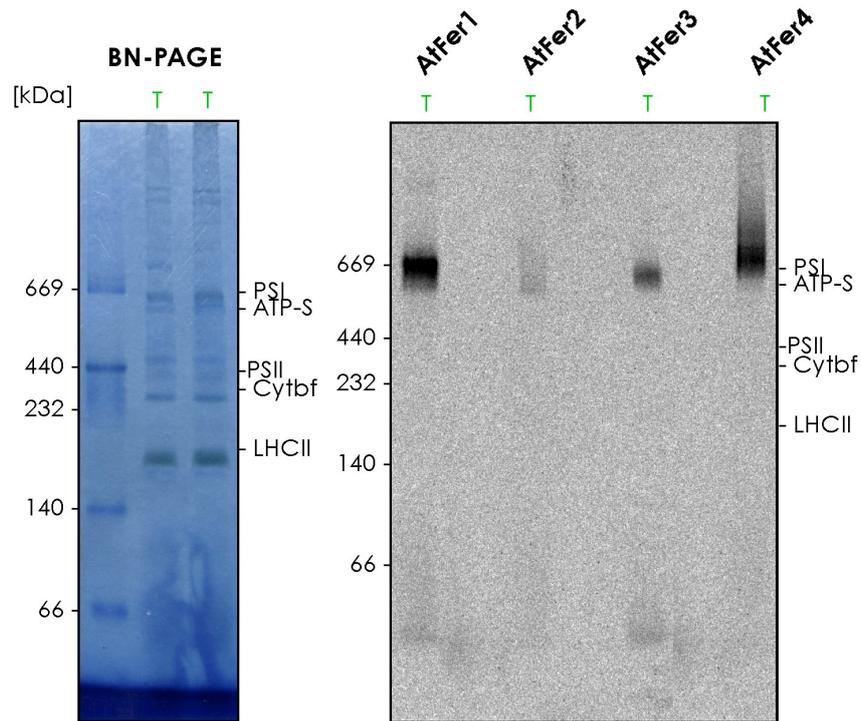


**Abb. 2.7: 2D-Analyse der stromalen Komplexe von AtFer4.** Nach Import von AtFer4 in Spinatchloroplasten und anschließender TGN-PAGE des Stromas wurde der entsprechende Gelstreifen einer zweiten denaturierenden Elektrophorese unterzogen. Dargestellt ist die Silberfärbung (links) und die Exposition (rechts) des 15%igen SDS-Polyacrylamidgels (Laemmli (1970)). Für weitere Details siehe Abbildungen 2.3, 2.5 und 2.6.

2.4). Ebenso enthalten auch die kleineren Komplexe meist beide reifen Proteinanteile (Abb. 2.7, b, c, d). Dies passt zu den Ergebnissen der 2D-Analyse von AtFer3. Es wird deutlich, dass beide Banden, die SPP prozessierte und die alternativ prozessierte Bande, von AtFer3 und AtFer4 im Stroma tatsächlich in die Komplexe eingebaut werden. Daher kommt ihnen wahrscheinlich eine funktionelle Bedeutung zu. Die 670 kDa großen Komplexe könnten Homomere eines Ferritins darstellen, welche aus unterschiedlich prozessierten AtFer3 bzw. AtFer4 Proteinen bestehen. Andererseits kann nicht ausgeschlossen werden, dass die frisch importierten AtFer3 und AtFer4 Proteine mit in den Plastiden vorhandenen Ferritinuntereinheiten heteropolymere Komplexe eingehen.

### 2.2.2.3 Komplexe der Ferritine an der Thylakoidmembran

Im vorherigen Abschnitt wurden die stromalen Komplexe der *Arabidopsis* Ferritine untersucht. Im plastidären Import zeigte sich bereits die Tendenz der Ferritine, an die Thylakoidmembran zu binden. Somit könnten funktionelle Komplexe auch an den Thylakoiden beobachtet werden. Zur Untersuchung dieser wurden die Ferritine in isolierte Spinatchloroplasten importiert und die Thylakoide aus diesen isoliert. Um die Proteinkomplexe der Thylakoide zu analysieren, wurden diese mittels Digitonin solubilisiert. Anschließend wurden die solubilisierten Komplexe mit Coomassie G250 versetzt und im *Blue Native* Gel (BN) aufgetrennt. Dieses spezielle Elektrophoreseverfahren ist insbesondere für membranständige Proteinkomplexe geeignet (Schägger & von Jagow (1991), Berghöfer & Klösgen (1999)).



**Abb. 2.8: Ferritinkomplexe an der Thylakoidmembran.** Dargestellt sind Expositionen von 5-13,5%igen *Blue Native* (BN-) Gelen. Die Thylakoide wurden nach Import der vier Ferritine in Spinachchloroplasten isoliert und vor dem Gellauf mit Digitonin solubilisiert. Anschließend wurden die Thylakoide (Menge entsprechend  $25 \mu\text{g}$  Chlorophyll) unter nativen Bedingungen aufgetrennt. Im BN-Gel sind folgende Photosynthesekomplexe der Thylakoidmembran erkennbar: Photosystem I (PSI), ATP-Synthase (ATP-S), Photosystem II (PSII), Cytochrom  $b_6/f$  Komplex (Cytbf) und der Lichtsammelkomplex von PSII (LHCII). Für weitere Details siehe Abbildung 2.3.

Nach erfolgter Elektrophorese sind folgende Komplexe der photosynthetischen Elektronentransportkette im BN-Gel erkennbar (Abb. 2.8, linke Seite): Photosystem I (PSI), ATP-Synthase (ATP-S), Photosystem II (PSII), Cytochrom  $b_6/f$  Komplex (Cytbf) und der Lichtsammelkomplex von PS II (LHCII) (Schägger & von Jagow (1991), Berghöfer & Klösgen (1999)). Im Autoradiogramm wurden die ca. 670 kDa großen Ferritinkomplexe detektiert, welche der Größe nach den beobachteten funktionellen Ferritinkomplexen im Stroma entsprechen (Abb. 2.5). Auffällig ist, dass im BN-Gel keine kleineren Ferritinkomplexe detektiert werden und bei AtFer4 ein eindeutiges Signal anstelle des „Bandenschmiers“ zu erkennen ist. Somit könnten die Ferritine sowohl im Stroma als auch an den Thylakoiden für die Eisenspeicherung verantwortlich sein. Da das Stroma der Ort der Fe/S-Cluster-Synthese ist, sollte auch die Eisenbereitstellung eine Rolle spielen (Ye et al. (2006), M. et al. (2007)). An der Thylakoidmembran könnten die Ferritine zum Schutz vor der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS-*reactive oxygen species*) durch freie Eisenionen ihre Funktion als Eisenspeicherprotein ausüben. ROS könnten gebildet werden, wenn Thylakoidproteine (z.B. Rieske-Fe/S-Protein des photosynthetischen Cytochrom  $b_6/f$ -Komplexes) als Folge einer Schädigung den enthaltenen

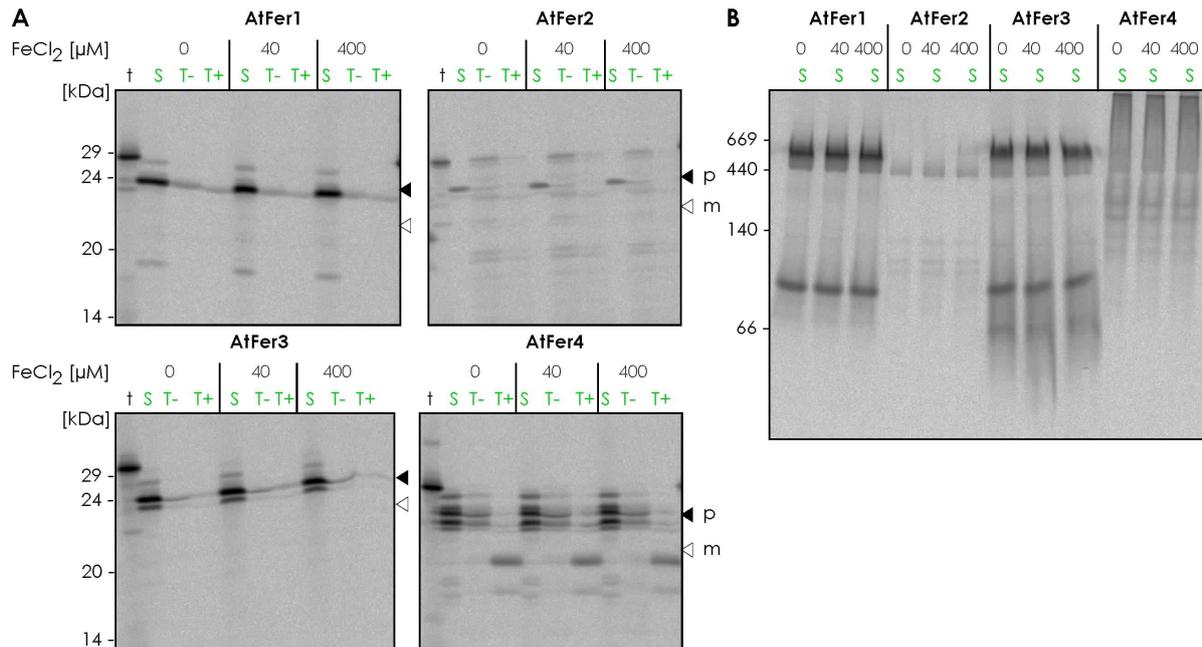
Eisencofaktor freisetzen. Die wurde für Ferritin in *Chlamydomonas reinhardtii* gezeigt, welchem eine schützende Funktion bei photo-oxidativem Stress zukommt (Busch et al. (2008)).

#### 2.2.2.4 Ferritinimport und Komplexassemblierung in Anwesenheit von Eisen(II)

In den bisherigen Arbeiten wurde das Import- und Assemblierungsverhalten der Ferritine aus *Arabidopsis thaliana* untersucht. In einem ersten Experiment sollte nun die Eisenspeichernde Funktion der Ferritine weiter untersucht werden. Es ist bekannt, dass Ferritinkomplexe Eisen(II) aufnehmen und mittels ihrer Ferroxidaseaktivität zu Eisen(III) oxidieren (Levi et al. (1988), Treffry et al. (1993)), welches innerhalb der Komplexe gelagert wird. Aufgrund dessen wurde dem *in organello* Importansatz Eisen(II)chlorid in verschiedenen Konzentrationen ( $0 \mu M$ ,  $40 \mu M$ ,  $400 \mu M$ ) zugesetzt und das Transportverhalten der Ferritine, sowie die Komplexassemblierung untersucht (Abb. 2.9). Das dem Import zugesetzte Eisen(II) sollte von den Plastiden aufgenommen werden, da Shingles et al. (2002) mittels *stopped flow* Spektrofluorometrie den Transport von Eisen(II)-Ionen über die innere Chloroplastenmembran bereits gezeigt haben. Des Weiteren wurde ein Protein der inneren Chloroplastenmembran (PIC1-*permease in chloroplasts1*), identifiziert, welches wahrscheinlich den Transport von Eisenionen über diese Membran bewerkstelligt (Duy et al. (2007)).

Der Import der vier *Arabidopsis* Ferritine zeigt auch in Anwesenheit von Eisen(II) keine Veränderung des Chloroplastentransports im Vergleich zum Standardimport (Abb. 2.9, A). Folglich führt die Eisen(II)-Zugabe weder zu einer Verstärkung noch zu einer Hemmung des Plastidenimports der Ferritine. Obwohl sich das Transportverhalten der Ferritine in Anwesenheit von Eisen(II)-Ionen nicht verändert, könnte die Komplexbildung der Ferritine im Stroma beeinflusst sein. Daher wurde im Anschluss an das Importexperiment das isolierte Stroma auch unter nicht-denaturierenden Bedingungen (TGN-Gel) aufgetrennt.

Betrachtet man das Ergebnis der nativen Trennung, so ist zu erkennen, dass sich das Bandenmuster der Ferritinkomplexe in An- und Abwesenheit von Eisen(II) nicht verändert (Abb. 2.9, B). Es ist daher vorstellbar, dass die Ferritinkomplexe entweder das Eisen(II) nicht eingelagert haben oder dass ein Größenunterschied der 670 kDa Ferritinkomplexe durch die Eisen-Aufnahme mittels nativer Gelelektrophorese nicht sichtbar gemacht werden kann. Auch eine mögliche Assemblierung der kleineren stromalen Komplexe zu größeren Komplexen ist nicht zu erkennen. Somit hat Eisen(II) unter den gewählten Bedingungen weder einen Einfluss auf den Transport noch auf die Komplexbildung der Ferritine. Zum einen könnten die eingesetzten Plastiden die Eisen(II)-Ionen nicht aufge-



**Abb. 2.9: Import und Komplexe in Anwesenheit verschiedener Eisen(II) Konzentrationen.** Dargestellt sind Expositionen 10-15%iger SDS-Polyacrylamidgele (A, Laemmli (1970)) und einer 5-13,5%igen TGN-PAGE von Stromafractionen (B). Der *in organello* Import der *Arabidopsis* Ferritine erfolgte in Anwesenheit von 0, 40 und 400  $\mu\text{M}$  Eisen(II)chlorid in Spinatchloroplasten. Die Importfraktionen wurden mittels SDS-PAGE denaturierend (A) und das isolierte Stroma zusätzlich unter nativen Bedingungen (B) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Für weitere Details siehe Abbildungen 2.3 und 2.5.

nommen haben, und zum anderen wäre es auch denkbar, dass längere Eisenexpositionen der Plastiden bzw. die Anzucht der Pflanzen in Anwesenheit erhöhter Eisenkonzentrationen nötig sind um Veränderungen beobachten zu können.

## 2.3 Ferritin - *dual targeting* in pflanzliche Organellen

### 2.3.1 *In silico* Analyse der subzellulären Lokalisierung der Ferritine

In der vorliegenden Arbeit wurde bisher der plastidäre Transport der vier *Arabidopsis* Ferritine gezeigt (Abb. 2.3). In der Veröffentlichung von Zancani et al. (2004) gab es erste Hinweise auf eine mögliche mitochondrielle Lokalisierung von pflanzlichem Ferritin. In diesen Arbeiten wurden Mitochondrien-spezifische Ferritinsignale mittels *Western Blot* und Immunogoldmarkierung isolierter Mitochondrien aus Erbse und *Arabidopsis thaliana* detektiert. Daher wurden in ersten Untersuchungen bezüglich einer mitochondriellen Lokalisierung der *Arabidopsis* Ferritine *in silico* Analysen durchgeführt. Hierzu wurden fünf verschiedene Vorhersageprogramme verwendet. Diese erkennen entweder Proteine

**Tab. 2.3: Vorhersage der subzellulären Lokalisierung der *Arabidopsis* Ferritine.** Die Proteinsequenzen der vier Ferritine wurden unter Verwendung von fünf verschiedenen Vorhersageprogrammen bezüglich ihrer Organell-lokalisierung analysiert. Programme: TargetP<sup>1</sup>, Predotar<sup>2</sup>, MitoProtII<sup>3</sup>, iPSORT<sup>4</sup> und PSORT<sup>5</sup>. Verwendete Abkürzung: IMM-Innere Mitochondrienmembran und IMS-Intermembranraum.

	TargetP	Predotar	MitoProtII	iPSORT	PSORT
<b>AtFer1</b>	<b>C (0,875)</b> M (0,051)	<b>C(0,985)</b> M (0,020)	<b>M (0,5482)</b>	<b>C</b>	<b>C Stroma (0,963)</b> C Thyl.membr. (0,744) C Thyl.lumen (0,744) M Matrix (0,360)
<b>AtFer2</b>	<b>C(0,915)</b> M (0,204)	<b>C (0,976)</b> M (0,013)	<b>M (0,7583)</b>	<b>C</b>	Vakuole (0,412) outside (0,370) ER Membr. (0,100) ER Lumen (0,100)
<b>AtFer3</b>	<b>C (0,960)</b> M (0,019)	<b>C (0,898)</b> M (0,081)	M (0,0266)	<b>M</b>	<b>C Stroma (0,850)</b> C Thyl.membr. (0,399) C Thyl.lumen (0,399) M Matrix (0,100)
<b>AtFer4</b>	<b>C(0,920)</b> M (0,026)	C (0,014) <b>M (0,974)</b>	<b>M (0,8137)</b>	<b>M</b>	<b>C Stroma (0,831)</b> <b>M Matrix (0,694)</b> M IMM (0,380) M IMS (0,380)

<sup>1</sup> <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>, <sup>2</sup> <http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html>,

<sup>3</sup> <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/mitoprot.html>, <sup>4</sup> <http://biocaml.org/ipsort/iPSORT/>

<sup>5</sup> <http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form.html>

eines Organells (MitoProtII) oder können mindestens zwischen Plastiden und Mitochondrien unterscheiden (TargetP, Predotar, iPSORT, PSORT) (Claros & Vincens (1996), Emanuelsson et al. (2000), Bannai et al. (2002), Small et al. (2004)).

Es stellte sich heraus, dass TargetP alle vier Ferritine als plastidär erkennt und PSORT diese, mit Ausnahme von AtFer2, im Stroma der Plastiden lokalisiert (Tab. 2.3). Für AtFer2 gibt PSORT mit einem geringen Wert eine vakuoläre Lokalisierung an, so dass dieses Programm keine eindeutige Aussage zu AtFer2 treffen kann. Als weitere mögliche subzelluläre Lokalisierung von AtFer1 und AtFer3 werden sowohl die Thylakoidmembran als auch das Thylakoidlumen von PSORT angegeben. Im Fall von AtFer4 scheint die Lokalisierung sowohl in den Plastiden, als auch in Mitochondrien denkbar, da TargetP und Predotar hohe Werte für Chloroplasten bzw. Mitochondrien ausgeben. Zudem liegen die erhaltenen PSORT-Werte für beide Organellen sehr nah beieinander. Predotar erkennt jeweils drei Ferritine als plastidär und ein Ferritin als mitochondriell (Tab. 2.3). AtFer2 und AtFer4 werden von MitoProtII als mitochondriell vorhergesagt. Für AtFer3 kann MitoProtII keine mitochondrielle Lokalisierung vorhersagen. Dagegen könnte AtFer1 möglicherweise in Mitochondrien lokalisiert werden, aber anhand des geringen Wertes ist dies nicht unbedingt zu erwarten. Interessanterweise unterscheiden sich die

Vorhersagen für AtFer3 und AtFer4 deutlich, obwohl ihre Transitpeptide zu 63% identisch sind (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise sind die am Aminoterminus von AtFer4 zusätzlich vorhandenen Aminosäuren dafür verantwortlich (Abb. 2.2).

Die verwendeten Vorhersageprogramme erkennen die Ferritine aus *Arabidopsis thaliana* vor allem als plastidäre Proteine (Tab. 2.3). Wie bereits gezeigt, werden die Ferritine in die Chloroplasten transportiert (Abb. 2.3), dennoch schließt dies nicht aus, dass die Ferritine auch in anderen Organellen lokalisiert sein können.

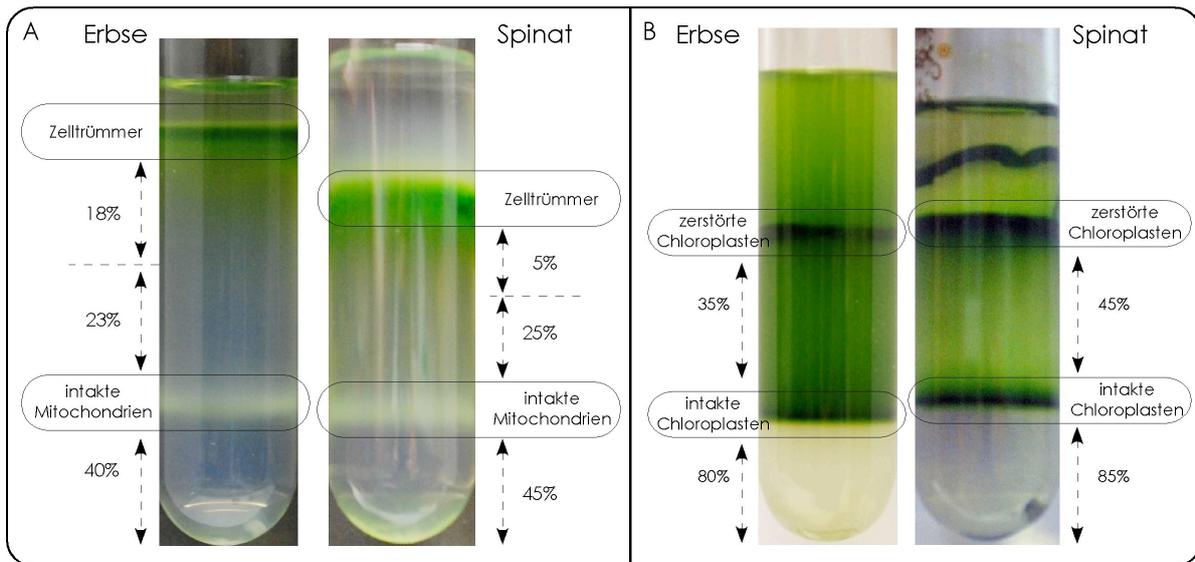
Innerhalb der Arbeitsgruppe wird der Plastidenimport standardmässig eingesetzt. Zudem wurde die Isolierung von Mitochondrien und der Import in diese etabliert (Rödiger (2003)), so dass damit die Möglichkeit zur Untersuchung eines Mitochondrienimports der Ferritine besteht.

## 2.3.2 Reinheit der Organellen aus Erbse und Spinat

### 2.3.2.1 Präparation von Mitochondrien und Chloroplasten aus Pflanzenmaterial

Zunächst wird die Präparation der Organellen aus *Pisum sativum* (Erbse) und *Spinacia oleracea* (Spinat) kurz erläutert. Die aus der Literatur bekannten Protokolle sind zur Isolierung eines der beiden Organellen (Mitochondrien oder Chloroplasten) beschrieben. In der Arbeitsgruppe wurden nun die Isolierungsprotokolle kombiniert, um so aus einem Pflanzengewebe beide Organellen präparieren zu können. Als Grundlage diente dabei das Protokoll zur Isolierung von Mitochondrien, bei welchem im ersten Zentrifugationsschritt die Plastiden sedimentiert werden. Die weitere Isolierung erfolgte analog der Einzelprotokolle. In beiden wird zur Reinigung und Isolierung der intakten Organellen ein Percollgradient genutzt, auf dem die grob angereicherten Mitochondrien- bzw. Chloroplastenfraktionen aufgetragen und anschließend zentrifugiert werden. Beispiele solcher typischer Percollgradienten sind in Abbildung 2.10 dargestellt. Die angereicherten Organellen werden aus der entsprechenden Percollschicht entnommen und mehrmals gewaschen.

Anhand der gezeigten Percollgradienten wird deutlich, dass für die Isolierung der Organellen verschiedener Pflanzenspezies unterschiedliche Percollstufen verwendet werden (Abb. 2.10). Die Mitochondrienpräparation aus Erbse weist eine saubere, milchig weiße Schicht zwischen 23% und 40% Percoll auf. Eine analoge Anreicherung der Mitochondrien aus Spinat ist ebenfalls zu erkennen (Abb. 2.10, A). Allerdings ist diese Bande leicht grünlich gefärbt, was auf Plastiden- bzw. Thylakoidpartikel in dieser hindeutet. Die intakten Chloroplasten aus Erbse und Spinat können mittels Percollstufen von den bereits zerstörten Plastiden getrennt werden (Abb. 2.10, B).

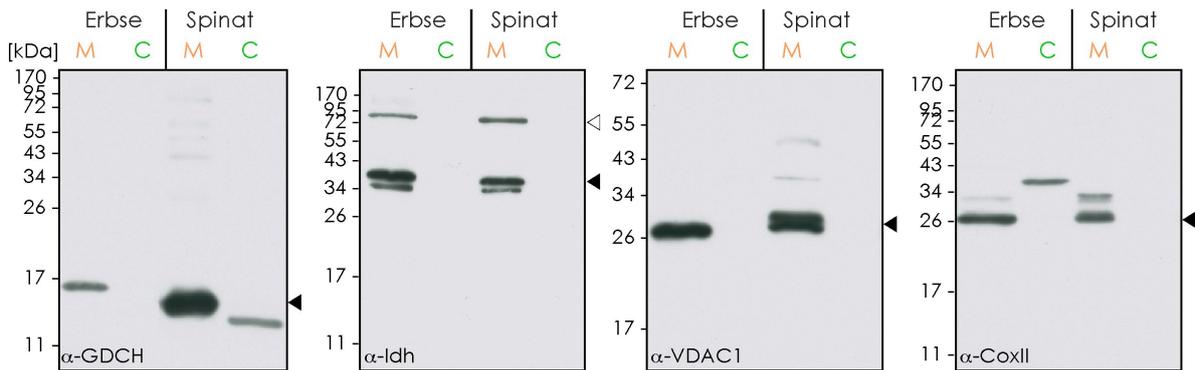


**Abb. 2.10: Percollgradienten der Mitochondrien und Chloroplasten.** Dargestellt sind die Mitochondrien- (A) und Chloroplastengradienten (B) der Parallelpräparation nach entsprechender Zentrifugation. Es sind sowohl Erbsen- als auch Spinatgradienten gezeigt, bei denen die eingesetzten Percollkonzentrationen eingezeichnet sind.

### 2.3.2.2 Immunologische Analyse der Reinheit der isolierten Organellen

Der Isolierung beider Organellen aus Erbse und Spinat folgte die Untersuchung zur Reinheit. Dazu wurden *Western* Analysen mit Antikörpern gegen Mitochondrien- und Plastidenproteine durchgeführt. In der Arbeitsgruppe waren bereits Antikörper gegen chloroplastidäre Proteine vorhanden. Um Mitochondrienproteine nachzuweisen, wurden entsprechende Antikörper kommerziell erworben. Dabei wurde darauf geachtet, dass diese sowohl gegen membranständige als auch lösliche Mitochondrienproteine gerichtet sind. Nach Trennung der Organellproben auf SDS-Minigelen und Transfer auf PVDF-Membranen mittels *semi-dry* Verfahren wurden die Membranen mit Antikörpern gegen Proteine der Mitochondrienmatrix, der inneren und der äußeren Mitochondrienmembran entwickelt.

Die in der Matrix lokalisierte GDC-H (H-Untereinheit des Glycin Decarboxylase Komplexes, Fujiwara et al. (1990)) wird im entsprechenden *Western Blot* in den Mitochondrienspuren aus Erbse und Spinat vom  $\alpha$ -GDC-H Antikörper detektiert (Abb. 2.11). Es fällt auf, dass die GDC-H aus Spinat kleiner ist als aus Erbse. Zusätzlich zur Detektion der GDC-H erfolgt ebenfalls eine Erkennung eines Proteins in den Spinatchloroplasten. Diese Kreuzreaktivität wurde in geringerem Maße auch mit Erbsenchloroplasten beobachtet. Aufgrund der unterschiedlichen Größen der detektierten Proteine kann eine Plastidenkontamination der Mitochondrien ausgeschlossen werden. Ein weiterer gegen ein Matrix-lokalisiertes Protein gerichteter Antikörper, kam zum Einsatz. Mit dem Isocitratdehydrogenase (Idh)-Antikörper erhält man im *Western Blot* ausschließ-



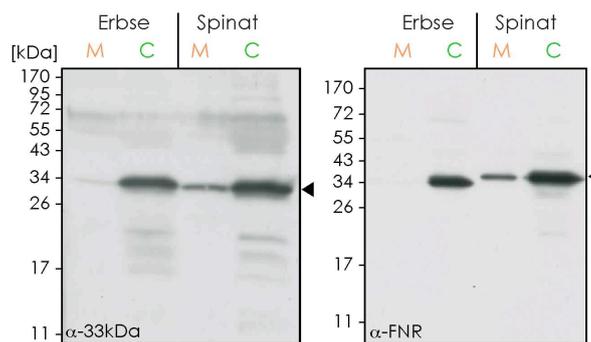
**Abb. 2.11: Nachweis der Organellen mit Mitochondrien spezifischen Antikörpern.** Mitochondrien (M, 10  $\mu$ g Protein entsprechend) und Chloroplasten (C, 2,5  $\mu$ g Chlorophyll entsprechend) wurden auf einem 15%igen SDS-Minigel (Laemmli (1970)) elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF Membran transferiert. Diese wurde einer *Western Blot* Analyse mit den entsprechenden Antikörpern unterzogen und mittels ECL-Reaktion detektiert. Es wurden Antikörper gegen GDC-H (H-Untereinheit des Glycin Decarboxylase Komplexes), Idh (Isocitratdehydrogenase), VDAC1 (*Voltage-dependent anion-selective channel protein1*) und CoxII (Cytochrom Oxidase Untereinheit II) eingesetzt. Die schwarzen Pfeile markieren jeweils das detektierte Protein und der weiße Pfeil das Dimer der Isocitratdehydrogenase.

lich Signale in den Mitochondrien. Es werden in beiden Pflanzenspezies drei Banden detektiert: das Idh-Monomer bei ca. 40 kDa in Form einer Doppelbande und das Dimer bei ca. 90 kDa. Die beobachtete Doppelbande könnte von zwei Isoformen der Idh stammen. Solche Isoformen unterschiedlicher Größe wurden für Isocitratdehydrogenasen aus *Arabidopsis* bereits beobachtet (Behal & Oliver (1998)). Ebenso ist die Fähigkeit zur Dimerbildung dieser Hydrogenasen bekannt (Gálvez et al. (1994)). Der *Western Blot* gegen das VDAC1 (*Voltage-dependent anion-selective channel protein1*, Clausen et al. (2004), Hoogenboom et al. (2007)), einem Protein der äußeren Mitochondrienmembran, detektiert ausschließlich Proteine der Mitochondrien. Während in Erbse eine Bande bei ca. 29 kDa nachweisbar ist, werden in Spinatmitochondrien zwei Proteine detektiert. Es könnte sich dabei um Isoenzyme des VDAC1-Proteins handeln. Zusätzlich werden in geringen Maße andere Proteine in Mitochondrien aus Spinat erkannt. Darüber hinaus kam der Antikörper gegen die Cytochrom Oxidase Untereinheit II (CoxII), Teil von Komplex IV der mitochondriellen Atmungskette der inneren Hüllmembran, zum weiteren Nachweis eines membranständigen Proteins zum Einsatz (Eubel et al. (2003), Eubel et al. (2004)). Im *Western Blot* wird ein Protein bei ca. 26 kDa in den Mitochondrienspuren detektiert. Zusätzlich werden bei ca. 33 kDa (Erbse) bzw. 34 kDa (Spinat) weitere Proteine erkannt. Es ist zu beobachten, dass Kreuzreaktionen mit plastidären Erbsenproteinen auftreten.

Die *Western* Analysen zeigen, dass intakte Mitochondrien isoliert wurden, da in allen Fällen sowohl lösliche als auch membranständige Mitochondrienproteine erkannt wurden. In zwei Fällen wurde eine Kreuzreaktion mit plastidären Proteinen detektiert, welche

keine Plastidenkontamination der Mitochondrien darstellen, da sich die durch die Antikörper erkannten Proteine in beiden Organellen bezüglich ihrer Größe unterscheiden.

Ein schwerwiegenderes Problem stellt eine mögliche Kontamination der Mitochondrien mit Plastiden dar, welche durch eine *Western* Analyse mit Antikörpern gegen plastidäre Proteine untersucht werden sollte (Gutensohn et al. (2004)). Die verwendeten Antikörper waren gegen Ferredoxin-NADPH-Reduktase (FNR, Stroma) und gegen das 33 kDa Protein des Wasserspaltungsapparates (33 kDa Protein, Thylakoide) gerichtet.



**Abb. 2.12: Nachweis der Organellen mit Plastiden spezifischen Antikörpern.** Dargestellt sind *Western* Analysen von 15 %igen Mini-SDS-Gelen (Laemmli (1970)). Zum Nachweis wurden Antikörper gegen die Ferredoxin-NADPH-Reduktase (FNR, Stroma) und gegen das 33 kDa Protein des Wasserspaltungsapparates (33 kDa Protein, Thylakoide) eingesetzt. Die detektierten Proteine sind mit einem schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Für weitere Details siehe Abbildung 2.11

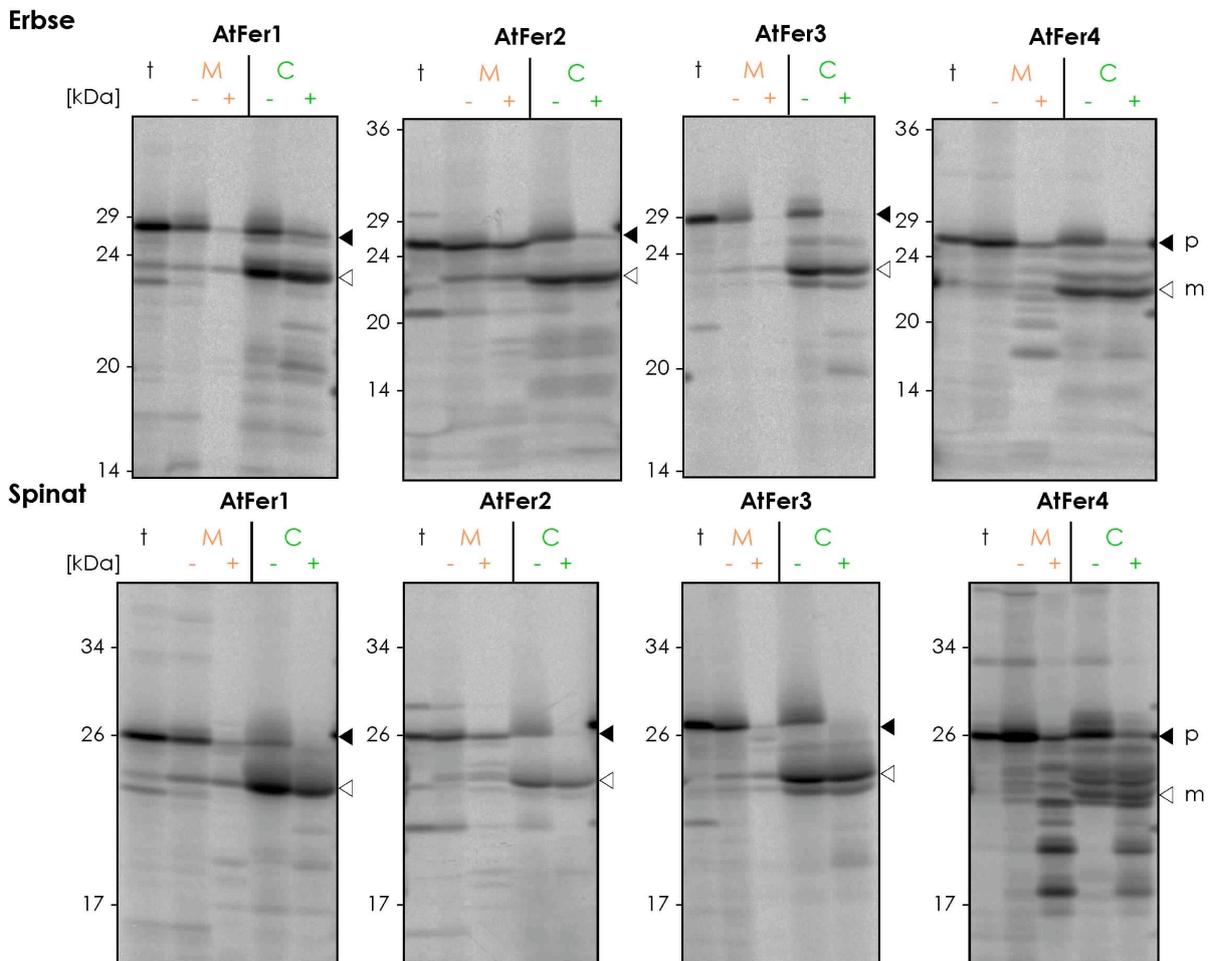
Beide Antikörper weisen die entsprechenden Proteine in den Chloroplasten aus Erbse und Spinat nach. Die *Western* Analyse des 33 kDa Proteins zeigt, dass die Erbsenmitochondrien lediglich mit geringen Mengen an Thylakoiden kontaminiert sind (Abb. 2.12, links). Im Gegensatz dazu ist der Anteil der Thylakoidkontamination der Mitochondrien aus Spinat vergleichsweise erhöht (Abb. 2.12). Da hier auch das Signal des stromalen Proteins (FNR) in der *Western* Analyse detektiert wurde, kann daraus geschlossen werden, dass geringe Mengen intakter Plastiden in den Spinatmitochondrien vorliegen (Abb. 2.12, rechts). Zusammenfassend zeigen die *Western* Analysen, dass sowohl Mitochondrien als auch Chloroplasten aus beiden Pflanzenspezies erfolgreich präpariert werden können und nur geringfügige Kontaminationen der Mitochondrien mit Plastiden bzw. Thylakoiden vorliegen.

### 2.3.3 *In vitro* Organelltransport der Ferritine

#### 2.3.3.1 Einzelorganellimport der *Arabidopsis* Ferritine

Im Anschluss an die immunologischen Nachweise der Organellen, wurde das Transportverhalten der Ferritine in beide Organellen untersucht. Dazu wurden die isolierten Mitochondrien und Chloroplasten in *in organello* Importexperimenten eingesetzt.

Für eine bessere Vergleichbarkeit sind in Abbildung 2.13 die Mitochondrien- und Chloroplastenimporte nebeneinander aufgetragen. Analog zu den Plastidenimporten (Abb. 2.3) erfolgten diese Importversuche mit Organellen aus Erbse und Spinat. Wie bereits gezeigt werden die *Arabidopsis* Ferritine sowohl in Chloroplasten aus Erbse als auch aus Spinat importiert (Abb. 2.13). Des Weiteren werden alle vier Ferritine ebenso in Erbsenmitochondrien transportiert. Folglich liegt eine duale Lokalisierung dieser Proteine vor. In Spinatmitochondrien werden dagegen nur drei Ferritine eindeutig importiert. Somit sind die *Arabidopsis* Ferritine Kandidaten für das als *dual targeting* bezeichnete Phänomen.

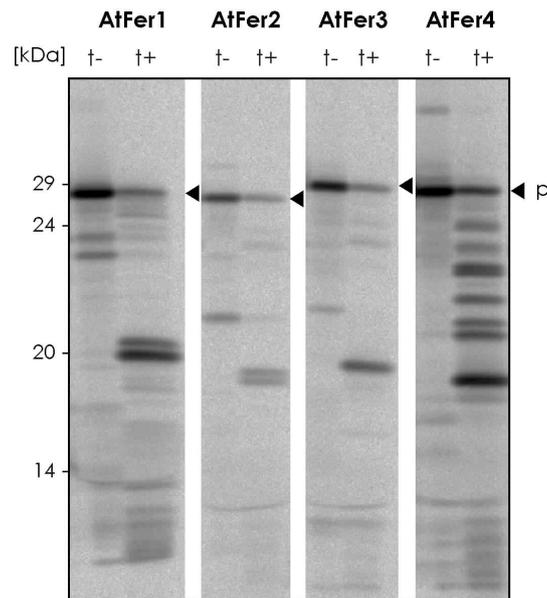


**Abb. 2.13: In organello Importe der Ferritine in Mitochondrien und Chloroplasten.** Dargestellt sind Expositionen von 10-15%igen SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli (1970)). *In vitro* synthetisierte, radioaktiv markierte Vorläuferproteine (**t**-Translation) wurden mit isolierten Mitochondrien (**M**) bzw. Chloroplasten (**C**) aus Erbse oder Spinat für 30 min bei 25 °C im Licht inkubiert. Anschließend wurde ein Teil der Organellen mit Thermolysin behandelt (**M+**, **C+**) und der andere Teil blieb unbehandelt (**M-**, **C-**). Die erhaltenen Fraktionen wurden auf ein SDS-Gel geladen und nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Es wurden folgende Mengen aufgetragen: für Mitochondrien jeweils 50  $\mu\text{g}$  Protein und für Plastiden je 12,5  $\mu\text{g}$  Chlorophyll, sowie 1  $\mu\text{l}$  des zum Import eingesetzten Translationsansatzes. Die Größen der mitgeführten Marker sind in kDa angegeben. Die schwarze Pfeilspitze markiert das Vorläuferprotein (**p-precursor**), die weiße Spitze das reife Protein (**m-mature**).

Betrachtet man nun den Import der Ferritine im Einzelnen, so zeigt AtFer1 eine deutliche Präferenz für Plastiden, abgesehen davon finden sich auch signifikante Mengen des reifen Proteins in den Mitochondrien (Abb. 2.13). Das reife AtFer1 weist zudem in beiden Organellen die gleiche Größe auf, so dass anzunehmen ist, dass die Prozessierung in beiden Organellen an einer ähnlichen Position im Molekül erfolgt. Es gibt dabei keinen Unterschied, ob Organellen aus Erbse oder Spinat für den Import verwendet wurden. Auch das Transportverhalten von AtFer2 und AtFer3 weist Ähnlichkeiten zu dem von AtFer1 auf. So treten keine Unterschiede im Importverhalten zwischen den Organellen aus Erbse und Spinat auf. Es erfolgt wiederum ein präferentiell stärkerer Chloroplastenimport und in beiden Organellen sind gleich große Prozessierungsprodukte bzw. reife Proteine vorhanden. Dagegen fällt auf, dass bei AtFer2 im Vergleich zu den anderen drei Ferritinen in den proteasebehandelten Mitochondrien erhebliche Mengen des Vorläuferproteins vorhanden sind (Abb. 2.13, M+). Dieses liegt anscheinend vor Proteaseabbau geschützt vor. Beide Proteine, AtFer3 und AtFer4, weisen auch im Import in Mitochondrien zwei Prozessierungsprodukte auf, welche schon im Plastidenimport zu beobachten waren (Abb. 2.3). Der Import von AtFer4 in Mitochondrien wird nur mit Erbse beobachtet. Dagegen erfolgte ein Chloroplastenimport sowohl mit Erbse als auch mit Spinat (Abb. 2.13). Jedoch konnte kein Import von AtFer4 unter Verwendung von Spinatmitochondrien detektiert werden. AtFer4 besitzt zusätzlich zu den beiden Importbanden weitere Banden. Diese zusätzlichen Banden erschweren die Unterscheidung zu den von der mitochondriellen Prozessierungspeptidase (MPP) generierten reifen Proteinen. Die Ausprägung dieser zusätzlichen Banden schwankte zwischen verschiedenen Importversuchen und ist beispielsweise beim Vergleich von Erbse- und Spinatimport gut zu erkennen (Abb. 2.13). Diese Banden wurden immer beobachtet und erschwerten die Importanalyse von AtFer4. Die meisten Banden von AtFer4 werden nach Thermolysinbehandlung generiert und stellen spezifische proteolytische Abbauprodukte des Vorläuferproteins im Bereich von 20-29 kDa dar (Abb. 2.13 und 2.14).

Die zusätzlich durchgeführte Proteasebehandlung der Vorstufenproteine der Ferritine führt zu unterschiedlichen Abbauprodukten. Bei AtFer1 und AtFer2 entstehen bei 19-21 kDa jeweils Doppelbanden, während AtFer3 im selben Größenbereich nur ein Abbauprodukt aufweist (Abb. 2.14). Dagegen werden für AtFer4 viele Banden detektiert, welche spezifische Abbauprodukte darstellen und auch nach Organellimport und Proteasebehandlung auftraten. Die proteolytischen Produkte der Ferritine liegen nicht auf Höhe der Importbanden der reifen Proteine bei ca. 24 kDa. Dies zeigten parallel dazu aufgetrennte Importproben (Daten nicht gezeigt). Damit konnte der erfolgte Organelltransport der Ferritine bestätigt werden.

In diesem Abschnitt konnte für alle vier Ferritine der Organelltransport in Erbse und für drei Ferritine in Spinat gezeigt werden. Diese duale Lokalisierung in Mitochondrien

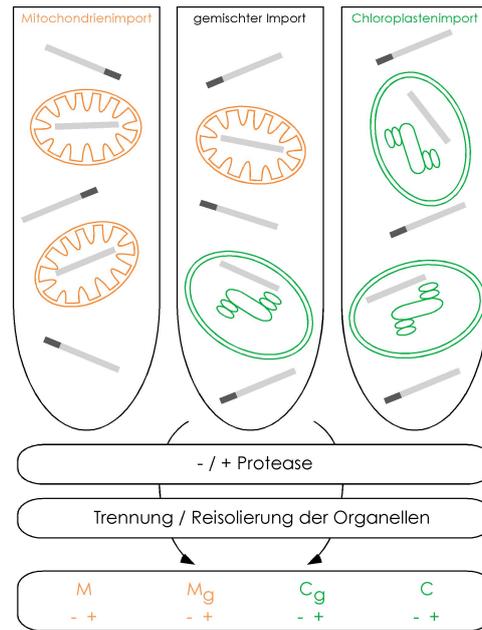


**Abb. 2.14: Thermolysinbehandlung der *in vitro* synthetisierten Vorläuferproteine.** Dargestellt sind Expositionen von 10-15 %igen SDS-Gelen (Laemmli (1970)). Die Translationen wurden mit 150  $\mu\text{g/ml}$  Thermolysin inkubiert, mit EDTA gestoppt und anschließend auf einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Aufgetragen wurden die unbehandelten (t-) und die mit Thermolysin behandelten Vorläuferproteine (t+). Die Banden der Vorläuferproteine sind mit einer schwarzen Pfeilspitze markiert.

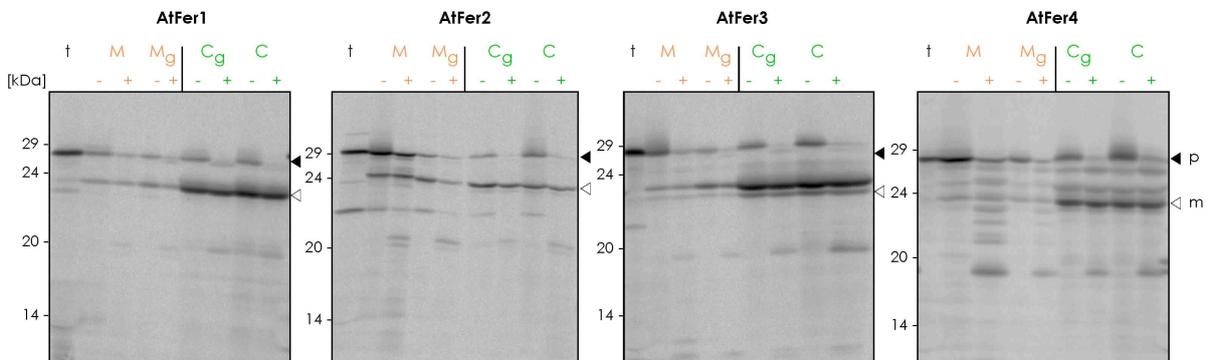
und Chloroplasten wird auch als *dual targeting* bezeichnet. Die folgenden Importexperimente wurden ausschließlich mit Erbsenorganellen durchgeführt, da hier sowohl eine reinere Präparation der Organellen gelingt (Abschnitt 2.3.2.2), als auch für alle Ferritine eindeutige Transportergebnisse zu beobachten sind (Abb. 2.13). Obwohl ein Transport in die Organellen beider Pflanzenspezies die Möglichkeit eines potentiellen Fehltransports reduziert, muss der Mitochondrien- und Plastidentransport der Ferritine weiter untersucht werden, da nur so ein *dual targeting* Verhalten der Ferritine bewiesen werden kann.

### 2.3.3.2 *Dual targeting* der Ferritine im gemischten Importansatz

In den gezeigten Einzelorganellimportansätzen wurden für alle vier *Arabidopsis* Ferritine ein Transport in Mitochondrien und Chloroplasten aus Erbse beobachtet. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass der beobachtete Import in beide Organellen nur aufgrund des Fehlens des jeweils anderen Organells erfolgt, sollte ein gemischter Organellimportversuch der Ferritine erfolgen. Dieser wurde von Rudhe et al. (2002a) entwickelt und ermöglicht es, den Import in Anwesenheit beider Organellen durchzuführen und im Anschluss daran die Mitochondrien und Chloroplasten wieder zu trennen. Mit Hilfe dieses Ansatzes kommt man der *in vivo* Situation in einer Pflanzenzelle näher und eventuelles Fehltargeting sollte verhindert werden. Zunächst wird kurz das Prinzip des gemischten Organelltransports vorgestellt (Abb. 2.15).

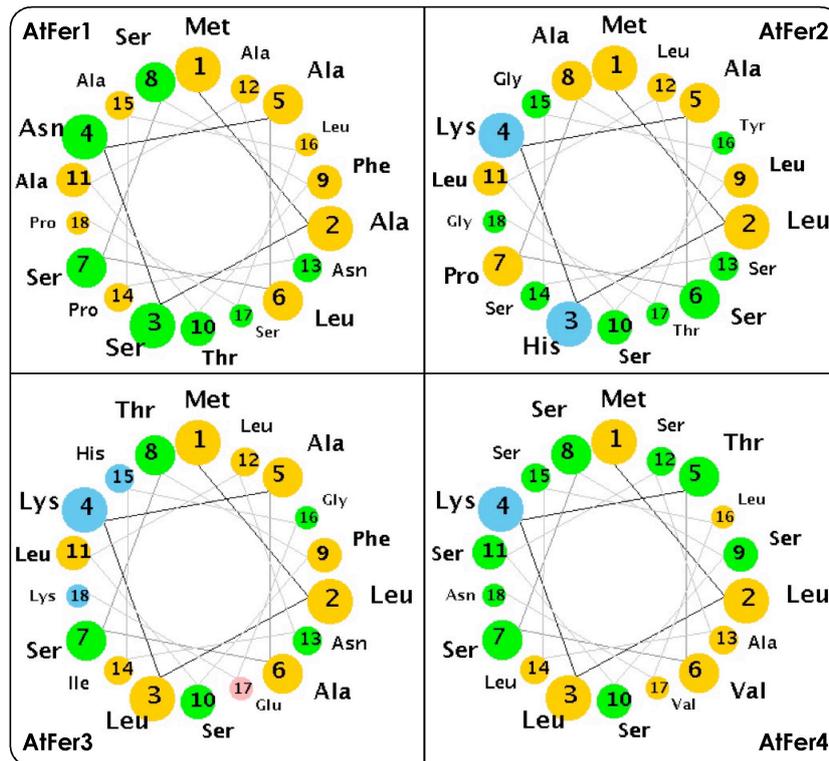


**Abb. 2.15: Schema eines gemischten Organellimports.** Der gemischte Importansatz ist im Vergleich mit den Einzelimporten dargestellt. In allen drei Importansätzen wird das radioaktiv markierte Vorläuferprotein mit den Organellen inkubiert. Im Anschluss wird eine Hälfte des Importes mit Thermolysin inkubiert und somit nicht importiertes Protein abgebaut. Im gemischten Ansatz erfolgt anschließend die Trennung der Organellen mittels Percollkissen.



**Abb. 2.16: Vergleich des Einzelimports mit dem gemischten Importansatz.** Es sind Expositionen von 10-15%igen SDS-Gele (Laemmli (1970)) abgebildet. Der Import wurde mit Erbsenorganellen durchgeführt und erfolgte analog zu den Einzelimporten (siehe Abb. 2.13). Die Organellen des gemischten Importansatzes ( $M_g$  und  $C_g$ ) werden im Anschluss an den Proteaseverdau mittels 4%igen Percollkissen wieder getrennt. Für weitere Details siehe Abbildung 2.13.

Simultan mit dem gemischten Ansatz werden zum besseren Vergleich zudem die Einzelorganellimporte durchgeführt. Für den gemischten Importansatz werden die isolierten Organellen zusammengegeben und mit dem *in vitro* synthetisierten Vorläuferprotein analog zum Einzelimport im Licht inkubiert. Anschließend werden die Ansätze in zwei Fraktionen (ohne und mit Proteasebehandlung) unterteilt. Nach Inkubation mit Thermolysin werden die Organellen in einem Zentrifugationsschritt mittels Percollkissen reisoliert. Die Plastiden befinden sich am Boden des Reaktionsgefäßes, während die



**Abb. 2.17: Helical wheel der Transitpeptide der Ferritine.** Die Helixräder (*helical wheel*) wurden mit Hilfe eines Programms (<http://cti.itc.virginia.edu/cmgi/Demo/wheel/wheelApp.html>) generiert. Es erfolgte eine farbliche Markierung der Aminosäuren nach nichtpolaren (orange), polaren bzw. ungeladenen (grün), sauren (rosa) und basischen (blau) Resten. Dargestellt sind die Helixräder der jeweils ersten 18 Aminosäuren der Transitpeptide der Ferritine.

Mitochondrien weiterhin auf dem Percollkissen liegen.

Das Importverhalten der vier *Arabidopsis* Ferritine unterscheidet sich zwischen Einzelansatz und gemischten Ansatz kaum. Es werden alle Ferritine ungefähr in gleichem Maße in beide Organellen transportiert wie im Einzelimport (Abb. 2.16). Auch wenn z.T. leichte Schwankungen des Transports zu beobachten sind, unterscheidet sich der gemischte Import nicht signifikant von dem des Einzelorganellimportes. Allerdings fällt auf, dass die Mitochondrien des gemischten Importansatzes von AtFer2 nicht völlig proteasestabil sind, da sowohl das Signal des Vorläuferproteins als auch das des reifen Proteins abnimmt. Trotz geringfügiger Unterschiede führt der gemischte *in vitro* Import zum selben Ergebnis wie die Einzelimporte: alle vier Ferritine aus *Arabidopsis thaliana* zeigen *dual targeting* Verhalten.

Die duale Lokalisierung der Ferritine warf nun die Frage auf, ob diese Proteine bzw. deren Transitpeptide auch Eigenschaften mitochondrieller Transportsignale z.B. eine amphipathische  $\alpha$ -Helix aufweisen (von Heijne (1986)). In Abbildung 2.17 ist zu erkennen, dass die Transitpeptide der vier Ferritine die Möglichkeit zur Ausbildung von amphipathischen  $\alpha$ -Helices haben. Eine Helixseite besteht vorwiegend aus nichtpolaren, die andere

aus polaren oder geladenen Aminosäuren. Für AtFer3 lässt sich nur eine Hälfte eines Helixrades erstellen (Abb. 2.17, von Methionin 1 bis Alanin 6). Von Glutaminsäure 17 bis Threonin 8 weist die Helix von AtFer3 eine eher heterogene Verteilung der Aminosäurereste auf. Insgesamt scheinen die Transportsignale der *Arabidopsis* Ferritine zur Ausbildung amphipathischer  $\alpha$ -Helices befähigt zu sein. Dies könnte den beobachteten Transport der Ferritine in die Mitochondrien erklären.

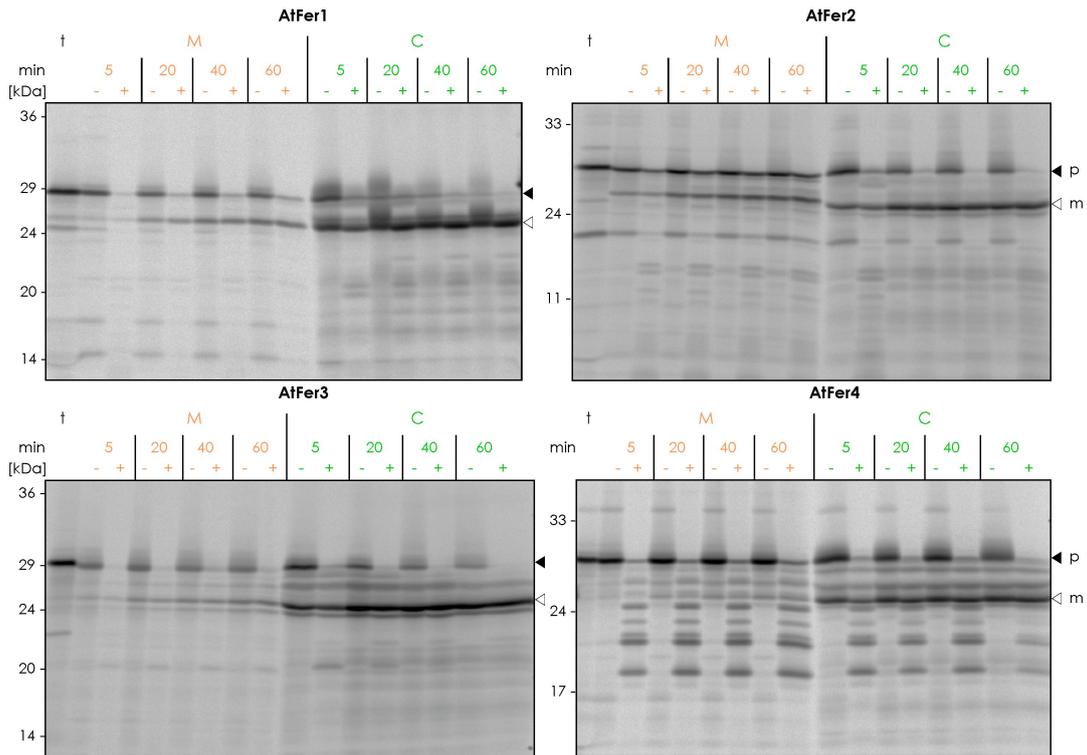
### 2.3.4 Variationen des Ferritintransports in pflanzliche Organellen

#### 2.3.4.1 Zeitabhängigkeit des Organellimports der Ferritine

In diesem Abschnitt soll das Transportverhalten der Ferritine in zeitabhängigen Importexperimenten weiterführend untersucht werden. Daher wurde zunächst eine Kinetik des Mitochondrien- und Chloroplastenimportes der Ferritine durchgeführt.

Für alle vier Ferritine kann eine Zunahme des reifen Proteins in Abhängigkeit der Importzeit beobachtet werden (Abb. 2.18). Der Plastidenimport ist bereits nach 20 Minuten nahezu gesättigt, da die Ferritine anscheinend schnell erkannt und entsprechend effizient in die Chloroplasten transportiert werden. Folglich lassen sich kaum Intensitätsunterschiede zu den 40 bzw. 60 minütigen Zeitpunkten erkennen. Dennoch scheinen die Plastiden weiterhin die Ferritine zu importieren, da die an der äußeren Hüllmembran gebundenen Vorstufenproteine mit der Zeit abnehmen.

Die Kinetik von AtFer1 zeigt eine deutliche Zunahme des reifen Proteins im Mitochondrienimport nach einer Stunde Inkubation (Abb. 2.18). Diese Akkumulation bestätigt den Import von AtFer1 in die Mitochondrien. Das mit guter Effizienz in die Mitochondrien importierte AtFer2 akkumuliert ebenfalls mit der Zeit in diesen. Hier fällt erneut auf, dass das gebundene Vorstufenprotein durch die Zugabe von Thermolysin kaum abgebaut wird. Es scheint vor einem proteolytischen Angriff geschützt vorzuliegen. Diese Proteasestabilität des Vorläuferproteins wird nur beim Mitochondrienimport von AtFer2 beobachtet und tritt bei den anderen drei Ferritinen nicht auf. AtFer3 wird im Organellimport immer zu zwei reifen Proteinen prozessiert (Abb. 2.3, 2.13 und 2.16). Diese beiden Importbanden reichern sich in der Kinetik in den Mitochondrien an, so dass ein klarer Transport von AtFer3 in diese gezeigt werden kann. Das letzte Ferritin, AtFer4, welches aufgrund der verstärkt auftretenden Abbaubanden (Abb. 2.13, AtFer4, M+ Spur) nur bedingt untersucht werden konnte, weist in der Zeitreihe eine signifikante Zunahme des reifen Proteins auf. Nach einer Stunde Inkubation sind nun auch die reifen Proteine in den Mitochondrien gut zu erkennen. Im Fall von AtFer1 befindet sich bereits in der Translationsspur eine Bande auf Höhe des reifen Proteins. Anhand dieses Versuches



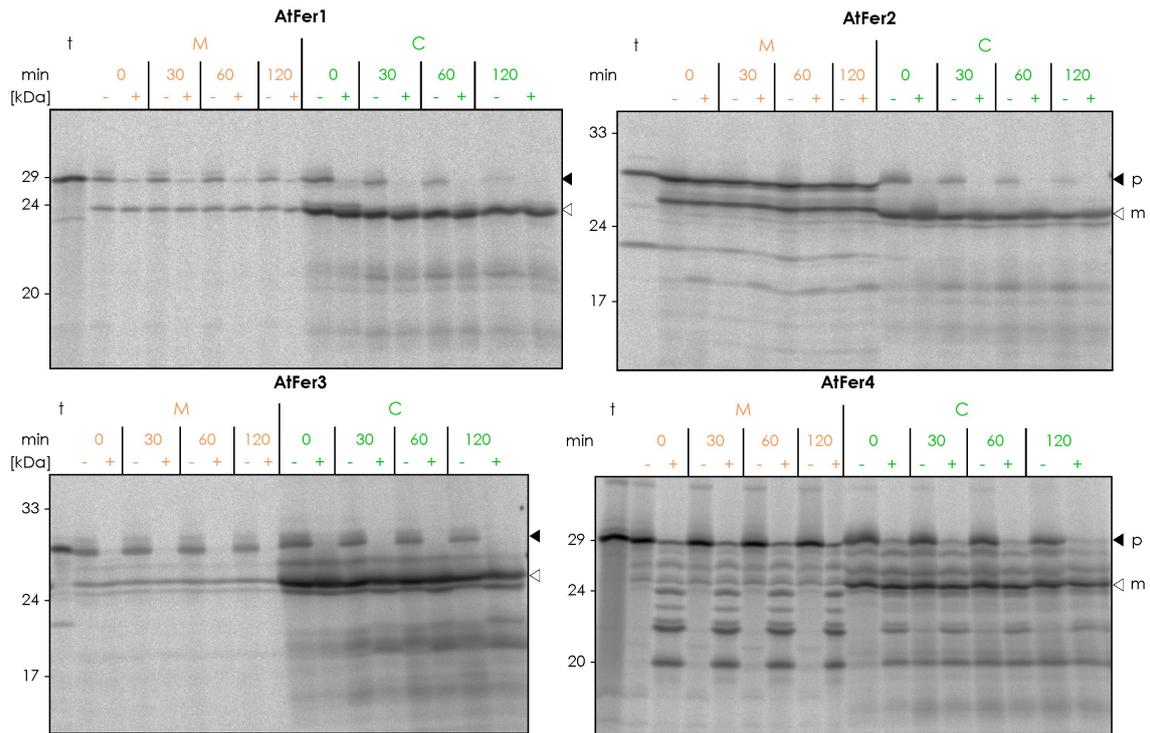
**Abb. 2.18: Zeitabhängiger Organelltransport der Ferritine.** Dargestellt sind Expositionen von 10-15%igen SDS-Gelen (Laemmli (1970)). Die Importreaktionen fanden unter Standardbedingungen statt und unterschieden sich lediglich hinsichtlich der Inkubationszeit (5-60 min) im Licht. Für weitere Details siehe Abbildung 2.13.

kann für AtFer1 gezeigt werden, dass ein Import in die Mitochondrien vorliegt, da von einem nur bindenden Translationsprodukt keine Zunahme des Signals in der Zeitreihe zu erwarten wäre.

Mit Hilfe des zeitabhängigen Imports konnte für alle Ferritine gezeigt werden, dass die reifen Proteine in den Mitochondrien akkumulieren. Nach einer Stunde Inkubation ist ein deutlicher Transport der schwach importierenden Ferritine (AtFer3 und AtFer4) ersichtlich. Im Vergleich mit den Mitochondrien scheint der Plastidenimport der Ferritine effizienter zu sein.

### 2.3.4.2 Stabilität der importierten Ferritine in den Organellen

Der kontinuierliche Transport der Ferritine in die Organellen (Abb. 2.18) führt zu der Fragestellung der Stabilität der Ferritine innerhalb dieser Organellen. Man kann beispielsweise davon ausgehen, dass bei einem Fehltransport des Proteins, das Organell dieses als falsch lokalisiert erkennt und daher abbaut. Liegt kein Fehltargeting der Proteine vor, sollten die importierten Proteine über einen längeren Zeitraum im Organell stabil sein. Um dies zu untersuchen wurden die Organellen nach erfolgtem Import gewaschen und eine Hälfte jedes Imports zur Entfernung der verbliebenen Vorläuferproteine



**Abb. 2.19: Stabilität der importierten Ferritine innerhalb der Organellen.** Dargestellt sind die Expositionen von 10-15%igen SDS-Gelen (Laemmli (1970)). Der Import erfolgte unter Standardbedingungen (siehe Abb. 2.13). Im Anschluß an den Import und die Proteasebehandlung wurde der Zeitpunkt null gesetzt und die Organellen bei 25 °C bis zu 2 Stunden im Licht inkubiert. Für weitere Details siehe Abbildung 2.13.

mit Protease behandelt. Anschließend wurden die Organellen bis zu zwei Stunden unter Importbedingungen (Licht, 25 °C) inkubiert.

Nach einer solchen Zeitreihe zeigt sich, dass die Ferritine sowohl in den Mitochondrien als auch in den Chloroplasten stabil sind (Abb. 2.19). Insbesondere die Signale in den Mitochondrien verzeichnen keine Ab- oder Zunahme der Proteine, folglich werden die bereits importierten Ferritine weder abgebaut, noch scheinen die von außen gebundenen Vorläuferproteine in nennenswertem Umfang in die Organellen transportiert zu werden. Auch in den Plastiden sind die *Arabidopsis* Ferritine über mehrere Stunden stabil. Interessanterweise scheint die Menge plastidär gebundener Vorstufenproteine bei allen vier Ferritinen mit der Zeit abzunehmen, während bei den Mitochondrien keine Verringerung zu beobachten ist. Die reifen Ferritine in den Plastiden sind zwar überwiegend stabil, allerdings sind nach zwei Stunden Inkubation geringe Abnahmen der Signalintensitäten zu verzeichnen (Abb. 2.19). Eine mögliche Ursache wäre, dass ein kleiner Teil der Chloroplasten während der Inkubation zerstört wurde und dies zur Freisetzung von Stroma führte. Dadurch ist dann eine Abnahme der stromal lokalisierten Ferritine zu beobachten. Nach dem Import in Mitochondrien und Chloroplasten sind alle vier Ferritine über einen größeren Zeitraum in beiden Organellen stabil und werden nicht als

falsch lokalisiert erkannt und abgebaut.

### 2.3.4.3 Einfluss des Pflanzenalters auf den Import der Ferritine

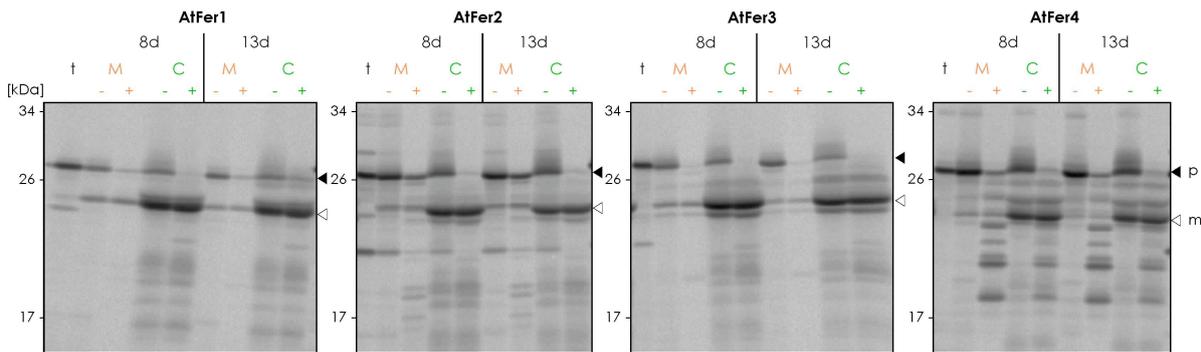
Die bisherigen Daten zeigen, dass die vier *Arabidopsis* Ferritine in beiden Organellen lokalisiert sind und dort vermutlich als Eisenspeicher fungieren können. Möglicherweise haben auch physiologische Veränderungen einen Einfluss auf das Importverhalten der Ferritine, da in verschiedenen Altersstufen unterschiedliche Anforderungen an die Pflanzenzelle bzw. die Zellorganellen gestellt werden.

Für diesen Ansatz wurden Organellen aus Erbsenpflanzen unterschiedlichen Pflanzenalters isoliert. Zum einen wurden junge Pflanzen mit vorwiegend geschlossenen Blättern verwendet (8 Tage alt) und zum anderen Erbsenpflanzen mit vollkommen entfalteten Blättern (13 Tage alt). Obwohl ein Altersunterschied von fünf Tagen gering erscheint, befinden sich die Pflanzen zu diesen Zeitpunkten in unterschiedlichen Entwicklungsstufen (Abb. 2.20). In den bisher gezeigten Importen wurden Organellen verwendet, welche von Erbsenpflanzen mit zumeist geschlossenen Blättern stammten. Dabei ist der Anteil an Organellen aus Blattgewebe im Vergleich zu den 13 Tage alten Pflanzen deutlich verringert (Abb. 2.20).



**Abb. 2.20: Erbsenpflanzen unterschiedlichen Alters.** Es sind 8 und 13 Tage alte Pflanzen gezeigt. Die jungen Erbsen haben zumeist noch geschlossene Blätter, während die älteren Pflanzen vollkommen entfaltete Blätter aufweisen.

Verwendet man nun parallel präparierte Organellen aus diesen unterschiedlich alten Pflanzen in einem Einzelorganellansatz, so lassen sich sowohl beim Chloroplasten- als auch beim Mitochondrienimport Unterschiede erkennen (Abb. 2.21). Es ist allen Ferritinen gemein, dass der Plastidenimport mit steigendem Alter leicht abnimmt. Eine mögliche Erklärung ist, dass der allgemeine Bedarf an neu importierten Proteinen in die Plastiden bei adulten Blattgewebe reduziert sein könnte, so dass insgesamt weniger Import stattfindet. Mit Ausnahme von AtFer2 kann im Mitochondrienimport (AtFer1, AtFer3 und AtFer4) mit steigendem Alter ebenfalls eine Abnahme der Signalintensitäten



**Abb. 2.21: Import der Ferritine in Organellen aus verschiedenen alten Pflanzen.** Dargestellt sind Expositionen von 10-15%igen SDS-Gele. Der Einzelimport wurde mit Organellen durchgeführt, welche aus 8 bzw. 13 Tage alten Erbsenpflanzen isoliert wurden. Die Importreaktion erfolgte unter Standardbedingungen. Für weitere Details siehe Abbildung 2.13.

der reifen Proteine beobachtet werden. Einzig bei AtFer2 ist der Import in Mitochondrien aus älteren Pflanzen gleich bzw. leicht erhöht.

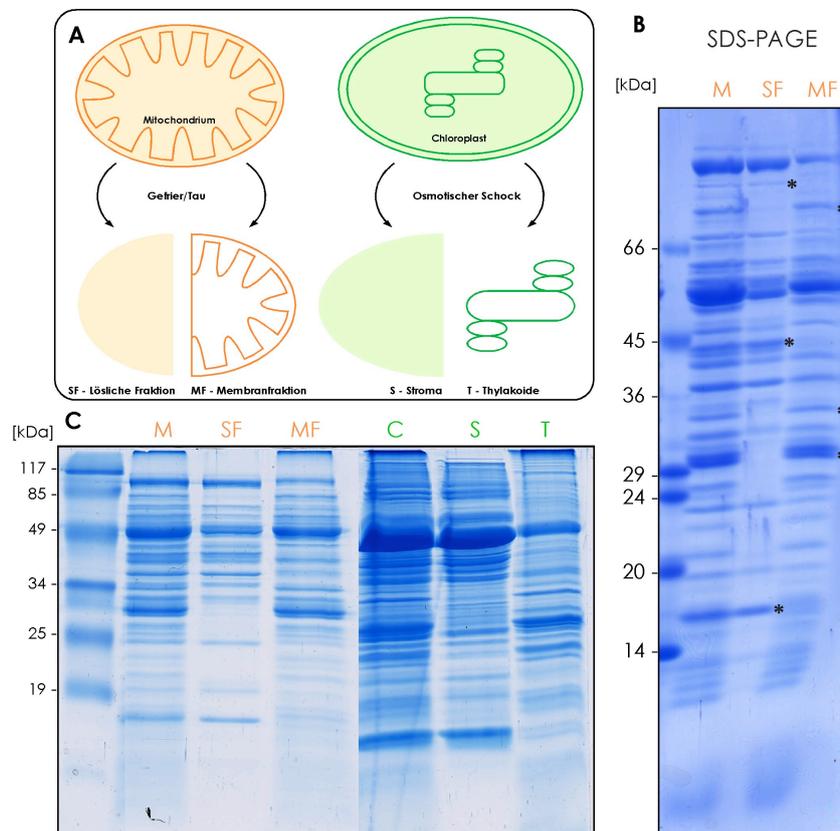
Die gezeigten Daten geben Hinweise darauf, dass auch das Alter der isolierten Organellen einen Einfluss auf den Transport der Ferritine hat. Als Ursache kommen physiologische Faktoren in Frage. So könnte es sein, dass Organellen aus älteren Pflanzen z.B. einen erniedrigten Bedarf an frisch importierten Proteinen haben. Des Weiteren könnten Organellen verschiedenen Pflanzenalters einen Bedarf an unterschiedlichen Proteinen haben. Möglicherweise haben weitere Faktoren, z.B. unterschiedliche Lichtbedingungen oder Nährstoffverfügbarkeit, einen Einfluss auf den Transport von Proteinen. Im Fall von *dual targeting* Proteinen könnte je nach Bedarf der Import zu Gunsten eines der beiden Organellen verschoben werden.

## 2.4 Lokalisierung und Assemblierung der Ferritine in beiden Organellen

### 2.4.1 Analyse der Fraktionierung der Organellen

In den vorangegangenen Abschnitten konnte eine duale Lokalisierung der Ferritine in Mitochondrien und Chloroplasten mittels *in vitro* Importexperimenten gezeigt werden. Im Anschluss daran ist es von besonderem Interesse die Lokalisierung innerhalb der Organellen zu bestimmen. Für den Aufschluss der Chloroplasten lag bereits ein etabliertes Protokoll vor, welches in der vorliegenden Arbeit erfolgreich angewendet wurde (Abb. 2.3). Für die Fraktionierung der Mitochondrien in Matrix, Intermembranraum, innere und äußere Membran fehlte ein entsprechendes Protokoll. Zur Anwendung der Mitochondrienfraktionierung im Anschluss an ein *in organello* Importexperiment wurde die Fraktionierung weiter vereinfacht. Dabei werden die sedimentierten Mitochondrien

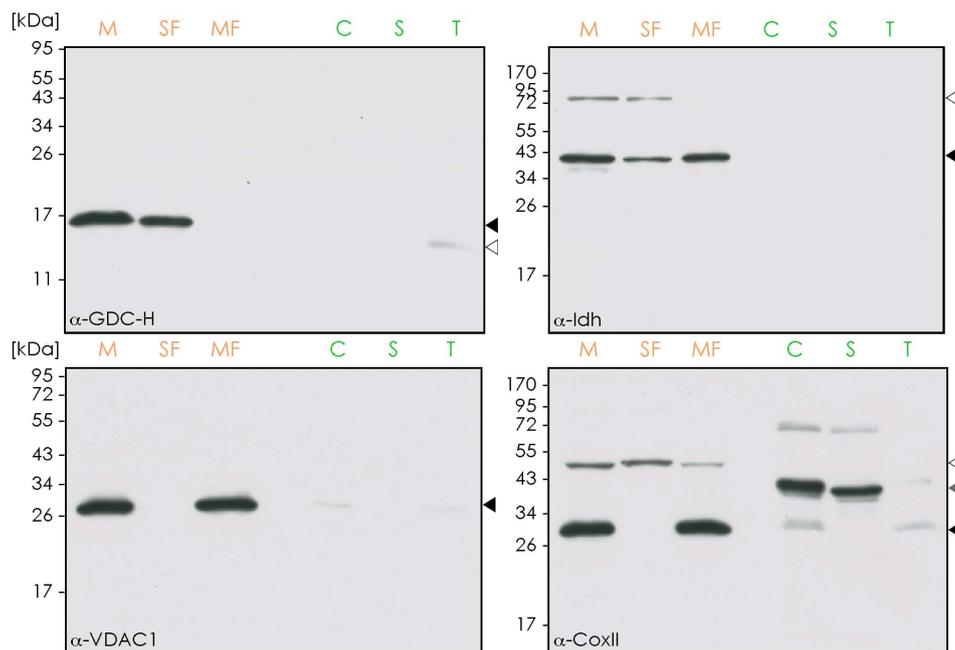
in Pufferlösung aufgenommen und anschließend mittels Gefrier-/Tau-Zyklen aufgeschlossen. Im nächsten Schritt erfolgt mittels Zentrifugation eine Trennung der Membranen (Membranfraktion) von den löslichen Bestandteilen (Intermembranraum, Matrix) (Abb. 2.22, A). Der Großteil der mitochondrialen Proteine ist zum einen in der inneren Mitochondrienmembran (z.B. als Teil der Atmungskette) und zum anderen in der Matrix lokalisiert. Daher besteht die Membranfraktion (MF) hauptsächlich aus Proteinen der inneren Membran und die lösliche Fraktion (SF) aus Proteinen der mitochondrialen Matrix. In Abbildung 2.22 (A) ist neben der Fraktionierung der Mitochondrien auch die Lyse und Trennung der Chloroplasten dargestellt. Der Aufschluss der Plastidenhüllmembranen wird durch einen osmotischen Schock in hypotonischen Puffer erreicht. Anschließend werden die Thylakoide in einem Zentrifugationsschritt vom Stroma getrennt.



**Abb. 2.22: Darstellung der Organellfraktionierung.** Diese Abbildung zeigt: das Schema der Fraktionierung von Mitochondrien und Chloroplasten (A), ein 10-15%iges SDS-Gel (Laemmli (1970)) der Mitochondrienproben (B) und ein 15%iges Mini-SDS-Gel (Laemmli (1970)) mit den Fraktionen beider Organellen (C). Beide SDS-Polyacrylamidgele wurden Coomassie Colloidal gefärbt. In (C) sind eindeutig zugeordnete Banden mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Bei den Mitochondrienproben wurden jeweils  $10\ \mu\text{g}$  Protein und bei den Chloroplastenproben  $2,5\ \mu\text{g}$  Chlorophyll entsprechende Mengen aufgetragen. Die Spuren sind folgendermaßen bezeichnet: **M**-Mitochondrien, **SF**-lösliche Fraktion, **MF**-Membranfraktion, **C**-Chloroplasten, **S**-Stroma und **T**-Thylakoide.

Um einen ersten Eindruck der Fraktionierung der ORganellen zu erhalten wurden die isolierten Proben aus Mitochondrien und Chloroplasten unter denaturierenden Bedin-

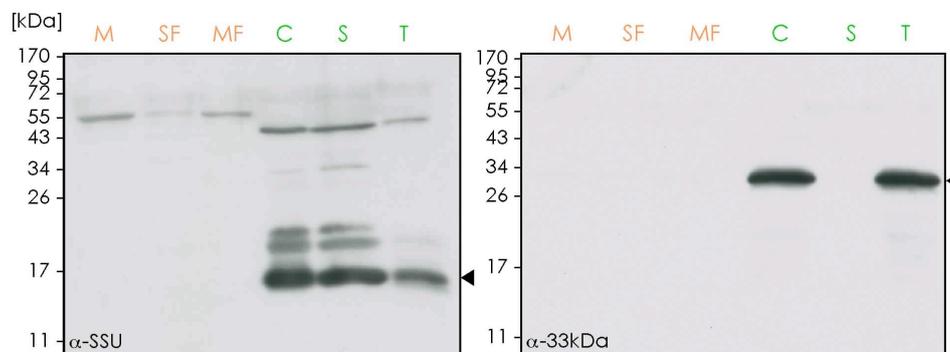
gungen aufgetrennt. Im Mini-SDS-Gel ist zu erkennen, dass die löslichen Fraktionen und Membranfraktionen der Mitochondrien bzw. Plastiden gut separiert werden können (Abb. 2.22, C). Zur besseren Auftrennung der erhaltenen Mitochondrienproben wurden diese zusätzlich mittels SDS-Gradientengel aufgetrennt, so dass nun die lösliche Fraktion eindeutig von der Membranfraktion zu unterscheiden ist (Abb. 2.22, B, mit Stern [\*] markierte Banden). Es wird sichtbar, dass einzelne Banden in der Mitochondrienspur (M) entweder der löslichen oder der Membranfraktion zugeordnet werden können. Diese erste gelelektrophoretische Untersuchung zur erfolgreichen Trennung beider Mitochondrienfraktionen wurde mit immunologischen Methoden ergänzt.



**Abb. 2.23: Western Analyse der fraktionierten Organellen.** SDS-Minigele (entsprechend Abb. 2.22 (C), Laemmli (1970)) wurden auf PVDF-Membranen geblottet und einer *Western* Analyse mit den entsprechenden Antikörpern unterzogen (siehe Abb. 2.11). Beladung und Bezeichnung der Gelspuren siehe Abbildung 2.22.

Dazu wurden die fraktionierten Organellen und Organellproben mittels SDS-Minigelen aufgetrennt (Abb. 2.22, B). Anschließend erfolgte der *Western* Transfer auf PVDF-Membranen durch die *semi-dry* Methode. Die Entwicklung der *Western Blots* erfolgte mit den bereits in Abschnitt 2.3.2.2 verwendeten Antikörpern gegen mitochondrielle Proteine. Die Antikörper gegen die H-Untereinheit des Glycindecarboxylasekomplexes (GDC-H, Fujiwara et al. (1990), Oliver (1994)) und die Isocitratdehydrogenase (Idh, Gálvez et al. (1998), Gray et al. (2004)) sollten Aufschluss darüber geben, ob in der löslichen Fraktion (SF) tatsächlich Matrix vorhanden war und wie gut diese von den Mitochondrienmembranen abgetrennt wurden. Das GDC-H-Protein wird ausschließlich in der löslichen Fraktion nachgewiesen (Abb. 2.23, schwarzer Pfeil). Das schwache Signal in der Thylakoidspur (weißer Pfeil) ist auf eine geringe Kreuzreaktivität des Antikörpers

zurückzuführen. Im Gegensatz dazu erkennt der Idh-Antikörper in allen drei Mitochondrienproben (M, SF, MF) das Monomer und zusätzlich das Dimer außer in der Membranfraktion. Weiterhin scheint das Idh-Monomer eine erhöhte Affinität zu den Mitochondrienmembranen zu besitzen. Dies wurde bereits von Behal & Oliver (1998) beobachtet. Ungeachtet dieser Membranassoziation des Monomers, bestätigt die ausschließlich lösliche Lokalisierung des Dimers der Idh eine erfolgreiche Trennung von Matrix und Membranfraktion. Des Weiteren wurden die Antikörper gegen VDAC1 (*Voltage-dependent anion-selective channel protein1*) und CoxII (Cytochrom Oxidase Untereinheit II) als Vertreter der äußeren bzw. inneren Mitochondrienmembran zur Analyse der erhaltenen Membranfraktion eingesetzt. Das VDAC1 wird nur in den Mitochondrien und den Membranen nachgewiesen (Abb. 2.23). Bereits in Abschnitt 2.3.2.2 wurden mit dem Antikörper gegen das CoxII-Protein Kreuzreaktivitäten mit plastidären Proteinen beobachtet. Betrachtet man alleinig das CoxII Antigen (Abb. 2.23, schwarzer Pfeil), so ist eine ausschließliche Lokalisierung in der Membranfraktion zu erkennen. Sowohl die Proteine der äußeren (VDAC1) als auch der inneren Membran (CoxII) sind in der erwarteten Membranfraktion (MF) enthalten. Demnach kann das erarbeitete Protokoll erfolgreich für die Fraktionierung der Mitochondrien in lösliche und Membranfraktion verwendet werden. Zur Vollständigkeit wurde auch der etablierte Plastidenaufschluss mit Antikörperrnachweis überprüft.



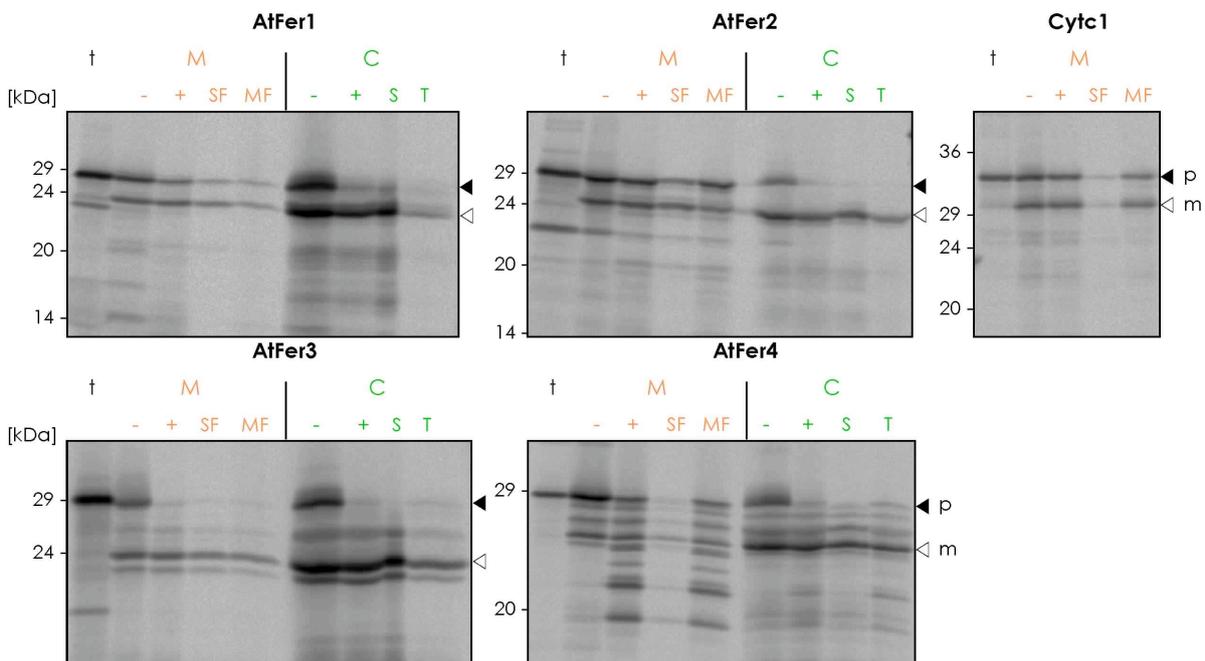
**Abb. 2.24: Western Analyse der fraktionierten Organellen.** SDS-Minigele (entsprechend Abb. 2.22 (C), Laemmli (1970)) wurden auf Membranen geblottet und mittels *Western* Analyse mit den entsprechenden Antikörpern detektiert (kleine Untereinheit der Rubisco [SSU], 33 kDa Protein [33kDa]). Für weitere Details siehe Abbildung 2.23.

Das Stroma der Plastiden wurde mit einem Antikörper gegen die kleine Untereinheit der Rubisco (SSU-*small subunit of Rubisco*) untersucht (Gutensohn et al. (2004)). Der größte Teil der SSU befindet sich wie erwartet im Stroma (Abb. 2.24), ein geringer Teil ist auch in den Thylakoiden nachweisbar. Dies beruht wahrscheinlich darauf, dass die Rubisco ein sehr prominentes Stromaprotein ist und mit der Thylakoidmembran assoziiert. Die Thylakoide wurden mit einem Antikörper gegen das 33 kDa Protein des Wasserspaltungsapparates detektiert (Abb. 2.24). Es werden ausschließlich Signale in

den Thylakoiden nicht aber in der Stromafraktion (S) sichtbar. Folglich wurden die Thylakoide erwartungsgemäß vom Stroma getrennt.

### 2.4.2 Lokalisierung der Ferritine innerhalb der Organellen

Das Fraktionierungsprotokoll wurde entwickelt um die Lokalisierung der Ferritine innerhalb der Mitochondrien bestimmen zu können. Daher wurde die Fraktionierung der Organellen im Anschluss an ein *in organello* Importexperiment durchgeführt. Als Kontrolle für die erfolgreiche Mitochondrienfraktionierung wurde das Protein Cytochrom c1 (Cytc1) verwendet (Rödiger (2003)), dieses ist Bestandteil des mitochondrialen Cytochrombc1-Komplexes und in der inneren Mitochondrienmembran verankert. In Abbildung 2.25 ist ein Import dieses Proteins in isolierte Mitochondrien dargestellt. Das Cytochrom c1 wurde in die Mitochondrien importiert und dort zum reifen Protein prozessiert. Ähnlich wie bei AtFer2 ist ein Großteil des Vorstufenproteins im Mitochondrienimport proteasegeschützt (M+). Nach der Fraktionierung der Mitochondrien wird das Cytochrom c1 erwartungsgemäß nur in der Membranfraktion detektiert. Dies zeigt, dass die Fraktionierung auch für die Verwendung im Anschluss an Importexperimente geeignet ist.



**Abb. 2.25: Lokalisierung der Ferritine innerhalb der Organellen.** Es sind Expositionen von 10-15%igen SDS-Polyacrylamidgelen gezeigt (Laemmli (1970)). Es wurden Einzelimportexperimente (Details siehe Abb. 2.13) der Ferritine und des mitochondrialen Kontrollproteins Cytochrom c1 (Cytc1) durchgeführt. Zusätzlich wurden im Anschluss an den Transport und die Thermolysinbehandlung die Organellen in lösliche (SF, S) und Membranfraktion (MF, T) getrennt (weitere Details siehe Abb. 2.22).

Die Bestimmung der suborganellen Lokalisierung der Ferritine wurde zum besseren Vergleich mit Mitochondrien und Chloroplasten parallel durchgeführt. Es ist der Aufschluss

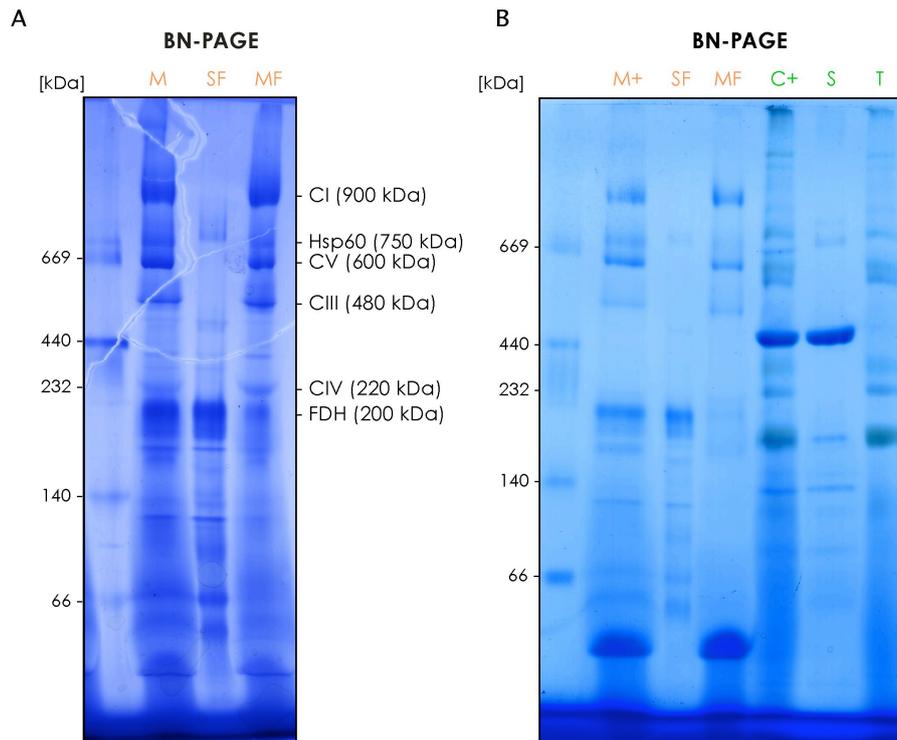
der Plastiden gezeigt, allerdings wurde auf die zusätzliche Proteasebehandlung der Thylakoide verzichtet. Alle vier Ferritine sind in den Plastiden, im Stroma und zu einem geringeren Teil in der Thylakoidfraktion lokalisiert (Abb. 2.25, vgl. Abb. 2.3). Innerhalb der Mitochondrien ist eine eindeutige Zuordnung der Ferritine nicht möglich. AtFer1, AtFer2 und AtFer3 verteilen sich in etwa gleichen Mengen auf die lösliche und die Membranfraktion. Das reife AtFer2 zeigt eine leichte Präferenz für die lösliche Fraktion und der verbleibende Vorläufer ist vor allem in der Membranfraktion lokalisiert. Das reife AtFer4 ist, wie sein Vorläufer, vor allem in den Membranen der Mitochondrien zu finden. Daraus ergeben sich zwei Lokalisierungen für die *Arabidopsis* Ferritine in den Mitochondrien: a) Gleichverteilung zwischen SF und MF (AtFer1, AtFer2, AtFer3) und b) Lokalisierung an den Membranen (AtFer4).

### 2.4.3 Ferritinkomplexe in Mitochondrien & Chloroplasten?

Die Fraktionierung und die entsprechende Lokalisierung der Ferritine in den Organellen wurde im vorherigen Abschnitt gezeigt. Da die *Arabidopsis* Ferritine im Plastiden hochmolekulare Komplexe bilden, soll nun untersucht werden, ob in den Mitochondrien ebenfalls solche funktionellen Komplexe zur Eisenspeicherung ausgebildet 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 auf einem BN-Gel (*Blue Native*) analysiert (vgl. Abb. 2.8). Dieses Gelsystem wurde für die native Elektrophorese membranständiger Proteinkomplexe entwickelt. Dennoch sollte eine gute Auftrennung der löslichen Proben möglich sein, da sich das BN-System vom CN-System (*Colorless Native*, für lösliche Proteine) nur in der Zugabe eines Detergenz und der Verwendung von Coomassie G250 im Kathodenpuffer unterscheidet. Ansonsten ist die Gel- und Pufferzusammensetzung von CN- und BN-PAGE identisch. Dem BN-Gel wurde kein Detergenz zugesetzt und lediglich die entsprechenden Membranproben mit Dodecylmaltosid (Mitochondrien) bzw. Digitonin (Chloroplasten) solubilisiert. Nach einem Import der Ferritine sollte es möglich sein sowohl Mitochondrien- als auch Plastidenkomplexe miteinander vergleichen zu können.

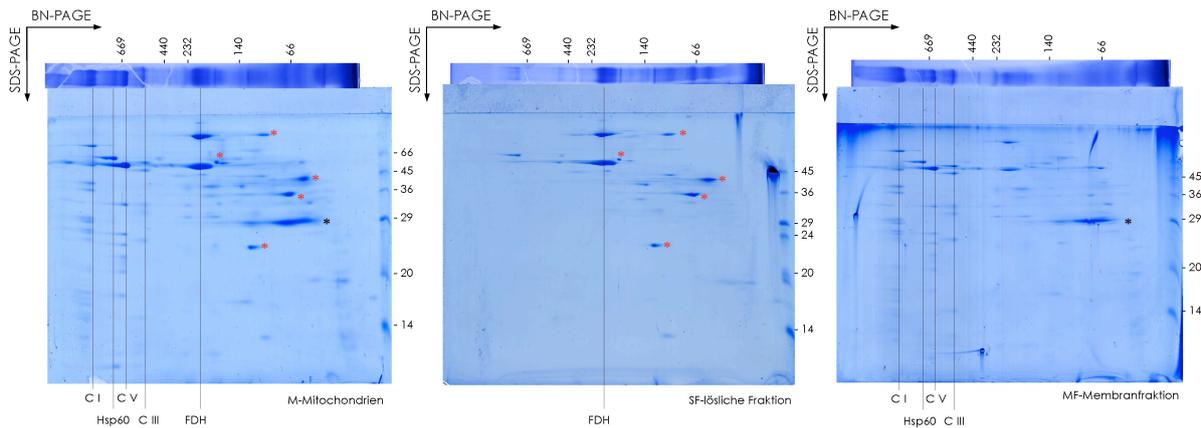
In Abbildung 2.26 (A) ist ein Coomassie Colloidal gefärbtes BN-Gel der Mitochondrienfraktionen dargestellt. Es werden verschiedene Komplexe detektiert, welche mit in der Literatur vorhandenen Daten (Jänsch et al. (1996), Giegé et al. (2003), Eubel et al. (2004), Zsigmond et al. (2008), Meyer et al. (2008),) verglichen und den entsprechenden Komplexen zugeordnet wurden. So 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



**Abb. 2.26: BN-PAGE der Proteinkomplexe der fraktionierten Organellen.** In (A) ist ein Coomassie Colloidal gefärbtes BN-Gel (Abb. 2.8) der fraktionierten Mitochondrien und in (B) eine Coomassie gefärbte BN-PAGE mit Organellproben eines Importexperiments zu sehen. Die mitochondrialen Komplexe sind Komplex I (CI), Hsp60 Komplex (Hsp60), Komplex V (CV), Komplex III (CIII), Komplex IV (CIV) und Formiatdehydrogenase (FDH).

überwiegend in der Membranfraktion. Im Gegensatz zu den größeren Komplexen der Membranfraktion weist die lösliche Fraktion vor allem kleinere Komplexe auf. Abbildung 2.26 (A) zeigt, dass die abgewandelte BN-PAGE eine gute Auftrennung sowohl der Membran- als auch der löslichen Fraktion der Mitochondrien ermöglicht und daher zur Analyse von Ferritinkomplexen eingesetzt werden kann.

Für vergleichende Analysen von Mitochondrien- und Chloroplastenfraktionen war es ebenfalls notwendig die Eignung der veränderten BN-PAGE für die Trennung des Stroma und der Thylakoide zu testen. Abbildung 2.26 (B) zeigt das Laufverhalten von Mitochondrien- und Plastidenproben nach erfolgtem *in organello* Import mit anschließender Fraktionierung in einem solchen Gelsystem. Die Mitochondrien weisen nach Import und BN-PAGE das gleiche Bandenmuster wie in Abbildung 2.26 (A) auf. Die photosynthetischen Proteinkomplexe der Chloroplasten werden in der Thylakoidfraktion gut sichtbar voneinander getrennt (vgl. Abb 2.8). Ebenso ist eine klare Unterscheidung in Stroma und Thylakoide möglich, welche insbesondere anhand der prominenten Rubisco Bande bei ca. 440 kDa zu erkennen ist (vgl. Abb 2.5). Die abgewandelte BN-PAGE eignet sich sowohl zur Trennung von löslichen als auch von Membranproteinkomplexen beider Organellen, so dass eine vergleichende Analyse der Proben möglich ist.



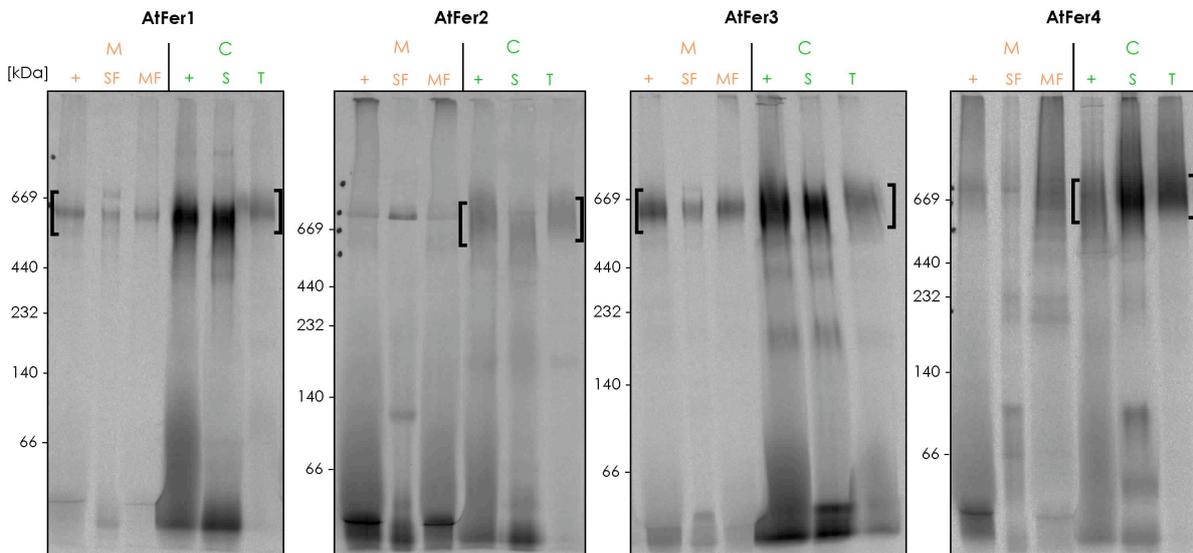
**Abb. 2.27: 2D-Analyse der mitochondrialen Proteinkomplexe.** Es sind Coomassie Colloidal gefärbte 15%ige SDS-Polyacrylamidgele (Laemmli (1970)) gezeigt. Auf die denaturierenden SDS-Gele wurden jeweils Gelstreifen einer BN-PAGE (siehe Abb. 2.26, A) geladen. Mit roten bzw. schwarzen Stern wurden die in der löslichen Fraktion bzw. Membranfraktion detektierten Proteinspots der Mitochondrien markiert. Zusätzlich wurden die Proteinkomplexe gekennzeichnet. Weitere Details siehe Abbildung 2.26.

Die in der ersten Dimension getrennten Proteinkomplexe der Mitochondrien (Abb. 2.26) wurden im Anschluss daran in der zweiten Dimension aufgetrennt. Dies diente zur weiteren Untersuchung der fraktionierten Mitochondrien und um einen Eindruck über das Mitochondrienproteom zu erhalten. Dazu wurden BN-Gelstreifen der Mitochondrien, der löslichen Fraktion sowie der Membranfraktion auf einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt. Die mittels Coomassie Colloidal gefärbten Gele sind in Abbildung 2.27 gezeigt. So wurden die Komplexe der 1D-BN-PAGE auch in der zweiten Dimension beobachtet. Die Untereinheiten dieser Komplexe wurden nach ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennt. Diese konnten anhand bekannter 2D-Gele aus der Literatur und der Proteinkomplexe der BN-PAGE entsprechend zugeordnet werden (Jänsch et al. (1996), Eubel et al. (2003), Giegé et al. (2003), Eubel et al. (2004), Meyer et al. (2008)). Die Proteinspots der Mitochondrien (M) sind über den gesamten Gelbereich verteilt. Dagegen zeigt die lösliche Fraktion (SF) vor allem Proteinspots im oberen rechten Bereich des Gels. Dies ist zum einen auf die Größe der Komplexe der BN-PAGE zurückzuführen und zum anderen enthalten diese vor allem Proteine größer als 30 kDa. In der Membranfraktion (MF) sind wie erwartet vor allem die Atmungskettenkomplexe zu erkennen. Es werden zudem noch andere Proteine von Komplexen kleiner als 220 kDa detektiert.

Die angewendeten Methoden zeigen, dass die durchgeführte Trennung der Mitochondrien in lösliche und Membranfraktion zu guten Ergebnissen führt.

Im Anschluss an die für lösliche und Membranproteine abgewandelte BN-PAGE sollte die Fähigkeit der Ferritine untersucht werden in Mitochondrien funktionelle Komplexe zu bilden. In Plastiden wurden bereits Ferritinkomplexe gezeigt (Abb. 2.5 und 2.8), so dass diese zum Vergleich mit möglichen mitochondrialen Ferritinkomplexen genutzt

werden konnten.



**Abb. 2.28: Komplexe der Ferritine in Mitochondrien und Chloroplasten.** In dieser Abbildung sind Expositionen von 5-13,5%igen BN-Gelen gezeigt. Eine entsprechende Coomassie gefärbte BN-PAGE ist in Abbildung 2.26 (B) zu sehen. Nach Einzelorganellimport der Ferritine mit angeschlossener Fraktionierung (Abb. 2.22) wurden die erhaltenen Fraktionen auf einem BN-Gel aufgetrennt. Die detektierten Komplexe von ca. 670 kDa sind mit einer Klammer markiert. Weitere Details siehe Abb. 2.26.

Die vier Ferritine werden nach *in organello* Import, Fraktionierung und BN-PAGE in die funktionellen Komplexe der Plastiden von ca. 670 kDa eingebaut und liegen in allen Kompartimenten der Chloroplasten vor (C, S, T; Abb. 2.28). Allerdings kann im BN-Gel keiner der im TGN-Gel gezeigten kleineren Komplexe detektiert werden (Abb. 2.5). Einerseits lässt sich dies durch das unterschiedliche Gelsystem erklären, andererseits könnte der Coomassie G250-Farbstoff einen negativen Einfluss auf die Stabilität der kleineren Komplexe im Gel haben. Ersteres hat vermutlich einen geringeren Einfluss, da bei Stromaproben der Ferritine (AtFer3 und AtFer4) auch im CN-Gel die kleineren Komplexe detektiert wurden (Daten nicht gezeigt). Daher beruht das Fehlen dieser kleineren Ferritinkomplexe im BN-Gel vermutlich auf der Anwesenheit des Farbstoffes. In den Mitochondrien sind für AtFer1 und AtFer3 ebenfalls Komplexe bei 670 kDa zu beobachten (Abb. 2.28). Beide Ferritine weisen in allen Mitochondrienfraktionen Signale auf, welche vergleichbar zu den plastidären Ferritinkomplexen sind. AtFer1 und AtFer3 können in beiden Pflanzenorganellen Ferritinkomplexe bilden, welche daher vermutlich voll funktionsfähig sind. Die Ferritine AtFer2 und AtFer4 zeigen dagegen ausschließlich in Plastiden die 670 kDa Komplexe. Bei AtFer2 wird in der löslichen Fraktion eine Bande detektiert, allerdings liegt diese nicht in der Mitochondrienprobe vor. Des Weiteren werden solche Signale auch in den löslichen Fraktionen von AtFer1 und AtFer3 detektiert, weshalb dieses Signal vermutlich eine unspezifische Bande darstellt (Abb. 2.28).

Die native Gelelektrophorese zeigte, dass zwei der vier Ferritine in beiden Organellen, Mitochondrien und Chloroplasten, zu den beschriebenen Ferritinkomplexen von 670 kDa assemblieren können. Diese sind wahrscheinlich auch funktionell aktiv und können als Eisenspeicherproteine dieser Organellen dienen. AtFer2 und AtFer4 zeigen dagegen nur in Plastiden diese Komplexbanden und scheinen in Mitochondrien nicht befähigt zu sein, zu diesen zu assemblieren. Dies deutet darauf hin, dass auch bei einem Transport der Ferritine ins Organell, es nicht automatisch bzw. spontan zur Bildung der Ferritinkomplexe kommt.

## 2.5 Bestätigung des Organellimports der Ferritine

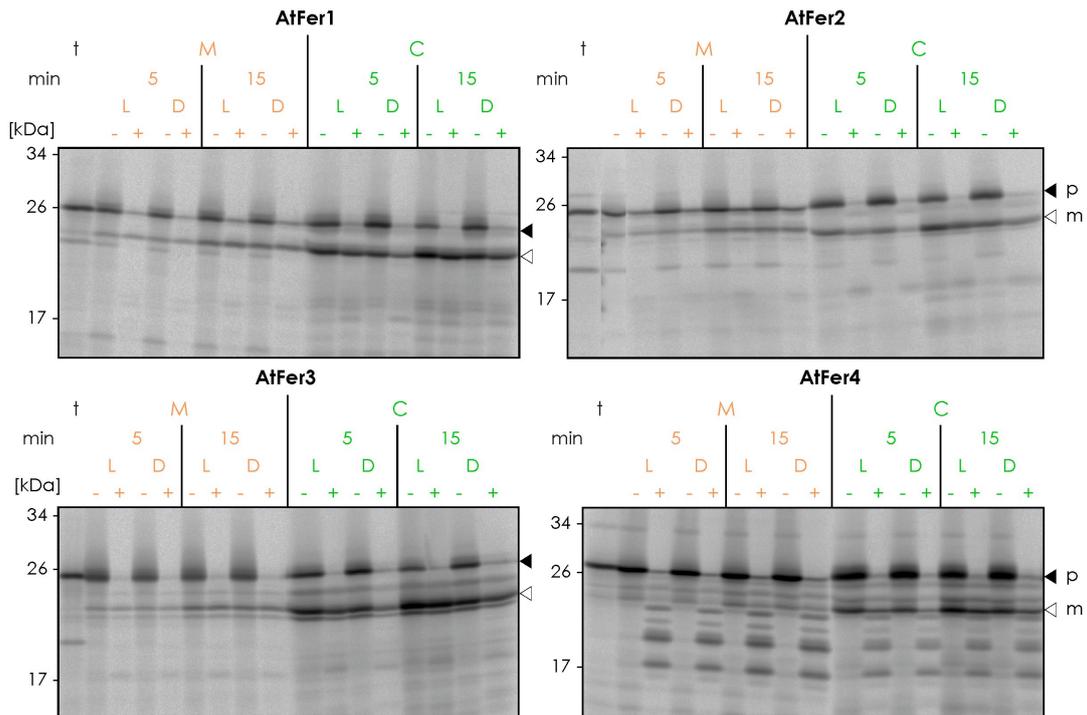
### 2.5.1 *In vitro* Analyse des Organellimports

Die bisherigen Ergebnisse weisen auf eine duale Lokalisierung der *Arabidopsis* Ferritine in Mitochondrien und Chloroplasten hin. In diesem Abschnitt soll untersucht werden, ob tatsächlich ein aktiver Transport in beide Organellen vorliegt. Dazu wurden Unterschiede der Transportmechanismen der Mitochondrien und Chloroplasten genutzt. So benötigt der Chloroplast für den Import Energie in Form von ATP, welches durch die lichtabhängige Photosynthese gewonnen wird. Währenddessen sind Mitochondrien auf den elektrochemischen Gradienten über der inneren Mitochondrienmembran angewiesen.

#### 2.5.1.1 Vergleich des Imports mit und ohne Lichtquelle

Zunächst sollten die *in organello* Importexperimente in An- und Abwesenheit einer Lichtquelle durchgeführt werden. Dabei wird die Abhängigkeit des plastidären Proteinimports von ATP ausgenutzt. Der Chloroplastenimport sollte im Dunkeln aufgrund der geringeren ATP-Synthese beeinträchtigt sein. Dahingegen sollte der Transport der Ferritine in die Mitochondrien bei beiden Lichtverhältnissen keine Unterschiede aufweisen.

In Abbildung 2.29 ist für alle Ferritine sichtbar, dass im Dunkeln sowohl nach 5 min als auch nach 15 min Import weniger reifes Protein in den Chloroplasten vorliegt als beim Import im Licht. Zusätzlich zur Verringerung der reifen Proteine kommt es zur Akkumulation der Vorstufenproteine an den dunkelinkubierten Plastiden. Vergleicht man die Mitochondrienproben aus dem Licht- bzw. Dunkelansatz miteinander, so sind keine Unterschiede der Signalintensitäten der Vorläuferproteine und der reifen Ferritine zu erkennen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Ferritinsignale in den Mitochondrienproben auf einen tatsächlichen Mitochondrienimport der Proteine zurückzuführen sind.

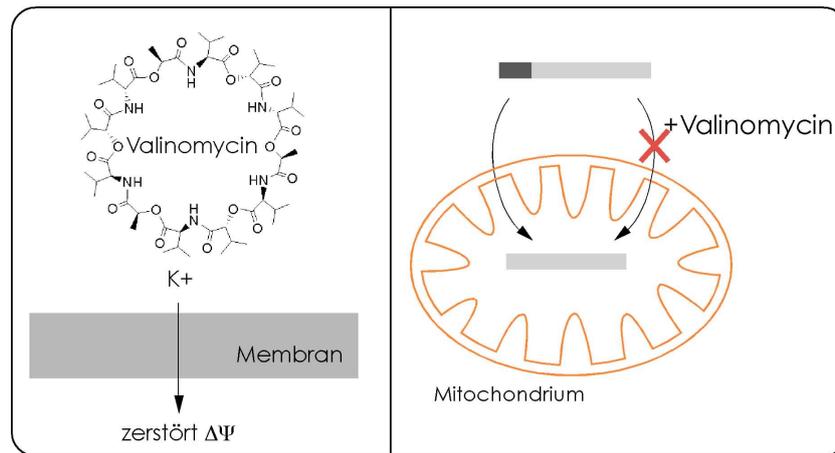


**Abb. 2.29: Organelltransport der Ferritine in Abhängigkeit einer Lichtquelle.** Die Abbildung zeigt Expositionen von 10-15 %igen SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli (1970)). Die Einzelorganellimporte wurden 5 bzw. 15 min inkubiert. Zu jedem Zeitpunkt wurde die Inkubation sowohl im Licht (L) als auch im Dunkeln (D) durchgeführt. Weitere Details siehe Abb. 2.13.

### 2.5.1.2 Inhibition des Imports mit Valinomycin

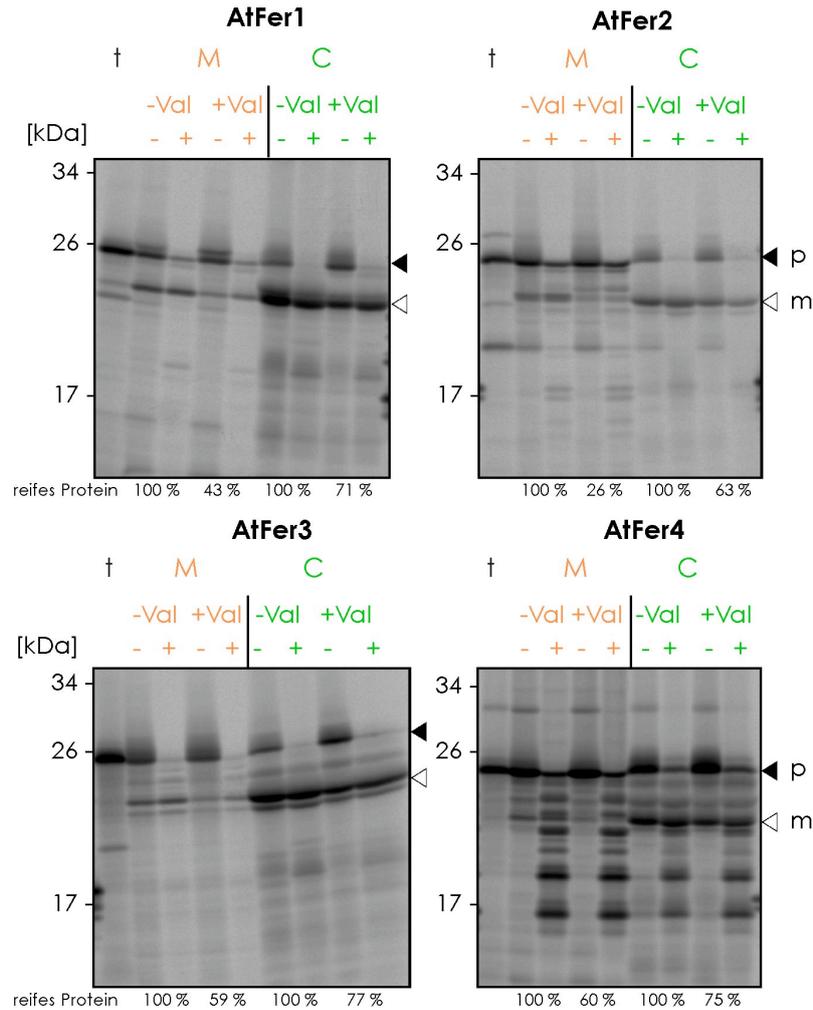
Zur weiteren Analyse eines Mitochondrientransportes der Ferritine, wurden Importexperimente mit beiden Organellen in Anwesenheit von Valinomycin durchgeführt. Valinomycin ist ein Ionophor und zerstört den für den Mitochondrienimport benötigten elektrochemischen Gradienten (Abb. 2.30). Da dieser als Energiequelle dient, sollte ein Transport in die Mitochondrien in Anwesenheit von Valinomycin gehemmt werden. Dieses Ionophor wurde für den Nachweis eines Mitochondrienimportes von Vorstufenproteinen mehrfach eingesetzt (Geissler et al. (2001), Dessi et al. (2003)). Auf den Plastidenimport sollte Valinomycin dagegen keinen Einfluss haben, da dieser ATP als Energiequelle benötigt. Somit sollte eine Unterscheidung des Mitochondrien- vom Plastidenimport der Ferritine möglich sein.

Die Importe in Abbildung 2.31 zeigen keine eindeutigen Ergebnisse bezüglich der Verwendung von Valinomycin. Es ist zwar für alle Ferritine eine Inhibierung des Mitochondrienimports zu erkennen, allerdings tritt diese auch in geringeren Maße beim Import in Chloroplasten auf. Allem Anschein nach kann Valinomycin nicht nur den Mitochondrienimport hemmen, sondern auch den Chloroplastentransport beeinflussen. Ein direkter Vergleich der Inhibierungsexperimente bei Mitochondrien und Chloroplasten zeigt, dass Valinomycin den Mitochondrientransport stärker hemmt.



**Abb. 2.30: Schematische Darstellung von Valinomycin und dessen Wirkung auf den Proteinimport in Mitochondrien.** Valinomycin ist ein Ionophor, welches Kaliumionen über Membranen transportiert und dadurch einen an der Membran vorhandenen elektrochemischen Gradienten ( $\Delta\Psi$ ) zerstört (A). Dieser Gradient wird für den Proteinimport in die Mitochondrien benötigt. Valinomycinzugabe inhibiert daher den Transport von Vorläuferproteinen in die Mitochondrien (B).

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass mittels Valinomycin der Transport der *Arabidopsis* Ferritine in beide Organellen nicht eindeutig zu unterscheiden ist. Des Weiteren konnte in den zuvor gezeigten *Western*- und 2D-Analysen (Abb. 2.11, 2.12, 2.23, 2.24, und 2.27) dokumentiert werden, dass sehr reine Organellen präpariert wurden. Daher scheint es ausgeschlossen, dass die Inhibierung des Plastidenimports auf eine Kontamination mit Mitochondrien in diesen Importansätzen zurückzuführen ist. Da Valinomycin den Mitochondrienimport stärker hemmt als den Chloroplastentransport, liegt wahrscheinlich tatsächlich ein Mitochondrienimport der Ferritine vor.

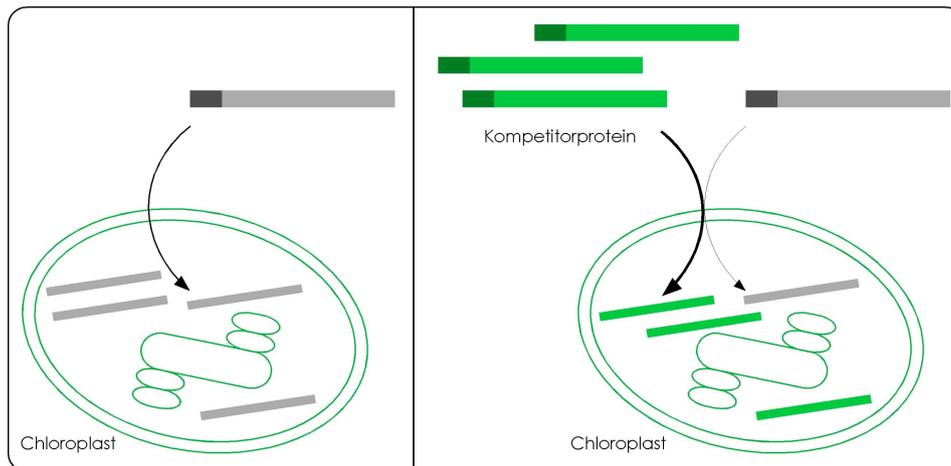


**Abb. 2.31: Einzelorganellimport der Ferritine in Anwesenheit von Valinomycin.** Die dargestellten Expositionen von 10-15 %igen SDS-Gelen (Laemmli (1970)) zeigen die Importergebnisse der Ferritine in Anwesenheit (+Val) und Abwesenheit (-Val) von  $1 \mu\text{M}$  Valinomycin. Die Ansätze ohne Valinomycin (-Val) wurden zur Kontrolle mit der entsprechenden Menge des Lösungsmittels (Ethanol) versetzt. Die Banden der reifen Proteine (Spur: M- & C-) wurden mit dem Programm ImageJ 1.37v quantifiziert und die Organellimporte ohne Valinomycin als 100 % gesetzt. Insgesamt wurden zwei (AtFer1, AtFer3, AtFer4) bzw. drei (AtFer2) unabhängige Importexperimente ausgewertet. Weitere Details siehe Abbildung 2.13.

### 2.5.1.3 Konkurrenzexperimente des Organellimports der Ferritine

Die bisherigen *in vitro* Experimente zum Nachweis des Proteintransports der Ferritine in die Organellen lieferten keine eindeutigen Ergebnisse. Daher wurden im Folgenden Konkurrenzexperimente mit dem plastidären 33 kDa Protein durchgeführt. Das 33 kDa Protein wird ausschließlich in die Chloroplasten importiert und in überexprimierter Form dem Standardimportansatz zugesetzt. Für eine entsprechende Mitochondrienkompetition standen keine Mitochondrienproteine zur Verfügung.

In Abbildung 2.32 ist schematisch ein Standardplastidenimport (A) und ein Konkurrenzansatz (B) dargestellt. Wird das zu untersuchende Protein und der Kompetitor in

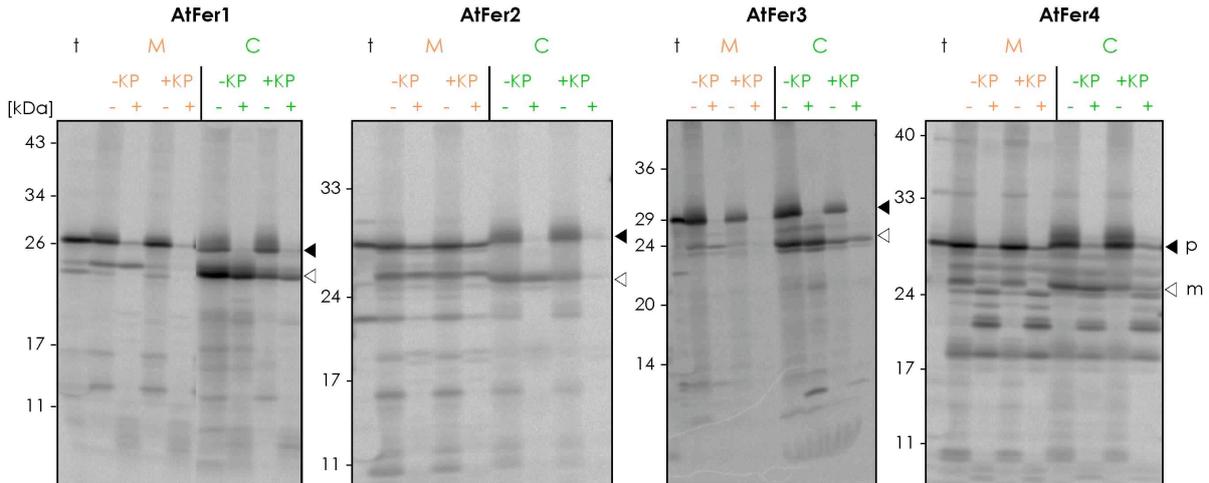


**Abb. 2.32: Schematische Darstellung eines Konkurrenzexperiments.** In (A) ist ein Standardimport in den Chloroplasten (Einzelorganellimport siehe Abb. 2.13) und in (B) der entsprechende Import in Anwesenheit des plastidären Kompetitorproteins (KP) gezeigt. Grau ist das zu untersuchende radioaktiv markierte Vorläuferprotein und in grün das im Überschuss zugegebene Kompetitorprotein dargestellt.

dasselbe Organell (hier der Plastid) transportiert, so konkurrieren beide um die Translokase. Der im Überschuss vorliegende Kompetitor wird verstärkt importiert, so dass das radioaktiv markierte Protein in geringerem Umfang transportiert wird und dessen Signal abnimmt.

Ebenso wie die Inhibitionsexperimente mit Valinomycin führt die Konkurrenz mit dem 33 kDa Protein nicht immer zu eindeutigen Ergebnissen. Wie erwartet wird der Plastidenimport der vier Ferritine durch die Anwesenheit des Kompetitorproteins verringert (Abb. 2.33). AtFer2 zeigt eine eindeutige Konkurrenz des Plastiden-, nicht aber des Mitochondrienimports. Dies bestätigt einen Mitochondrienimport für dieses Protein. Unerwarteterweise wird bei AtFer1 und AtFer3 auch der Mitochondrienimport kompetiert. Aufgrund der gezeigten Reinheit der Organellpräparation kann eine Kontamination der Mitochondrien mit Chloroplasten ausgeschlossen werden. Die Beeinträchtigung des Mitochondrienimports von AtFer1 und AtFer3 sollte also direkt auf der Anwesenheit des Kompetitorproteins beruhen. Folglich sind diese Ergebnisse nicht einfach zu deuten. Bei AtFer4 ist aufgrund des komplexen Bandenmusters in den Mitochondrien eine Auswertung eher schwierig. Es kann daher nur der Plastidenimport betrachtet werden, welcher sichtbar durch das Kompetitorprotein verringert wird. Die Konkurrenzversuche zeigen, dass AtFer2 in beide Organellen transportiert wird. Für AtFer1, AtFer3 und AtFer4 kann dagegen nur der Transport in die Plastiden nachgewiesen werden.

Die durchgeführten *in vitro* Versuche zur Klärung der Organelllokalisierung (Abb. 2.29, 2.31 und 2.33) zeigen, dass alle vier Ferritine in die Chloroplasten importiert werden. Bezüglich der Mitochondrien gibt es Hinweise auf einen Transport der Ferritine in diese Organellen (Abb. 2.29 und 2.31). Betrachtet man nur den Transport der Ferritine in eines



**Abb. 2.33: Konkurrenz des Organellimports der Ferritine.** Es sind Expositionen von 10-15 %igen SDS-Gele (Laemmli (1970)) dargestellt. Der Import in die Organellen erfolgte in Anwesenheit (+KP) und Abwesenheit (-KP) des Kompetitorproteins. Als Kompetitor wurde das überexprimierte 33 kDa Protein des Wasserspaltungsapparates ( $1 \mu\text{M}$ ) eingesetzt. Die Kontrolle (-KP) enthielt die entsprechende Menge Harnstoff.

der beiden Organellen, so scheinen eindeutige Ergebnisse vorzuliegen (z.B. Inhibierung des Mitochondrienimports durch Valinomycin). Andererseits muss auch der Transport in das jeweils andere Organell in die Betrachtung mit einbezogen werden. In diesem Fall wird z.B. auch der Plastidenimport durch Valinomycin inhibiert (Abb. 2.31). Daher ist es schwierig beide Organellimporte der Ferritine zu unterscheiden. Zusammenfassend lassen die Experimente dieses Abschnitts zusammen mit dem gemischten Importansatz (Abb. 2.16), sowie den *Western*- und Gelelektrophoreseuntersuchungen zur Reinheit der Organellen den Schluß zu, dass die *Arabidopsis* Ferritine *dual targeting in vitro* zeigen.

## 2.5.2 *In vivo* Lokalisierung der *Arabidopsis* Ferritine

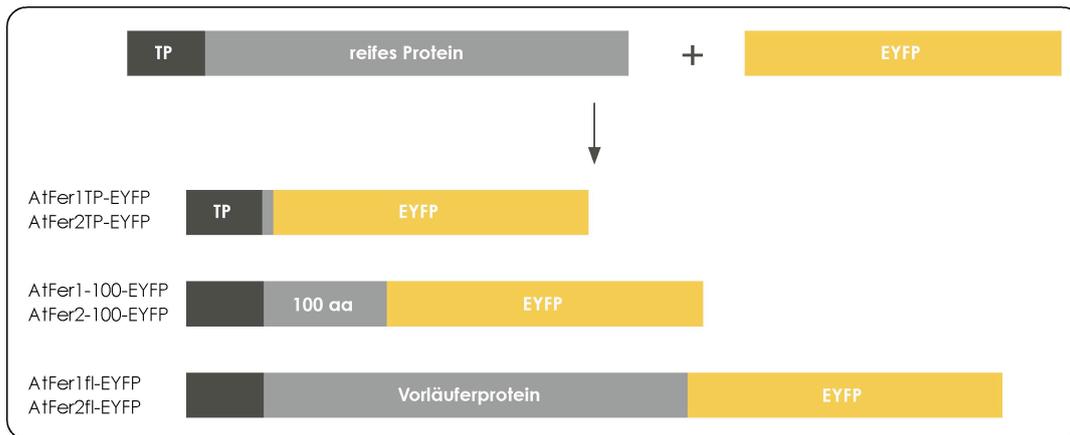
### 2.5.2.1 Die Reporterproteininfusionen von AtFer1 und AtFer2

In Abschnitt 2.5.1 wurde der Mitochondrien- und Plastidenimport der Ferritine *in vitro* analysiert. Des Weiteren sollte der Transport der *Arabidopsis* Ferritine im Blattgewebe untersucht werden. Für die *in vivo* Analyse wurden zwei Ferritine ausgesucht: AtFer1 und AtFer2. AtFer1 wurde aufgrund der Komplexbildung in beiden Organellen und des Mitochondrienimportes mit guter Effizienz ausgewählt (Abb. 2.13 und 2.28). Das zweite Ferritin (AtFer2) zeigt dagegen als einziges keine Konkurrenz des Mitochondrienimports mit plastidärem Kompetitorprotein (Abb. 2.33). Daher ist AtFer2 ein guter Kandidat für einen Mitochondrienimport *in vivo*. AtFer3 und AtFer4 werden im *in organello* Import eher schwach in die Mitochondrien transportiert und wurden deshalb nicht zusätzlich *in vivo* untersucht (Abb. 2.13).

<b>AtFer1</b>					
<b>MASNALSSFT</b>	<b>AANPALSPKP</b>	<b>LLPHGSASPS</b>	<b>VSLGFSRKVG</b>	<b>GGRAVVVAAA</b>	50
<b>TVDTNNMPMT</b>	GVVFQPFEEV	KKADLAIPIT	SHASLARQRF	ADASEAVINE	100
QINVEYNVSY	VYHSMYAYFD	RDNVAMKGLA	KFFKESSEEE	RGHAEKFMAY	150
QNQRGGRVKL	HPIVSPISEF	EHAEKGDALY	AMELALSLEK	LTNEKLLNVH	200
KVASENNDPQ	LADFVESEFL	GEQIEAIKKI	SDYITQLRMI	GKGHGVVHFD	250
QMLLN					
TP-Fusion: <b>1-60</b> (TP +13 AS; TP: 1-47)					
100 AS-Fusion: <b>1-100</b>					
fl-Fusion: <b>1-255</b>					
<b>AtFer2</b>					
<b>MLHKASPALS</b>	<b>LLSSGYTGGG</b>	<b>NLFPPSRNSS</b>	<b>NLLFSPSGSR</b>	<b>FSVQAAKGTN</b>	50
<b>TKSLTGVVFE</b>	PFEEVKKEME	LVPTTPFVSL	ARHKFSDDSE	SAINDQINVE	100
YNVSYVYHAL	YAYFDRDNG	LKGFAKFFND	SSLEERGHAE	MFMEYQNKRG	150
GRVKLQSIILM	PVSEFDHEEK	GDALHAMELA	LSLEKLTNEK	LLKLQSVGVK	200
NNDVQLVDFV	ESEFLGEQVE	AIKKISEYVA	QLRRIGKGGH	VWHFDQMLLN	250
DEV					
TP-Fusion: <b>1-59</b> (TP +15 AS; TP: 1-44)					
100 AS-Fusion: <b>1-100</b>					
fl-Fusion: <b>1-253</b>					

**Abb. 2.34: Aminosäuresequenz von AtFer1 und AtFer2.** Die für die Transitpeptidfusionen verwendeten Aminosäuren sind rot gekennzeichnet. Zu den eigentlichen Transitpeptiden (**TP**) wurden 13 bzw. 15 Aminosäuren des reifen Proteins zugefügt. Des Weiteren wurden Fusionen der ersten **100 Aminosäuren** (1-100) und der gesamten Proteinsequenz (**fl-full length**) von AtFer1 und AtFer2 mit einem Reporterprotein erstellt.

Zunächst wurden verschiedene Reporterproteinfusionen von AtFer1 und AtFer2 erstellt. Dazu wurden jeweils drei Bereiche der Proteine verwendet das Transitpeptid, die ersten 100 Aminosäuren und das gesamte Vorläuferprotein. Die Transitpeptidfusionen enthielten zusätzlich 13 bzw. 15 Aminosäurereste der reifen Proteinanteile um eventuell im reifen Teil liegende Erkennungsstellen für die Importrezeptoren bzw. Prozessierungspeptidasen nicht zu zerstören (Abb. 2.34 und 2.35). Die Fusion mit den ersten 100 Aminosäuren stellt eine Zwischenform der Transportsignal- und der Volllänge fusion dar. Auch hier werden reife Proteinanteile von AtFer1 und AtFer2 mit dem Reporterprotein fusioniert. Damit sind weitere Einflüsse der reifen Proteinanteile auf den Transport abgedeckt. Die Transportsignale kerncodierter Plastiden- bzw. Mitochondrienproteine variieren in ihrer Länge und sind durchschnittlich 40 Aminosäuren (mitochondrielle Transportsignale) bzw. 50 Aminosäuren (plastidäre Transportsignale) lang (von Heijne et al. (1989), Glaser et al. (1998)). Diese Fusion ermöglicht daher den Vergleich sehr unterschiedlicher Proteine bezüglich ihres Organelltransports. Für die dritte Fusion wurde das gesamte Vorstufenprotein (Volllänge-*full length* [fl]) mit dem Reporterprotein fusioniert (Abb. 2.34 und 2.35).



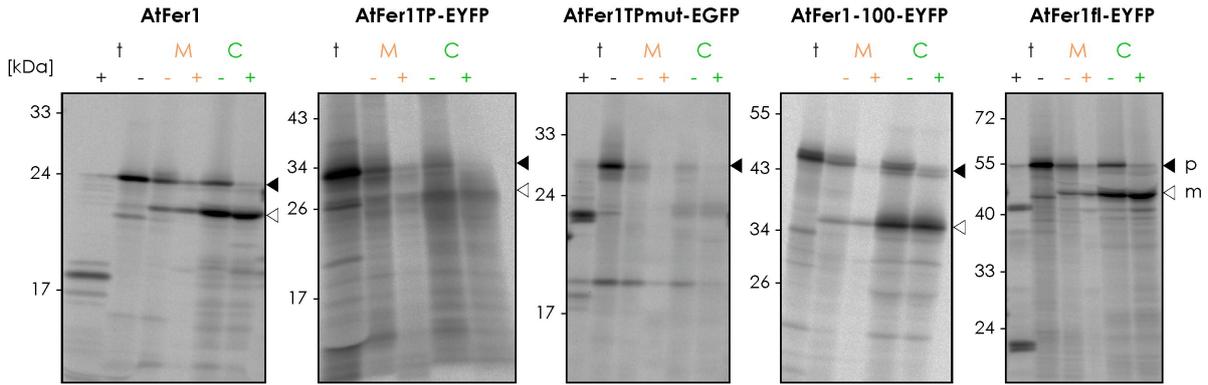
**Abb. 2.35: Darstellung der Reporterproteinfusionen von AtFer1 und AtFer2.** Die in Abbildung 2.34 dargestellten Sequenzabschnitte von AtFer1 und AtFer2 wurden C-terminal mit EYFP zu den gezeigten chimären Proteinen fusioniert. Eine zufällig generierte Variante der Transitpeptidfusion von AtFer1 wurde als EGFP-Fusion erstellt. Diese besitzt an Position 8 eine Punktmutation, welche einen Austausch von Serin zu Prolin darstellt (AtFer1TPmut-EGFP).

Als Reporterprotein wurde EYFP eingesetzt, so dass die in Abbildung 2.35 illustrierten Ferritininfusionen generiert wurden. Zusätzlich zur AtFer1TP-EYFP-Fusion wurde auch eine zufällig entstandene Punktmutation gebildet. Dabei handelt es sich um einen Aminosäureaustausch von Serin zu Prolin an Position 8. Diese als AtFer1TPmut bezeichnete Version wurde als einzige mit EGFP zu AtFer1TPmut-EGFP verknüpft.

### 2.5.2.2 Lokalisierung der Reporterproteinfusionen von AtFer1 *in vitro* und *in vivo*

Vor der *in vivo* Expression der Ferritininfusionsproteine wurden die erstellten Konstrukte im *in organello* Importexperiment auf ihre Transportkompetenz getestet. Diese Versuche sind notwendig, um bereits im Importexperiment Effekte des Reporterproteins auf den Transport untersuchen zu können. Die erstellten Fusionsproteine wurden in zwei Vektoren kloniert. Zur *in vitro* Analyse wurde der pBAT-Vektor (Annweiler et al. (1991)) und zur *in vivo* Analyse ein geeigneter Pflanzenexpressionsvektor verwendet (pRT- $\Omega$ /Not/Asc [pRT100-Variante], Töpfer et al. (1987), Überlacker et al. (1996)).

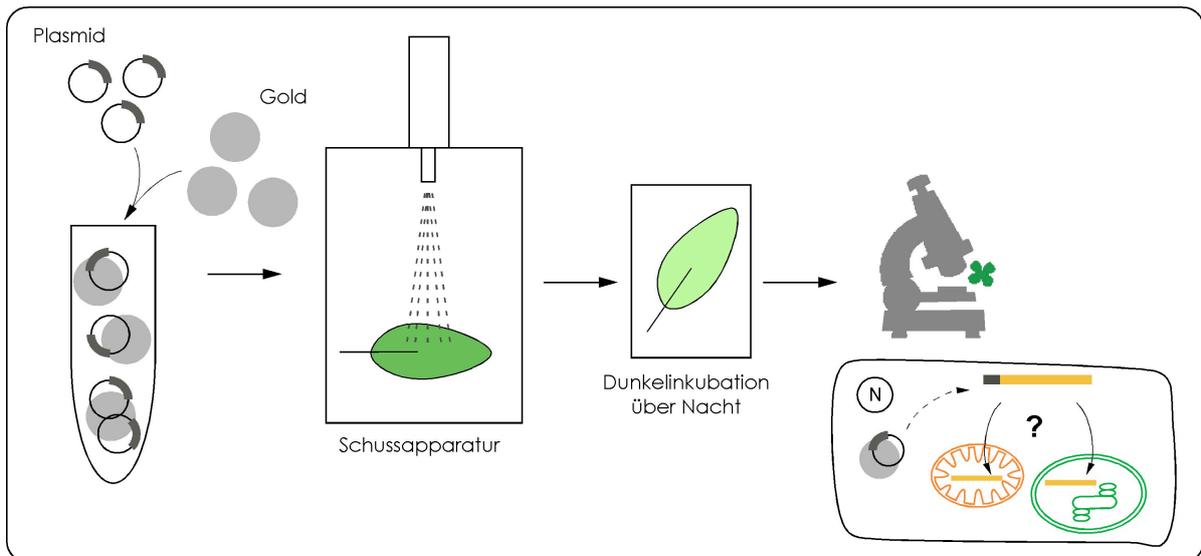
Der *in organello* Import des authentischen AtFer1 und der erstellten Fusionen ist in Abbildung 2.36 dargestellt. Das authentische AtFer1 wird in beide Organellen importiert. Die Transitpeptidfusion (AtFer1TP-EYFP) zeigt ebenfalls einen Transport in Mitochondrien und Chloroplasten. Innerhalb der Organellen wird AtFer1TP-EYFP zum reifen Protein prozessiert. Auf ähnlicher Höhe ist bereits in der Translationsspur eine Bande zu erkennen. Diese stellt wahrscheinlich EYFP dar und ist etwas kleiner als das prozessierte Fusionsprotein (Abb. 2.36, weißer Pfeil). Die Variante mit der Punktmutation (AtFer1TPmut-EGFP) wird dagegen nicht in die Organellen importiert, betrachtet man dieses Protein genauer, so ist es deutlich kleiner als AtFer1TP-EYFP.



**Abb. 2.36: *In organello* Import der AtFer1-Fusionsproteine.** Dargestellt sind Expositionen von 10-15%igen SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli (1970)). Die erstellten Fusionen wurden zusammen mit dem authentischen AtFer1 in einem *in organello* Importexperiment eingesetzt. Zum Teil wurden die Vorläuferproteine zusätzlich einer Thermolysinbehandlung (t+) unterzogen. Für weitere Details siehe Abbildung 2.13 und 2.14.

Es ist daher möglich, dass aufgrund der Punktmutation bei der *in vitro* Transkription bzw. Translation erst an einem späteren Startcodon bzw. AUG die Ablesung erfolgte. Mögliche alternative Startcodons (AUG, Methionreste) sind an Position 57 und 59 des Transportsignals vorhanden (Abb. 2.34). Des Weiteren könnte das entsprechende Start-AUG des EGFP genutzt werden. Demzufolge stellt das *in vitro* Translationsprodukt wahrscheinlich EGFP ohne das Transportsignal dar. Dennoch wurde diese Fusion auch zur *in vivo* Lokalisierung eingesetzt. Die beiden letzten Reporterfusionen, AtFer1-100-EYFP und AtFer1fl-EYFP, zeigen dasselbe Importverhalten wie das authentische AtFer1, den Transport in Mitochondrien und Chloroplasten. Es zeigt sich, dass sich das *in vitro* Importverhalten der Reporterfusionen im Vergleich zum authentischen AtFer1 nicht verändert. Daher hat das Reporterprotein *in vitro* keinen Einfluss.

Um das *in vivo targeting* der Ferritine (AtFer1, AtFer2) zu untersuchen wurden diese mittels biolistischer Transformation transient in Erbsenblättern exprimiert. Dafür wurden zunächst die Plasmide der Fusionsproteine (im Pflanzenexpressionsvektor vorliegend) an Goldpartikel gebunden (Präzipitationsschritt). Diese Plasmid-beladenen Goldpartikel wurden nun auf einen Träger gegeben und in die Schussapparatur eingesetzt (Abb. 2.37). Danach erfolgte die Positionierung der zu transformierenden Blätter, auf einer Agaroseplatte liegend, in der Schussapparatur. Der eigentliche Schiessvorgang der Blätter mit den präparierten Goldpartikeln wurde im Vakuum durchgeführt. Mittels Heliumdruckes wurden die Partikel beschleunigt. Im Anschluss daran erfolgte die Dunkelinkubation über Nacht (Abb. 2.37). Die transformierten Blätter wurden am Folgetag fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Zunächst wurde die erfolgreiche Expression der Fusionsproteine getestet. Dazu wurde das Blattgewebe mittels Epifluoreszenzmikroskopie untersucht. Die hier gezeigten mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Laser-Mikroskop (CLSM-*confocal laser scanning microscope*) erstellt.

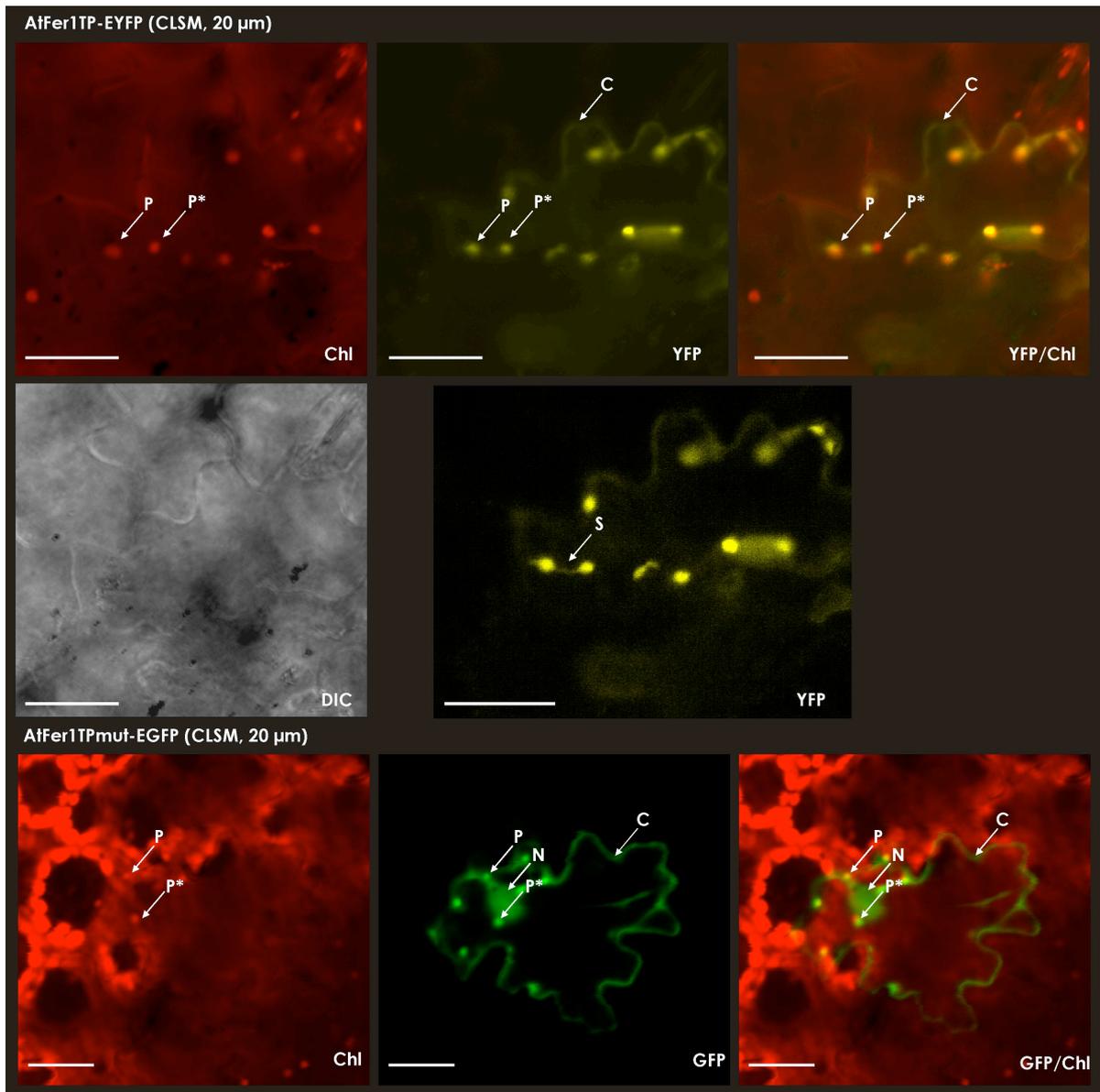


**Abb. 2.37: Schema der biolistischen Transformation von Blattgewebe.** Die entsprechende Nukleotidsequenz der Proteinfusionen, vorliegend in einem geeigneten Pflanzenexpressionsvektor (pRT- $\Omega$ /Not/Asc [pRT100-Variante], Töpfer et al. (1987), Überlacker et al. (1996)), wird im ersten Schritt an Goldpartikel gebunden, welche auf einen Träger aufgebracht und in die Schussapparatur (*particle gun*) eingesetzt werden. Im Vakuum werden die Goldpartikel mittels Heliumdrucks in das positionierte Blattgewebe geschossen. Die so transformierten Blätter werden über Nacht im Dunkeln inkubiert und am Folgetag fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Die schematisch dargestellte Pflanzenzelle zeigt die Fragestellung zur Lokalisierung der Ferritinreporterproteine in lebenden Zellen.

### AtFer1TP-EYFP

In Abbildung 2.38 ist die einzige mit AtFer1TP-EYFP beobachtete transformierte Zelle dargestellt. Diese Fusion wurde insgesamt viermal für eine biolistische Transformation eingesetzt, allerdings wurde nur diese eine transformierte Zelle tatsächlich beobachtet. Daher ist diese Fusion entweder für eine biolistische Transformation wenig geeignet oder die Expression selbst ist für die Zellen nicht verträglich. Die Daten bezüglich der Lokalisierung von AtFer1TP-EYFP sind somit nur bedingt aussagekräftig.

Das Fluoreszenzsignal markiert nach der Expression der Transportsignalfusion von AtFer1 folgende Bereiche der Zelle: die Plastiden (P) und das Cytosol (C). Das Transportsignal ist also in der Lage den Transport von EYFP in die Plastiden zu vermitteln. Die EYFP- und die Chlorophyllfluoreszenz wiesen eine Co-Lokalisierung auf, folglich handelt es sich um eine plastidäre Lokalisierung. Des Weiteren sind auch Stromuli zu beobachten (Abb. 2.38, S), deshalb kann auf eine Lokalisierung im Stroma der Plastiden geschlossen werden. Stromuli sind so genannte *stroma filled tubules (stromules)*, dies sind mit Stroma gefüllte Ausstülpungen der Plastiden (Arimura et al. (2001), Kwok & Hanson (2004), Gunning (2005)). Eine interessante Beobachtung sind sich bewegende Plastiden (P\*), diese Organellen haben sich zwischen der Aufnahme des YFP- und des Chlorophyllkanals bewegt. Deshalb co-lokalisieren die Fluoreszenzsignale nicht mehr und liegen in



**Abb. 2.38: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Epidermiszellen nach transienter Expression von AtFer1TP-EYFP bzw. AtFer1TPmut-EGFP.** Die biolistische Transformation von Erbsenblättern erfolgte wie in Abbildung 2.37 dargestellt. Es sind verschiedene Kanäle und deren Überlagerungen dargestellt: Durchlichtbild (**DIC**), Chlorophyllkanal (**Chl**), YFP-Kanal (**YFP**) und GFP-Kanal (**GFP**). Es wurden folgende Strukturen mit einem Pfeil markiert: Plastiden (**P**), sich bewegende Plastiden (**P\***), Cytosol (**C**), Stromuli (**S**) und der Kern (**N**). Die Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Laser-Mikroskop (CLSM) generiert. Der eingezeichnete Größenbalken entspricht  $20\ \mu\text{m}$ . Erklärungen siehe Text.

der Überlagerung (YFP/Chl) direkt nebeneinander. Dies zeigt, dass zum Zeitpunkt der Aufnahme lebendes Gewebe analysiert wurde.

Ein sehr ähnliches Fluoreszenzbild ist zu beobachten, wenn Erbsenblätter mit der Transitpeptidvariante mit der Punktmutation (AtFer1TPmut-EGFP) transformiert wurden. Zur beobachteten Lokalisierung in den Plastiden und im Cytosol (AtFer1TP-EYFP) ist zusätzlich eine Kernlokalisierung des GFP-Signals zu sehen (Abb. 2.38). Die Fluoreszenz-

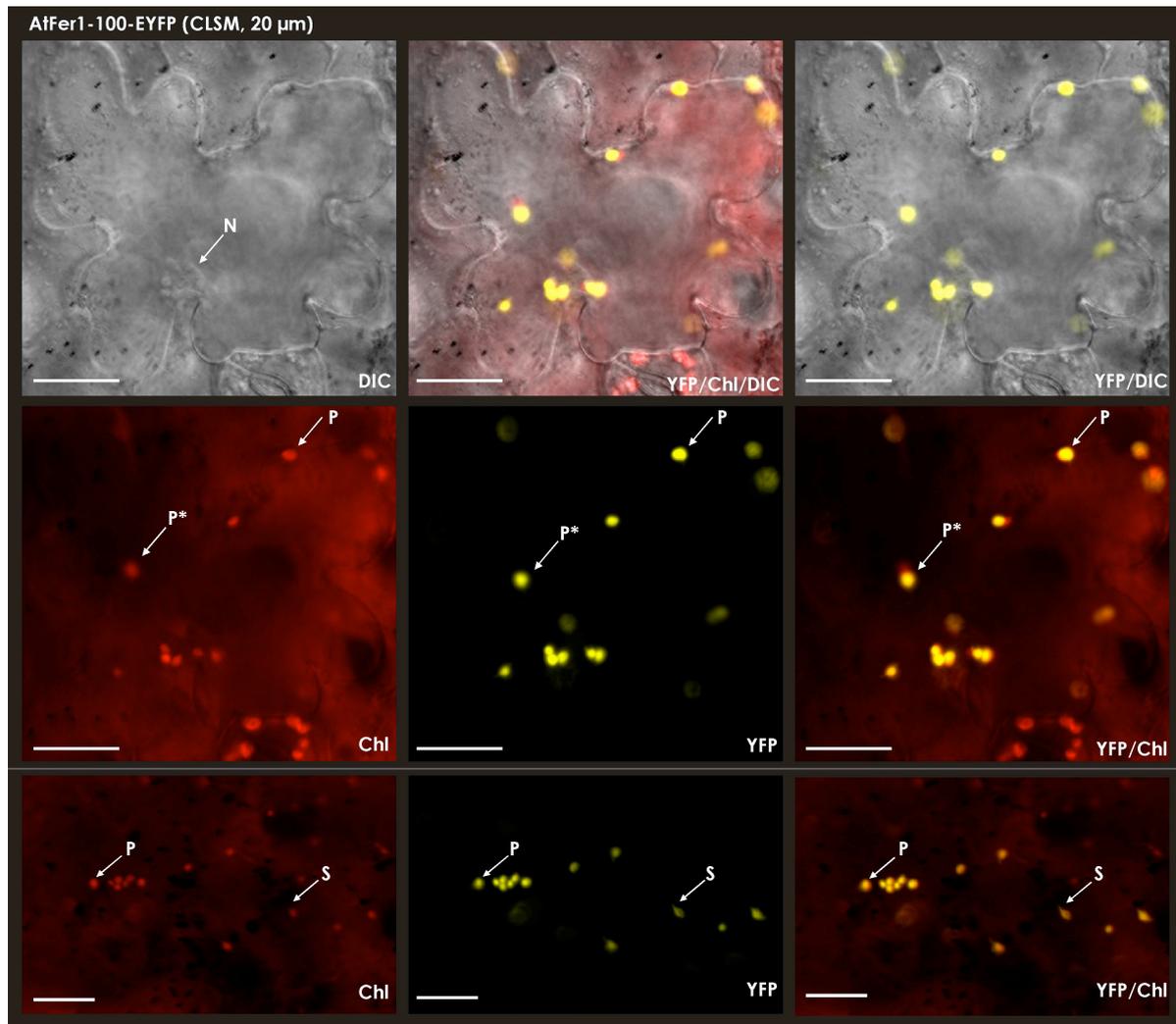
verteilung scheint eine Mischung aus EGFP ohne und mit Transitpeptid zu sein. Wird EGFP exprimiert, so ist dieses sowohl im Cytosol als auch im Kern zu beobachten (Haseloff & Amos (1995), Haseloff et al. (1997), Marques et al. (2004)). Da zusätzlich auch eine Anfärbung der Plastiden erfolgte, werden vermutlich zwei Varianten von AtFer1TPmut-EGFP in der Zelle synthetisiert: einmal das gesamte Fusionsprotein und einmal nur der EGFP-Part. Dies würde die beobachteten drei Lokalisierungen der EGFP-Fluoreszenz erklären. Es zeigt sich eine Übereinstimmung mit den *in vitro* Daten bei dem bereits vermutet wurde, dass nur EGFP synthetisiert wurde (Abb. 2.36). Insgesamt betrachtet ist sowohl die Transitpeptidfusion als auch deren Aminosäureaustauschvariante von AtFer1 in der Lage das Reporterprotein in die Plastiden zu dirigieren. Im Gegensatz zum *in vitro* Import von AtFer1 und AtFer1TP-EYFP wurden keine Fluoreszenzsignale in den Mitochondrien beobachtet.

### **AtFer1-100-EYFP**

Nach Transformation mit AtFer1-100-EYFP (Abb. 2.39) sind im YFP-Kanal punktförmige Signale zu sehen. Diese korrelieren mit den Signalen der Chlorophyllfluoreszenz. Es handelt sich daher um Plastiden (P). Erneut wurde ein sich bewegendes Plastid (P\*) in der YFP/Chl-Überlagerung gefunden, der darauf hinweist, dass die betrachtete transformierte Zelle vital ist. Ein weiterer Hinweis auf eine plastidäre, genauer eine stromale Lokalisierung ist die Beobachtung von Stromuli (S), welche u.a. in der zweiten Zelle (unterer Bildbereich) ausgebildet sind. Interessanterweise ist bei der transformierten Epidermiszelle (oberer Bildbereich) im Durchlichtmodus (DIC) der Zellkern (N) sichtbar, in dessen Nachbarschaft sich viele Plastiden befinden. Auch die EYFP-Fusion der ersten 100 Aminosäuren weist nur eine plastidäre nicht aber eine mitochondrielle Lokalisierung von AtFer1 *in vivo* auf.

### **AtFer1fl-EYFP**

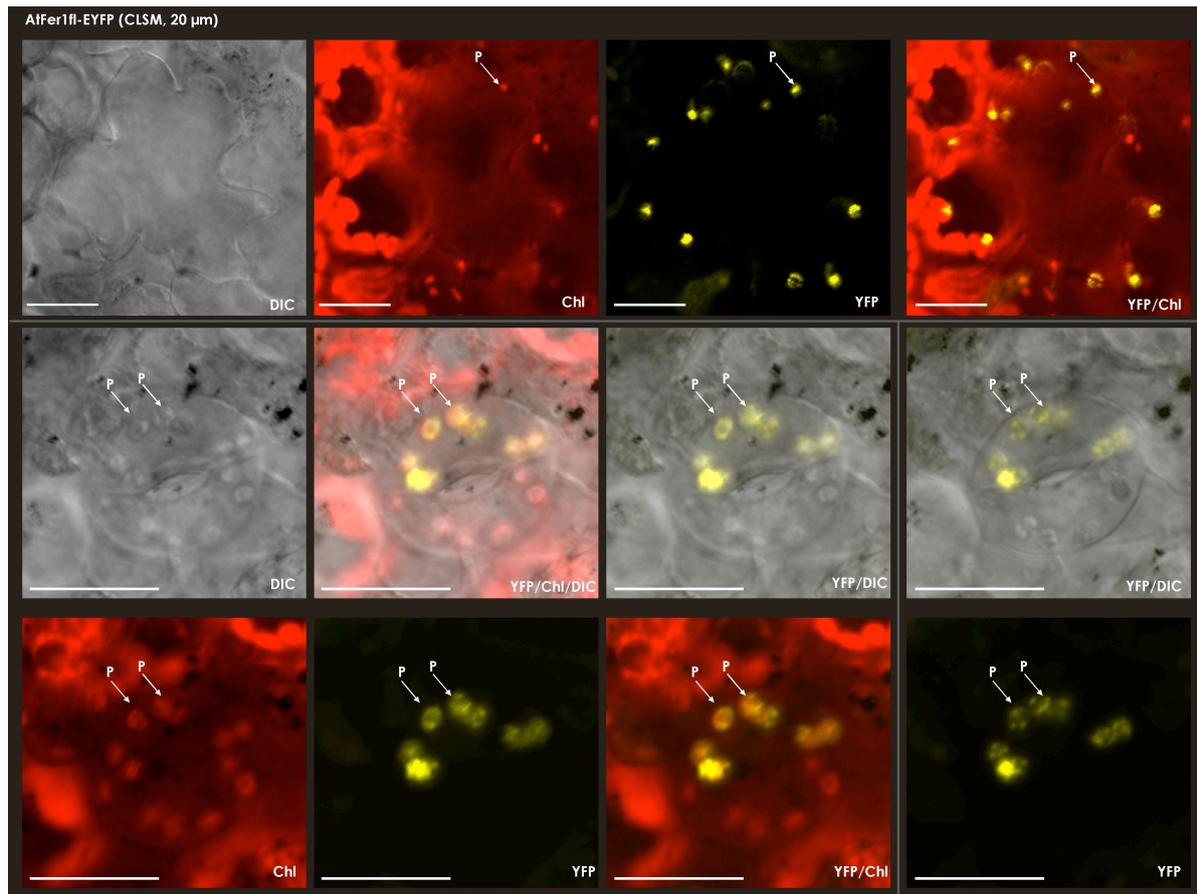
Die Volllängenfusion von AtFer1 (AtFer1fl-EYFP) zeigt zwei verschiedene Arten der Lokalisierung. In Abbildung 2.40 markiert das YFP-Signal die Plastiden (P) der Epidermiszelle (Zelle im oberen Bildbereich). Diese Fluoreszenz co-lokalisiert mit der Chlorophyllfluoreszenz, daher wird dieses Fusionsprotein *in vivo* in die Plastiden transportiert. Betrachtet man nun die transformierte Schliesszelle (unterer Bildbereich) so sind bereits im Durchlichtmodus (DIC) die Plastiden erkennbar. Das YFP-Signal lokalisiert mit diesen Plastiden und der Chlorophyllfluoreszenz. Innerhalb der Plastiden der Stomata ist die YFP-Fluoreszenz nicht homogen verteilt, sondern es kommt zu einer Art innerer Strukturierung. Diese Strukturierung oder Akkumulation von EYFP könnte auf einer Bindung des AtFer1 an thylakoidähnliche oder vesikuläre Strukturen resultieren, da im *in vitro* Import von AtFer1 eine Assoziation mit der Thylakoidmembran zu beobachten



**Abb. 2.39: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Epidermiszellen nach transienter Expression von AtFer1-100-EYFP.** Es wurden verschiedene Kanäle und deren Überlagerungen verwendet: Durchlichtbild (DIC), Chlorophyllkanal (Chl) und YFP-Kanal (YFP). Mit einem Pfeil wurden folgende Zellstrukturen markiert: Plastiden (P), sich bewegende Plastiden (P\*), Stromuli (S) und Kern (N). Es sind zwei transformierte Epidermiszellen gezeigt (oberer bzw. unterer Bildbereich). Für weitere Details siehe Abbildung 2.38.

war (Abb. 2.3).

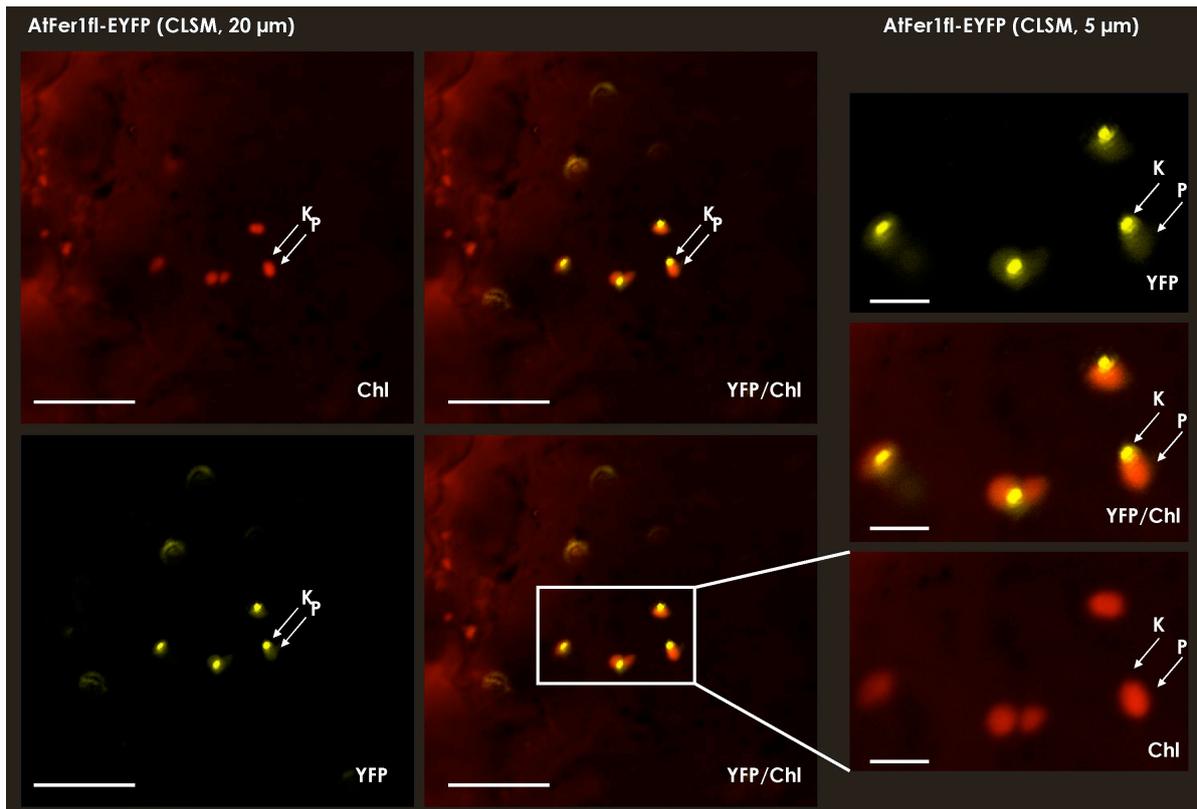
Die zweite Lokalisierungsart des AtFer1fl-EYFP ist ebenfalls in den Plastiden (Abb. 2.41, P), allerdings befindet sich nur eine geringe Menge des YFP-Signals in diesen. Der überwiegende Teil ist in stark fluoreszierenden punktförmigen Strukturen zu detektieren (K). In der Vergrößerung wird deutlich, dass es eine schwache Färbung der Plastiden gibt und das die leuchtenden Strukturen nur in unmittelbarer Nähe zu bzw. an den Plastiden vorkommen. Abschließend kann nicht geklärt um welche Strukturen es sich handelt. Diese wurden innerhalb der Arbeitsgruppe mit Vollängenfusionen anderer Proteine ebenfalls beobachtet. Es könnte sich um ein Größenproblem der Fusionsproteine handeln, so das bei der Expression verstärkt Aggregate gebildet werden bzw. diese erst kurz vor dem



**Abb. 2.40: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Epidermiszellen nach transienter Expression von AtFer1fl-EYFP.** Es wurden folgende Kanäle und deren Überlagerungen verwendet: Durchlichtbild (**DIC**), Chlorophyllkanal (**Chl**) und YFP-Kanal (**YFP**). Plastiden (**P**) wurden mit einem Pfeil markiert. Im oberen Bildbereich ist eine transformierte Epidermiszelle und im unteren Bildbereich ist eine transformierte Schliesszelle zu sehen. Für weitere Details siehe Abbildung 2.38.

Import direkt am Plastiden auftreten. Die verbliebenen bzw. später synthetisierten Fusionsproteine würden nun am Plastiden miteinander aggregieren. Dies könnte bei einem Ferritin, welches natürlicherweise Proteinkomplexe mit anderen Ferritinmolekülen eingeht verstärkend hinzukommen. Trotz der zwei Arten der Lokalisierung ist klar, dass es sich in beiden Fällen um eine Lokalisierung in bzw. an den Plastiden handelt. Auch mit der Vollängenfusion von AtFer1 konnten keine Fluoreszenzsignale in den Mitochondrien beobachtet werden.

Somit ist allen vier Fusionen von AtFer1 die Lokalisierung in den Plastiden gemein. Eine mitochondrielle Lokalisierung war dagegen nicht zu detektieren, hierfür gibt es drei mögliche Erklärungen. Die einfachste davon ist, dass AtFer1 *in vivo* nicht in beide Organellen transportiert wird. Des Weiteren könnten auch gewebespezifische Faktoren eine Rolle spielen, so dass in der oberen Blattepidermis kein Ferritin in Mitochondrien benötigt wird und daher auch kein Transport von AtFer1 in diese zu beobachten ist. Als letzte Variante ist denkbar, dass ein Mitochondrienimport der YFP-Fusionen stattfin-

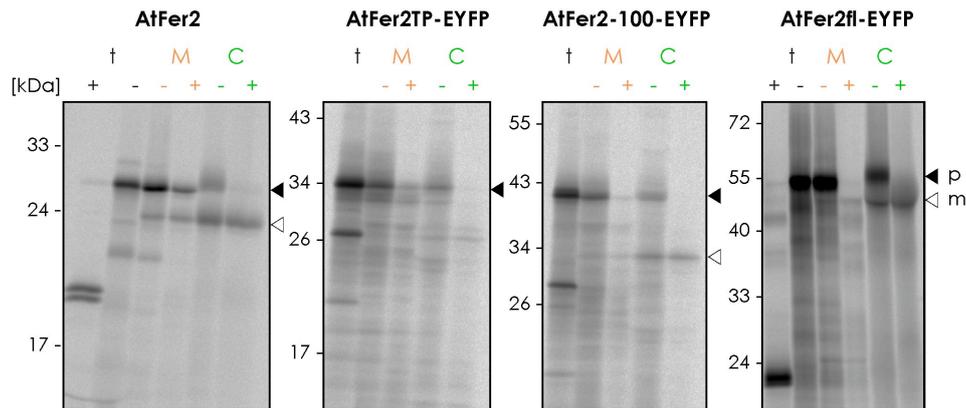


**Abb. 2.41: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Epidermiszellen nach transienter Expression von AtFer1fl-EYFP.** Es wurden folgende Kanäle und deren Überlagerungen verwendet: Chlorophyllkanal (**Chl**) und YFP-Kanal (**YFP**). Die Plastiden (**P**) und die punktförmigen Fluoreszenzsignale (**K**) wurden mit einem Pfeil markiert. Auf der rechten Bildseite ist eine Vergrößerung eines Bildbereiches ( $5\ \mu\text{m}$ ) gezeigt. Für weitere Details siehe Abbildung 2.38.

det, diese aber nicht detektierbar sind. Eine Möglichkeit ist ein sehr schwacher Transport und damit einhergehend eine YFP-Fluoreszenz unterhalb des Detektionslimits. Dies ist analog den *in vitro* Importen mit deutlich schwächeren Mitochondrientransport im Vergleich zu dem plastidären denkbar. Es könnte sich auch um Probleme bei der Faltung des EYFP handeln, so dass kein fluoreszierendes EYFP in den Mitochondrien gebildet wurde.

### 2.5.2.3 Lokalisierung der Reporterproteinfusionen von AtFer2 *in vitro* und *in vivo*

Die transiente Expression der AtFer1-Fusionsproteine zeigte nur eine plastidäre und keine mitochondriale Lokalisierung dieses Ferritins, möglicherweise sind nicht alle vier *Arabidopsis* Ferritine *in vivo* in beiden Organellen lokalisiert. AtFer2 könnte auch *in vivo* in beide Organellen transportiert werden, da dieses Ferritin als einziges keine Konkurrenz des Mitochondrientransportes durch das 33 kDa Protein aufwies (Abb. 2.33). Analog der Fusionen von AtFer1 wurden die Reporterproteinkonstrukte von AtFer2 zunächst im *in vitro* Ansatz auf ihre Importkompetenz untersucht.



**Abb. 2.42: In organello Import der AtFer2-Fusionsproteine.** Dargestellt sind Expositionen von 10-15%igen SDS-Polyacrylamidgelen. Die erstellten AtFer2-Fusionsproteine wurden in einem *in organello* Importexperiment analysiert und zum Teil zusätzlich mit Thermolysin inkubiert (t+). Für weitere Details siehe Abb. 2.13 und 2.14.

Die Fusionen und das authentische AtFer2 wurden im Einzelorganellimport untersucht. Dabei ergab sich folgendes Bild, das authentische Protein zeigt Import in beide Organellen, Mitochondrien und Chloroplasten. Dagegen wird die Transitpeptidfusion (Fer2TP-EYFP) in keines der beiden Organellen importiert. Ein dem authentischen AtFer2 entsprechendes Importverhalten wird mit den Vorstufenproteinen AtFer2-100-EYFP und AtFer2fl-EYFP beobachtet. Beide Fusionen werden in beide Organellen transportiert, weisen allerdings eine vergleichsweise geringe Importeffizienz auf. Insgesamt werden die Fusionen von AtFer2 schlechter als das authentische Protein in Mitochondrien und Chloroplasten transportiert, so dass für AtFer2TP-EYFP kein Import in die Organellen nachweisbar ist. Auch die Fusionen von AtFer2 wurden im Anschluss zur biolistischen Transformation von Erbsenblättern eingesetzt.

### AtFer2TP-EYFP

In Abbildung 2.43 sind zwei mit AtFer2TP-EYFP transformierte Zellen abgebildet. Mit diesem Fusionsprotein wurden auffällig viele Schliesszellen, dagegen verhältnismäßig wenige Epidermiszellen transformiert. Auch wenn keine statistische Analyse erfolgte, so wurde die Vielzahl der transformierten Stomata augenscheinlich nur mit dieser Fusion beobachtet. Eine pflanzenspezifische Ursache kann aufgrund einer parallelen Durchführung der Transformation mit unterschiedlichen Reporterfusionen ausgeschlossen werden, da hier keine erhöhte Anzahl an transformierten Stomata beobachtet wurde. Zudem ist die verstärkte Expression dieser Fusion in Schliesszellen kein einmaliges Ereignis, sondern wurde in unabhängigen Transformationsversuchen beobachtet. Es erscheint ausgeschlossen, dass überdurchschnittlich viele Schliesszellen von den Goldpartikeln getroffen und biolistisch transformiert wurden. Es könnte daher der Fall sein, dass die Schliesszellen mit dieser Fusion besser kompatibel sind als normale Epidermiszellen. So dass

die Epidermiszellen zwar von den Goldpartikeln erreicht werden, eine Expression von AtFer2TP-EYFP aufgrund einer Inkompatibilität eher selten ist.

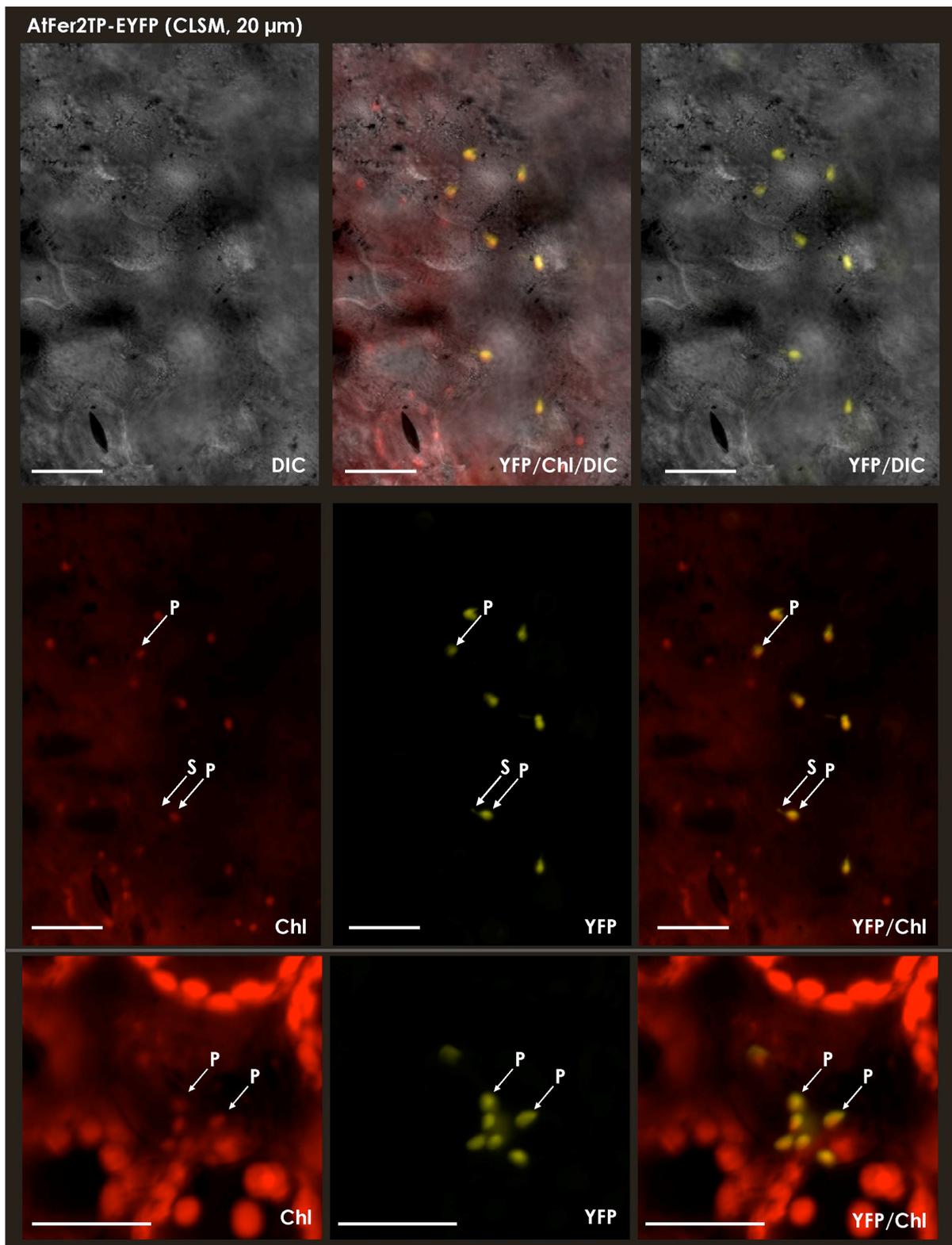
Die YFP-Fluoreszenz von AtFer2TP-EYFP wird in den Plastiden detektiert (Abb. 2.43), da die entsprechenden Chlorophyllsignale mit diesen übereinstimmen. Zudem werden die bereits erwähnten Stromuli (S) beobachtet. Damit ist auf eine stromale Lokalisierung von AtFer2TP-EYFP zu schliessen. In der abgebildeten Schliesszelle werden ebenfalls ausschließlich YFP-Fluoreszenzsignale in den Plastiden detektiert. Auch wenn diese Zellen vermutlich mit der Transportsignalfusion besser als die Epidermiszellen kompatibel sind, können keine Unterschiede bezüglich der Lokalisierung von AtFer2TP-EYFP beobachtet werden. In beiden Zelltypen ist eine ausschließlich plastidäre Lokalisierung zu sehen. Erneut wurden keine Signale in den Mitochondrien detektiert.

### **AtFer2-100-EYFP**

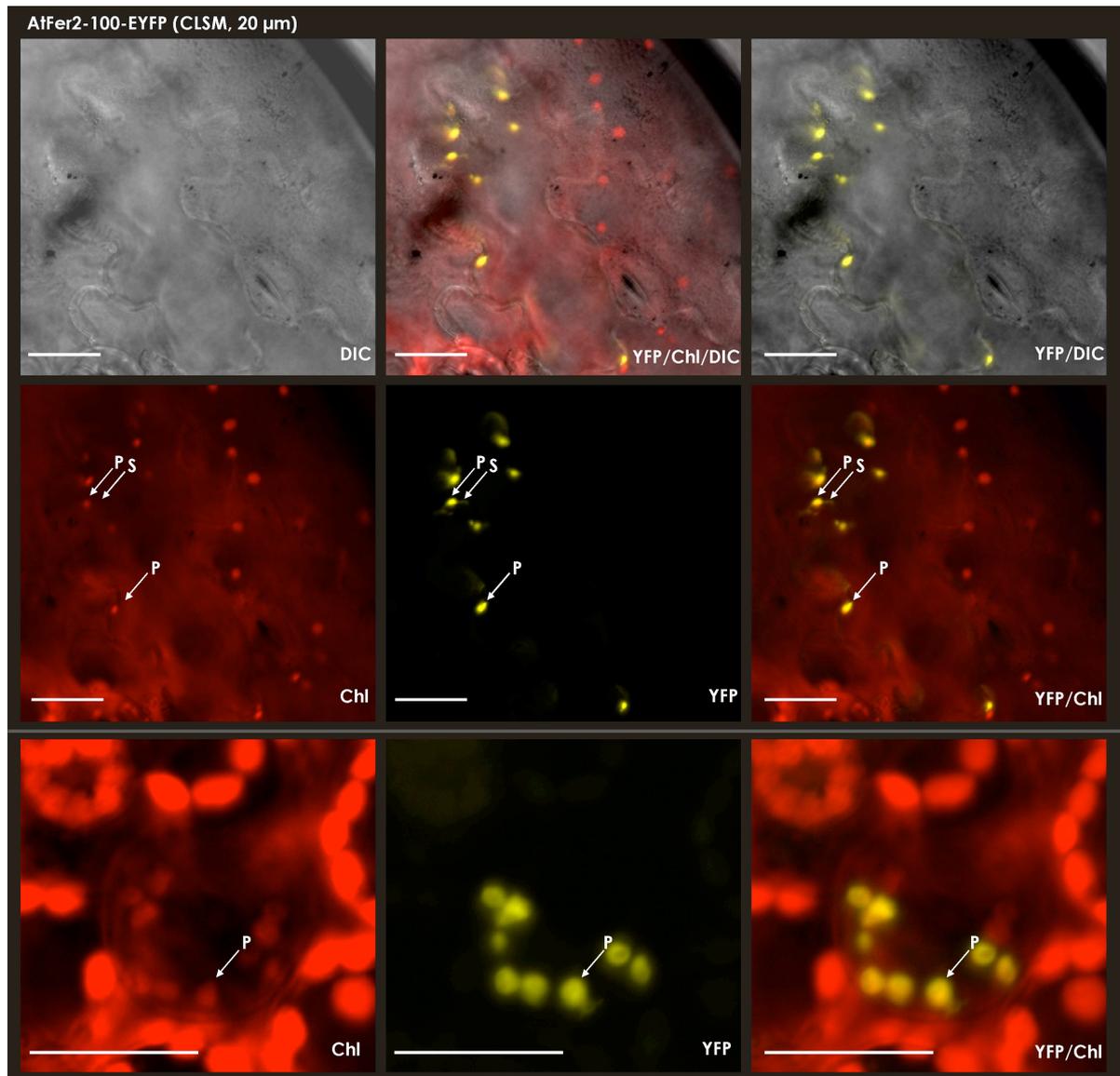
Die Fusion mit den ersten 100 Aminosäuren von AtFer2 wurde in Erbsenblattgewebe mittels biolistischer Transformation transferiert (Abb. 2.44). Im mikroskopischen Bild ist eine transformierte Epidermis- und eine transformierte Schliesszelle zu sehen. Das YFP-Signal befindet sich in den Plastiden, da es zusammen mit der Chlorophyllfluoreszenz lokalisiert. Die Plastiden der Epidermiszelle bilden zudem Stromuli (S) aus, folglich kann auf eine stromale Lokalisierung geschlossen werden. Auch in der Schließzelle wird die YFP-Fluoreszenz eindeutig den Plastiden zugeordnet. Die 100 Aminosäuren-Fusion von AtFer2 wird *in vivo* in Plastiden transportiert. Es gibt keine Hinweise auf Fluoreszenzsignale in anderen Zellkompartimenten. Nach Expression des Fusionsproteins kann der *in vitro* beobachtete Mitochondrienimport nicht *in vivo* gezeigt werden. In den Epidermiszellen von Blattgewebe scheint daher kein Mitochondrientransport von AtFer2-100-EYFP stattzufinden.

### **AtFer2fl-EYFP**

Die Volllängenfusion von AtFer2 zeigt ebenso wie die entsprechende Fusion von AtFer1 (Abb. 2.40 und 2.41) zwei verschiedene Arten der Fluoreszenzverteilung. Die in Abbildung 2.45 gezeigte transformierte Zelle ähnelt sehr stark den YFP-Signalen von AtFer1fl-EYFP (Abb. 2.41). Bei beiden Proteinen wird YFP-Fluoreszenz in punktförmigen Strukturen detektiert, welche sich in unmittelbarer Nähe zu Plastiden befinden. Im Gegensatz zu AtFer1fl-EYFP kann bei AtFer2fl-EYFP kein YFP-Signal in den Plastiden nachgewiesen werden. In der Vergrößerung dieser punktförmigen Strukturen wird deutlich, dass sie sich direkt an bzw. neben den Plastiden befinden. Es könnte sich um aggregierte Fusionsproteine handeln, welche vor dem Import in die Plastiden miteinander aggregieren, so dass die Proteine nicht in die Plastiden transportiert werden konnten. Beide Volllängenfusionen (AtFer1fl-EYFP und AtFer2fl-EYFP) scheinen für die transformierten Zellen



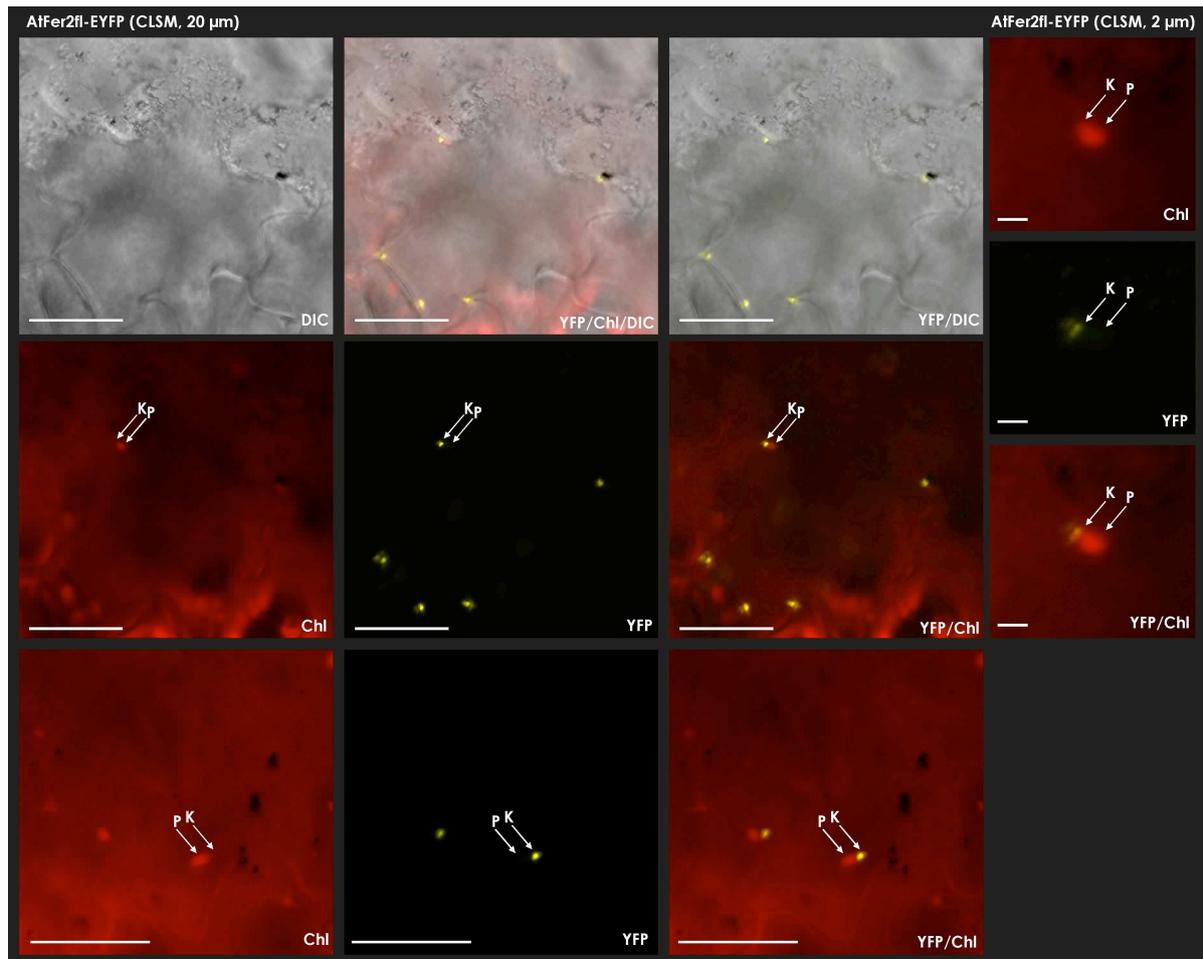
**Abb. 2.43: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Epidermiszellen nach transienter Expression von AtFer2-TP-EYFP.** Es wurden folgende Kanäle und deren Überlagerungen verwendet: Durchlichtbild (DIC), Chlorophyllkanal (Chl) und YFP-Kanal (YFP). Plastiden (P) und Stromuli (S) wurden mit einem Pfeil gekennzeichnet. Im oberen Bildbereich ist eine Epidermiszelle und im unteren Bereich eine transformierte Schliesszelle gezeigt. Für weitere Details siehe Abbildung 2.38.



**Abb. 2.44: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Epidermiszellen nach transienter Expression von AtFer2-100-EYFP.** Es wurden folgende Kanäle und deren Überlagerungen verwendet: Durchlichtbild (DIC), Chlorophyllkanal (Chl) und YFP-Kanal (YFP). Plastiden (P) und Stromuli (S) wurden mit einem Pfeil markiert. Im oberen Bildabschnitt sind mikroskopische Aufnahmen einer Epidermiszelle und im unteren Bereich eine transformierte Schliesszelle gezeigt. Für weitere Details siehe Abbildung 2.38.

problematisch zu sein.

Dies wird insbesondere bei der zweiten Form der Lokalisierung von transformierten Zellen deutlich. Hier wird ein massiver Einfluss der Reporterfusion (AtFer2fl-EYFP) auf die Zellvitalität festgestellt (Abb. 2.46). Bereits im Durchlichtmodus (DIC) ist im Zellinneren eine Anhäufung von Zellmaterial zu erkennen. Diese enthält YFP-Fluoreszenz und kann daher mit der Expression der Reporterfusion in Verbindung gebracht werden. Des Weiteren fehlen innere Strukturen der Zelle, so ist im Chlorophyllkanal keine Chlorophyllfluoreszenz dieser Zellen nachweisbar. Nur die Nachbarzellen weisen Chlorophyllsi-

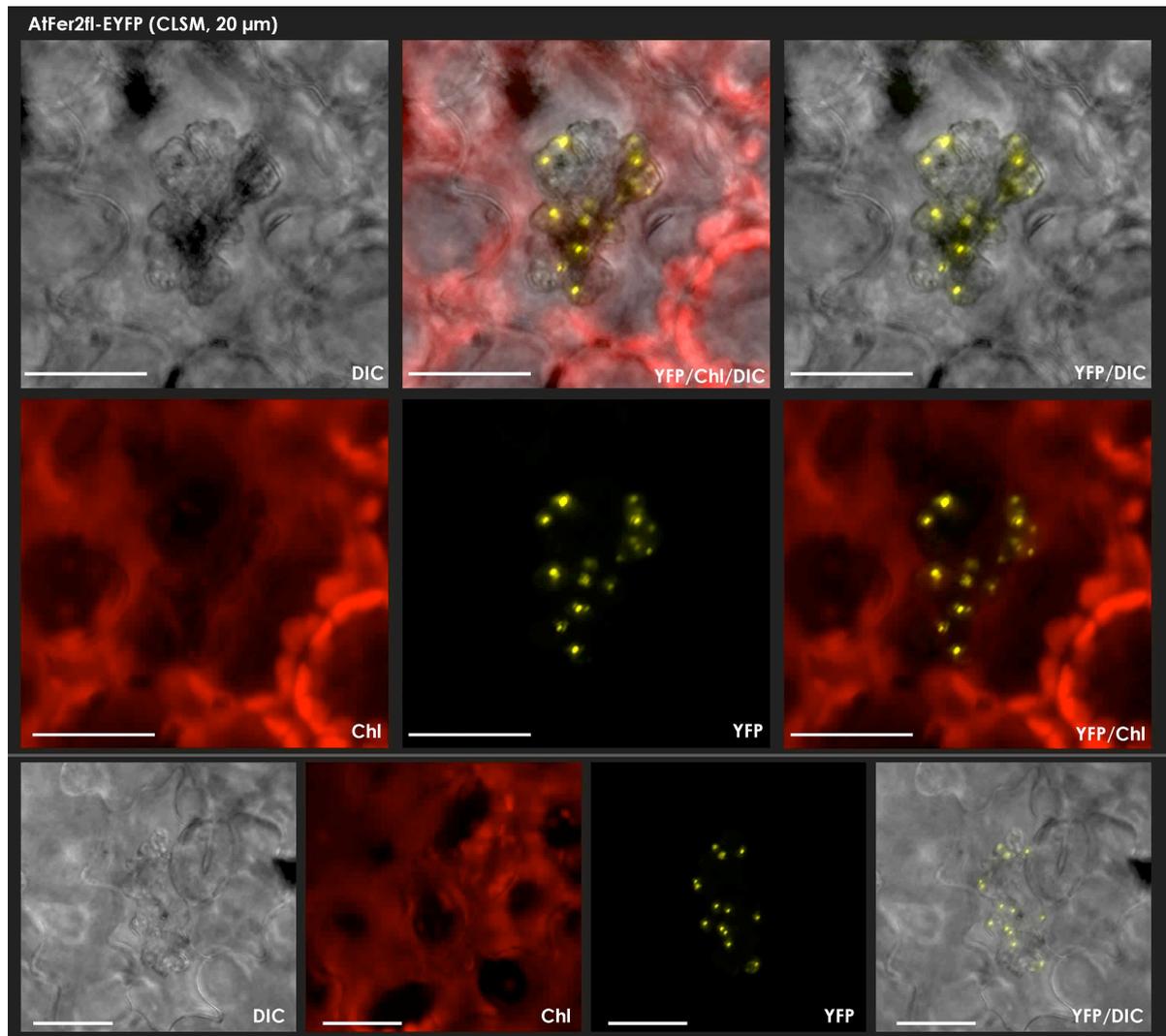


**Abb. 2.45: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Epidermiszellen nach transienter Expression von AtFer2fl-EYFP.** Es wurden folgende Kanäle und deren Überlagerungen verwendet: Durchlichtbild (DIC), Chlorophyllkanal (Chl) und YFP-Kanal (YFP). Die Plastiden (P) und punktförmigen Fluoreszenzsignale (K) wurden mit einem Pfeil markiert. Auf der rechten Seite ist ein vergrößerter Bildausschnitt (2 µm) zu sehen. Für weitere Details siehe Abbildung 2.38.

gnale der Plastiden auf. Daher ist die mit AtFer2fl-EYFP transformierte Zelle vermutlich bereits tot. Diese Fusion stört anscheinend derart stark den Zellstoffwechsel, dass diese Zellen sterben. Eventuell wird in diesem Fall das Fusionsprotein sehr stark exprimiert, so dass es zur Aggregation kommt, welche dann entweder der Zelle direkt schadet oder mit anderen Zellstrukturen bzw. -proteinen interferiert. Mit diesem Vollängenkonstrukt ist daher eine Untersuchung des Organelltransports nur *in vitro* nicht aber *in vivo* möglich.

## Übersicht

In Tabelle 2.4 ist eine Zusammenfassung der beobachteten Lokalisierungen der authentischen und der Fusionsproteine von AtFer1 und AtFer2 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Fusionsproteine von AtFer1 und AtFer2 ein ähnliches *in vivo* Transportverhalten zeigen. Alle Reporterproteinkonstrukte sind in der Lage EYFP in oder an die Plastiden zu dirigieren. Die Transitpeptidfusionen und die Fusionen der ersten 100 Aminosäuren



**Abb. 2.46: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Epidermiszellen nach transienter Expression von AtFer2fl-EYFP.** Es wurden folgende Kanäle und deren Überlagerungen verwendet: Durchlichtbild (**DIC**), Chlorophyllkanal (**Chl**) und YFP-Kanal (**YFP**). Es sind zwei verschiedene Epidermiszellen (oberer und unterer Bildabschnitt) zu sehen. Für weitere Details siehe Abbildung 2.38.

von AtFer1 und AtFer2 dirigieren EYFP in die Plastiden. Wobei bei AtFer1TP-EYFP auch ein gewisser Anteil an cytosolischem EYFP zu erkennen war, dieses liegt entweder tatsächlich im Cytosol vor oder wurde noch nicht ins Organell transportiert. Die Vollängenfusionen beider Ferritine verursachen den Zellen Schwierigkeiten. So können in den Vollängenfusionen von AtFer1 und AtFer2 jeweils zwei Formen von Fluoreszenzsignalen beobachtet werden. Zum einen plastidäre (AtFer1fl-EYFP) Fluoreszenzsignale bzw. tote transformierte Epidermiszellen (AtFer2fl-EYFP) und zum anderen die Lokalisierung in stark fluoreszierenden punktförmigen Strukturen, welche in unmittelbarer Nähe zu Plastiden zu beobachten sind (AtFer1fl-EYFP und AtFer2fl-EYFP). Nur bei AtFer1fl-EYFP ist neben dem stark leuchtenden Signal auch in den Plastiden eine schwache YFP-Fluoreszenz zu detektieren.

**Tab. 2.4: Zusammenfassung der Lokalisierung von AtFer1 und AtFer2.** Es sind die Ergebnisse des *in vitro* Importverhaltens und der *in vivo* Lokalisierung der authentischen Proteine und deren Reporterproteininfusionen zusammengestellt.

	Lokalisierung	
	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
<b>AtFer1</b>	dual	
<b>AtFer1TP-EYFP</b>	dual	Plastiden, Cytosol
<b>AtFer1TPmut-EYFP</b>	-	Plastiden, Cytosol, Kern
<b>AtFer1-100-EYFP</b>	dual	Plastiden
<b>AtFer1fl-EYFP</b>	dual	a) nur Plastiden b) schwache Fluoreszenz in den Plastiden daneben punktförmige Strukturen
<b>AtFer2</b>	dual	
<b>AtFer2TP-EYFP</b>	-	Plastiden
<b>AtFer2-100-EYFP</b>	dual	Plastiden
<b>AtFer2fl-EYFP</b>	dual	a) tote Zellen b) in lebenden Zellen: punktförmige Strukturen an den Plastiden

Anhand der hier gezeigten Ergebnisse scheinen die ersten 100 Aminosäuren fusioniert mit EYFP für die biolistische Transformation am besten geeignet, da die Transportsignalfusion von AtFer1 nur zu einer transformierten Zelle führte und die Vollängenfusionen allgemein schwer verträglich für die Zellen sind, so dass sogar ein Teil der transformierten Zellen aufgrund der Expression des Fusionsproteins stirbt.

Es wird zudem ersichtlich, dass weder AtFer1 noch AtFer2 in lebenden Zellen in Mitochondrien transportiert werden, sondern im Stroma der Plastiden lokalisiert sind. Die *in vitro* beobachtete duale Lokalisierung konnte für diese Ferritine somit nicht *in vivo* gezeigt werden. Dies wirft die Frage auf, ob dies nur an der Auswahl der *in vivo* analysierten Ferritine liegt, oder ob keines der vier *Arabidopsis* Ferritine in lebenden Gewebe mitochondriell vorliegt. Eine weitere Möglichkeit ist eine gewebespezifische Lokalisierung der Ferritine, so dass in epidermalemem Gewebe nur eine plastidäre Lokalisierung zu beobachten ist, dagegen in anderen Zellen vielleicht auch eine mitochondrielle Lokalisierung möglich ist. Zudem werden Proteine aus *Arabidopsis thaliana* in Erbsenblättern transformiert und daher nicht im gleichen Organismus exprimiert, so dass auch dadurch Unterschiede entstehen könnten. Andererseits wurden die *in vitro* Daten mit Erbsen- bzw. zum Teil Spinatorganellen generiert und diese waren in der Lage *Arabidopsis* Proteine zu importieren.

Ein Teil dieser Fragen konnte durch eine nachträglich erfolgte biolistische Transformation von Blattgewebe aus Spinat und aus *Arabidopsis thaliana* mit den Fusionen der ersten 100 Aminosäuren von AtFer1 und AtFer2 beantwortet werden (Daten nicht gezeigt).

Die YFP-Signale wurden in beiden Spezies ausschließlich in Plastiden und nicht in Mitochondrien detektiert. Im Spinatblattgewebe wurden zudem transformierte Palisadenparenchymzellen beobachtet. Die Lokalisierung in diesen Zellen wies keine Unterschiede zu Epidermis- bzw. Schliesszellen auf. Somit konnten keine Unterschiede in der Lokalisierung von AtFer1-100-EYFP und AtFer2-100-EYFP zwischen den drei Pflanzenspezies festgestellt werden.

Alle vier Ferritine aus *Arabidopsis thaliana* sind in der Lage in *in organello* Experimenten in Mitochondrien und Chloroplasten zu importieren. Die transiente Expression der Reporterproteinfusionen von zwei Ferritinen (AtFer1 und AtFer2) zeigte eine ausschließlich plastidäre Lokalisierung in Blattgewebe. Das *dual targeting* der Ferritine wurde somit nur *in vitro* nicht aber *in vivo* beobachtet.

## 3 Diskussion

### 3.1 Konservierung der Ferritine aus *Arabidopsis thaliana*

Ferritine sind Eisen-speichernde Proteine, welche an der Eisenhomöostase in Zellen beteiligt sind. In der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* wurden vier Gene für Ferritin identifiziert (Petit et al. (2001a)). Der Vergleich der Proteinsequenzen zeigt, dass die vier Ferritine eine hohe Homologie zueinander aufweisen (ca. 70-80 % der reifen Proteinteile, Tab. 2.2, Abb. 2.2). Solch hohe Ähnlichkeiten sind u.a. für zwei Ferritine aus Sojabohne (SferH-1 und SferH-5) beschrieben. Beide Vorläuferproteine sind zu 96 % identisch und unterscheiden sich in nur 10 Aminosäureresten (Dong et al. (2007)). Des Weiteren weisen auch Ferritine verschiedener Pflanzenspezies (Sojabohne, Kuhbohne) Aminosäureidentitäten zwischen 90 % und 95 % auf (Masuda et al. (2007)). Folglich sind pflanzliche Ferritine hoch homolog zueinander, so dass selbst Ferritine aus verschiedenen Pflanzen bis zu 90 % identisch sein können. Die für die *Arabidopsis* Ferritine erhaltenen Ähnlichkeitswerte im Bereich von 70 % entsprechen publizierten Daten zur Homologie pflanzlicher Ferritine (Lobréaux et al. (1992a), Wicks & Entsch (1993), Wardrop et al. (1999)). Eine größere Änderungen der Aminosäuresequenz dieser Proteine scheint nicht möglich. Diese Konservierung pflanzlicher Ferritine deutet auf eine Erhaltung der Funktion dieser Proteine hin. Ferritine sind nicht nur innerhalb des Pflanzenreiches konserviert, sondern sind selbst mit humanen Vertretern zu 40 % - 50 % identisch (Petit et al. (2001a)). Dies spricht für eine funktionelle Konservierung sowohl der tierischen als auch der pflanzlichen Ferritine. Die größte Varianz der vier *Arabidopsis* Ferritine wird für den aminoterminalen Bereich, dem Transitpeptid, beobachtet (Abb. 2.2). Die Homologie in diesem Bereich liegt bei nur 19-36 % (Daten nicht gezeigt). Die einzige Ausnahme bilden AtFer3 und AtFer4, bei diesen stimmen sogar im Transitpeptid 63 % der Aminosäuren überein. Eine größere Ähnlichkeit findet sich bei den zwei nahezu identischen Sojabohnenferritinen (SferH-1 und SferH-5), welche sich selbst im Transitpeptid nur in fünf Aminosäureresten unterscheiden (Dong et al. (2007)). Die überdurchschnittlich hohe Homologie im Bereich der Transitpeptide von AtFer3 und AtFer4 zusammen mit der insgesamt sehr hohen Ho-

mologie beider Proteine (80 % im reifen Protein, Tab. 2.2) lassen auf einen gemeinsamen Ursprung schliessen. So könnten beide Ferritine in Folge eine Genduplikation entstanden sein.

## 3.2 Import- und Assemblierungsverhalten der Ferritine in isolierte Chloroplasten

### 3.2.1 Plastidäre Lokalisierung der *Arabidopsis* Ferritine

Zum Importverhalten pflanzlicher Ferritine liegen bislang nur wenige Daten vor. So wurde für ein Gartenbohnenferritin (*Phaseolus vulgaris*) bereits ein Chloroplastenimport gezeigt (van der Mark et al. (1983c)). Diese Arbeit ist allerdings nur bedingt aussagekräftig, da aufgrund von Coimmunpräzipitation des aus Gesamt-RNA synthetisierten Ferritins nur sehr schwache Importsignale in den Chloroplasten detektiert wurden. Des Weiteren fehlt eine Analyse der Lokalisierung dieses Ferritins innerhalb der Plastiden. Alle anderen bisherigen Arbeiten beruhen vor allem auf mikroskopischen Methoden durch Beobachtung von Ferritin-Eisen-Partikeln oder Immunlokalisierung (Seckbach (1968), Lescure et al. (1991)). Die Aussagen dieser Untersuchungen beschränken sich dabei auf eine plastidäre Lokalisierung. In der vorliegenden Arbeit konnte der Transport der vier Ferritine aus *Arabidopsis thaliana* ins Stroma der Chloroplasten gezeigt werden (Abb. 2.3). Diese plastidäre Lokalisierung deckt sich zum einen mit der TargetP-Vorhersage (vgl. Tab. 2.3) und zum anderen mit bereits veröffentlichten Daten (Hyde et al. (1963), Sczekan & Joshi (1987), Lescure et al. (1991)). Mit Hilfe der *in organello* Versuche wurde nicht nur eine stromale Lokalisierung, sondern auch eine Assoziation der importierten und prozessierten *Arabidopsis* Ferritine an die Thylakoidmembranen nachgewiesen (Abb. 2.3). Zwei Ferritine (AtFer1 und AtFer3) werden auch durch Proteasebehandlung der Thylakoide nicht vollständig abgebaut und liegen vermutlich teilweise geschützt an der Thylakoidmembran vor. Die Bindung der Ferritine an die Thylakoide ist besonders interessant, da diese Membran vor allem Proteinkomplexe der Photosynthese beherbergt. Am photosynthetischen Elektronentransport sind u.a. eisenhaltige Proteine wie beispielsweise das Rieske-Fe/S-Protein oder Häm tragende Cytochrome beteiligt (Iverson (2006)). Werden diese Proteine beschädigt und verlieren ihre native Konformation, so werden enthaltene Eisenionen freigesetzt. Es ist daher vorstellbar, dass der thylakoidassoziierte Anteil des plastidären Ferritins die freiwerdenden Eisenionen aufnimmt. Dies würde zum Schutz vor eisenbedingtem oxidativen Stress im Chloroplasten beitragen (Abb. 1.1, Briat & Lebrun (1999)) und Schädigungen von Lipiden, Proteinen sowie der plastidären DNA minimieren. Eine solche Funktion wurde für Ferritine sowohl in *Chlamydomonas reinhardtii* (Busch et al. (2008)) als auch in *Arabidopsis thaliana* gezeigt (Ravet et al.

(2008)).

Darüber hinaus könnte im Stroma der Chloroplasten neben der Speicherung auch die Bereitstellung von Eisen durch Ferritin von Bedeutung sein. Die an der Fe/S-Cluster-Synthese beteiligten Proteine sind in Pflanzen sowohl in Mitochondrien als auch in Chloroplasten lokalisiert (Überblick bei Balk & Lobréaux (2005)). Somit könnten die Ferritine das für die Fe/S-Cluster-Synthese im Stroma benötigte Eisen zur Verfügung stellen. Hierfür sind Interaktionen zwischen diesen Proteinen vorstellbar.

### 3.2.2 Funktionelle Ferritinkomplexe im Chloroplasten

Die Assemblierung der Ferritine in funktionelle Ferritinkomplexe ist Voraussetzung, um die vorgeschlagenen Funktionen der Eisenspeicherung und -bereitstellung übernehmen zu können. Die hochmolekularen Ferritinkomplexe bestehen aus 24 Ferritinuntereinheiten in deren Inneren Eisen gelagert wird (Harrison & Arosio (1996)). Während tierische Komplexe zwischen 430-480 kDa groß sind (Rothen (1944), Crichton et al. (1973)), liegen pflanzliche Ferritinkomplexe im Bereich von 550 kDa bis 600 kDa (Sczekan & Joshi (1987), van Wuytswinkel et al. (1995), Masuda et al. (2007)). Im Anschluss an *in vitro* Importexperimente konnten mittels nativer Gelelektrophorese Komplexe aller vier *Arabidopsis* Ferritine sowohl im Stroma (Abb. 2.5) als auch an den Thylakoiden detektiert werden (Abb. 2.8). Diese sind ca. 670 kDa groß und folglich etwas größer als die beschriebenen pflanzlichen Ferritinkomplexe. Zum einen könnten die verwendeten nativen Gelsysteme für diesen Größenunterschied verantwortlich sein, oder aber die *Arabidopsis* Ferritinkomplexe sind insgesamt etwas größer. Zur abschließenden Klärung dieses Größenunterschieds wird ein Vergleich der detektierten Komplexe der *Arabidopsis* Ferritine zu bekannten pflanzlichen Ferritinkomplexen (z.B. Erbse, van Wuytswinkel et al. (1995)) benötigt. Aufgrund der vergleichbaren Größe der beobachteten Komplexe kann davon ausgegangen werden, dass es sich um funktionelle Komplexe der *Arabidopsis* Ferritine handelt, die aus je 24 Untereinheiten aufgebaut sind und zur Eisenspeicherung bzw. Eisenbereitstellung im Stroma und an den Thylakoiden dienen (Abschnitt 3.2.1).

Im Stroma werden neben den funktionellen Ferritinkomplexen von ca. 670 kDa auch kleinere Proteinbanden detektiert (Abb. 2.5). Bei diesen könnte es sich um im Auf- oder Abbau befindliche Ferritinkomplexe handeln. Solche kleineren Ferritinkomplexe wurden bisher nicht beschrieben (Crichton et al. (1978), Sczekan & Joshi (1987), Lescure et al. (1990), Masuda et al. (2001)) und wurden möglicherweise aufgrund der kurzen Inkubationszeit und der sensitiven Methode (Visualisierung radioaktiver Signale) sichtbar gemacht. Auch wenn diese Komplexe Ferritin enthalten, kann zur tatsächlichen Natur dieser Proteinbanden mit den verwendeten *in vitro* Methoden keine Aussage getroffen werden. Es ist allerdings auffällig, dass die vier *Arabidopsis* Ferritine unterschiedliche

Bandenmuster im niedermolekularen Bereich aufweisen, welche auf die etwas unterschiedlichen Proteinsequenzen zurückzuführen sein könnten (Abb. 2.2). Die kleineren Komplexsignale werden dagegen in der BN-PAGE der Thylakoide nicht detektiert (Abb. 2.8). Möglicherweise assoziieren die kleineren Komplexe im Gegensatz zum 670 kDa Ferritinkomplex nicht mit der Thylakoidmembran.

### 3.2.3 Spezielle Prozessierung von AtFer3 und AtFer4

Die in die Plastiden importierten Ferritine zeigen verschiedene Prozessierungsmuster (Abb. 2.3). Zum einen wird nur ein reifes Protein (AtFer1 und AtFer2) gebildet und zum anderen entstehen mindestens zwei reife Proteinbanden (AtFer3 und AtFer4). Immunologisch konnte bislang eine einzelne Bande in *Arabidopsis thaliana* (Gaymard et al. (1996)) und in Reis nachgewiesen werden (Qu et al. (2005)). Diese Daten stimmen somit mit den Ergebnissen der Importexperimente zu der AtFer1 und AtFer2 Proteine überein.

AtFer3 und AtFer4 weisen dagegen mindestens eine Doppelbande nach Import in die Chloroplasten auf. Interessanterweise zeigen nur diese beiden einander sehr ähnlichen *Arabidopsis* Ferritine ein solches ungewöhnliches Bandenmuster. Die Inkubation der Vorläuferproteine von AtFer3 und AtFer4 mit Stromaextrakt führte nur zu einem Prozessierungsprodukt (Abb. 2.4), so dass die beobachteten Banden nicht ausschließlich das Produkt der SPP-Spaltung sein können. Daher muss im intakten Organell eine von der SPP unabhängige proteolytische Spaltung dieser Ferritine erfolgen. Das Auftreten solcher Doppelbanden wurde bereits mehrfach für pflanzliche Ferritine beschrieben (Laulhere et al. (1988), Proudhon et al. (1989), Laulhere et al. (1989), Dong et al. (2007)). In diesen Arbeiten konnte u.a. beobachtet werden, dass das größere Ferritin (28 kDa) beispielsweise durch Inkubation mit Blattextrakt in die kleinere Form (26,5 kDa) überführt werden kann (Laulhere et al. (1989), Lobréaux & Briat (1991), Masuda et al. (2001), Dong et al. (2007)). Zunächst wurde vermutet, dass das pflanzenspezifische Extensionspeptid (EP) vom Aminoterminal der Ferritine abgespalten wird (Abb. 1.4, Ragland et al. (1990)). Inzwischen haben allerdings Masuda et al. (2001) gezeigt, dass bei Sojabohnenferritin die carboxyterminalen 16 Aminosäuren abgespalten werden, wodurch die E-Helix, welche an der Oberfläche der Ferritinkomplexe liegt, fehlt (vgl. Abb. 1.3 und 2.2). Die Autoren vermuten daher, dass die Poren der *4-fold channel* vergrößert werden und konnten dies mit einer schnelleren Eisenabgabe aus Komplexen verkürzter Ferritinuntereinheiten belegen (Masuda et al. (2001)).

Für AtFer3 scheint eine solche zusätzliche Abspaltung der E-Helix vom C-Terminus vorstellbar, da das finale Produkt kleiner als die SPP-Prozessierungsbande ist (Abb. 2.4). Folglich könnte im Anschluss an Import und SPP-Prozessierung eine weitere proteolytische Spaltung des AtFer3 erfolgen. Im Gegensatz dazu ist die kleinere der beiden promi-

nennten Prozessierungsbanden von AtFer4 (im Bereich von 23-24 kDa) das SPP-Produkt und die größere der beiden Banden entsteht vermutlich durch eine weitere Protease. Das größere Prozessierungsprodukt von AtFer4 könnte am Aminoterminus gespalten worden sein und somit die Prozessierung der SPP, z.B. durch die Zerstörung der Erkennungsstelle, behindern. Davon ausgehend wäre dies eine Kompetition der unbekanntenen Protease mit der SPP um die frisch importierten AtFer4 Proteine. Die zusätzlichen Prozessierungsprodukte von AtFer3 und AtFer4 werden nur nach Import und nicht nach Inkubation mit Stromaextrakt beobachtet, so dass es sich bei der Protease um ein membranständiges Protein handeln könnte.

Ungeachtet der Tatsache, dass die Natur dieser beiden Banden nicht geklärt werden kann, kommt ihnen vermutlich eine Funktion zu, da bei AtFer3 und AtFer4 diese Doppelbanden im Ferritinkomplex von ca. 670 kDa enthalten sind (Abb. 2.6 und 2.7). Welche Aufgaben den beiden Ferritinvarianten im Komplex zukommt und inwiefern diese Ferritine veränderte Eigenschaften aufweisen, beispielsweise durch die möglicherweise fehlende E-Helix, müsste mit weiteren Methoden analysiert werden. Als erstes muss die Proteinsequenz der zusätzlichen Ferritinbanden geklärt werden (z.B. mittels Massenspektrometrie), um im Anschluss den Einfluss dieser AtFer3 und AtFer4 Proteine auf die Funktionalität der Ferritinkomplexe untersuchen zu können.

### **3.3 Dual targeting Verhalten der Ferritine *in vitro***

#### **3.3.1 Import der Ferritine in Mitochondrien und Chloroplasten**

Bisher wurde eine plastidäre Lokalisierung der vier Ferritine gezeigt, allerdings gab es erste Hinweise auf eine mögliche mitochondrielle Lokalisierung von *Arabidopsis* Ferritin (Zancani et al. (2004)). Diese führten zur weiteren Untersuchung der Ferritine aus *Arabidopsis thaliana* bezüglich ihres Organelltransports. Die zunächst verwendeten Vorhersageprogramme gaben zum Großteil die in Abschnitt 2.2 gezeigte plastidäre Lokalisierung an (Tab. 2.3). Zusätzlich wurden AtFer1, AtFer2 und AtFer3 teilweise und AtFer4 mehrfach von den Vorhersageprogrammen als mitochondrielle Proteine erkannt. Die *in silico* Analyse wurde durch *in vitro* Importexperimente mit isolierten Chloroplasten und Mitochondrien erweitert. Alle vier Ferritine werden in die Mitochondrien und Chloroplasten transportiert und zu den reifen Proteinen prozessiert (Abb. 2.13). Diese ersten Ergebnisse stützen die von Zancani et al. (2004) vermutete mitochondrielle Lokalisierung der *Arabidopsis* Ferritine. Folglich sind nicht nur in tierischen Zellen (Drysdale et al. (2002)), sondern auch in Pflanzenzellen Ferritine in den Mitochondrien lokalisiert.

Im Gegensatz zu den Ferritinsignalen in Plastiden sind die in den Mitochondrien detektierten Signale deutlich schwächer (Abb. 2.13). Die beobachteten Prozessierungspro-

dukte der Ferritine sind in beiden Organellen gleich groß, daher könnten SPP (stromale Prozessierungspeptidase) und MPP (mitochondrielle Prozessierungspeptidase) ähnliche Schnittstellen nutzen. Eine weitere Möglichkeit ist, dass in den präparierten Mitochondrien Plastiden vorlagen, die diesen Import ermöglichen. Anhand der durchgeführten *Western* Analysen (Abb. 2.11, 2.12, 2.23 und 2.24) konnte zunächst die erfolgreiche Präparation von Mitochondrien aus Erbse und Spinat gezeigt werden. Die Erbsenmitochondrien waren sehr rein und enthielten keine plastidären Kontaminationen. Im Gegensatz dazu wurden in den Spinatmitochondrienpräparationen geringe Kontaminationen von stromalen und thylakoidalen Proteinen nachgewiesen (Abb. 2.12 und 2.24). Aufgrund der zum Teil schwachen Importsignale der Ferritine (AtFer3, AtFer4) in den Mitochondrien könnte man vermuten, dass eine Kontamination der Mitochondrienpräparationen mit Plastiden vorliegt, welche dann zu einem „scheinbaren“ Mitochondrienimport der Ferritine führte. Diese Möglichkeit wurde von Cleary et al. (2002) untersucht und zeigte, dass geringe Plastidenkontaminationen der Mitochondrien nicht für entsprechende Importsignale verantwortlich sein können, da ein Plastidenimport mit diesen geringen Mengen nicht beobachtet werden konnte. Aufgrund der Reinheit der Erbsenmitochondrien, mit denen der Großteil der Importexperimente durchgeführt wurde, beruht der beobachtete *in vitro* Import der Ferritine in die Mitochondrien nicht auf einer Plastidenkontamination. Folglich zeigen die vier *Arabidopsis* Ferritine *dual targeting* Verhalten *in vitro*.

Eine duale Lokalisierung in Mitochondrien und Chloroplasten (*dual targeting*) wurde inzwischen für mehrere Proteine gezeigt (Peeters & Small (2001)). Diese duale Lokalisierung kann durch so genannte gemischte (*ambiguous*) oder zusammengesetzte (*twin*) Transportsignale vermittelt werden. Da nur ein Translationsprodukt gebildet wird, gehören die Ferritine aus *Arabidopsis thaliana* vermutlich zu Proteinen mit gemischtem Transportsignal am Aminoterminus (Abb. 2.13 und 2.14).

Ein wichtiger Ansatz zur Untersuchung des Transports der Ferritine war die Isolierung der Organellen aus demselben Pflanzenmaterial, so dass sowohl Mitochondrien als auch Chloroplasten den selben Ursprung hatten. Dadurch ist gewährleistet, dass die Organellen aus Pflanzen mit gleichem physiologischen Zustand kommen. Bislang wurden die Importe in Mitochondrien und Plastiden zumeist mit Organellen aus unterschiedlichen Pflanzenspezies durchgeführt (Menand et al. (1998), Chew et al. (2003b), Duchêne et al. (2005)). Vergleicht man solche Importe miteinander, besteht die Möglichkeit, dass die verwendeten verschiedenen Pflanzen einen Unterschied im Transportverhalten hervorrufen. Andererseits gibt es auch Beispiele in denen Organellen einer Spezies verwendet wurden, wobei zusätzlich Mitochondrien aus einer anderen Pflanze eingesetzt wurden (Rudhe et al. (2002a), Rudhe et al. (2002b), Chew et al. (2003a)).

Um die *in vitro* Importexperimente an die *in vivo* Situation in einer Pflanzenzelle an-

zupassen, wurden gemischte Importansätze nach Rudhe et al. (2002a) durchgeführt. In diesen gemischten Importen konkurrieren beide Organellen um das Vorläuferprotein, wodurch so genanntes *mis-sorting* minimiert wird. Die Importexperimente der vier Ferritine zeigten keine Veränderung des Transportverhaltens in beide Organellen (Abb. 2.16), dadurch unterstützen diese Experimente das Ergebnis der Einzelimportstudien, die ein *dual targeting* der Ferritine nahelegen. Eine mögliche Erklärung für die zusätzliche mitochondrielle Lokalisierung der *Arabidopsis* Ferritine ist, dass ihre Transportsignale vermutlich amphipathische  $\alpha$ -Helices ausbilden können (Abb. 2.17), welche ein Strukturmerkmal mitochondrieller Transportsignale sind (von Heijne (1986)). Da gemischte Transportsignale sowohl Eigenschaften mitochondrieller als auch plastidärer Signale tragen (Peeters & Small (2001), Pujol et al. (2007)), könnte die Ausbildung von amphipathischen  $\alpha$ -Helices zum *dual targeting* von Proteinen beitragen.

Ein interessanter Aspekt ist der Einfluss des Alters bzw. der Entwicklungsstufe der zur Organellisierung eingesetzten Pflanzen auf das Importverhalten der Ferritine. Während der Transport in die Plastiden mit steigendem Alter bei allen vier Ferritinen abnimmt, wird dies für den Mitochondrienimport nur bei drei Ferritinen beobachtet (Abb. 2.21). Einzig bei AtFer2 bleibt der Transport in die Mitochondrien mit steigendem Pflanzenalter gleich bzw. nimmt leicht zu. Die vier gezeigten Importexperimente wurden mit Organellen der selben Präparation durchgeführt, folglich unterscheiden die Rezeptoren bzw. die Importkomplexe zwischen den vier Vorläuferproteinen hinsichtlich ihrer Effizienz. Obgleich nur zwei verschieden alte Erbsenpflanzen zur Organellisierung eingesetzt wurden, können Unterschiede bezüglich der Transporteffizienz der vier Ferritine festgestellt werden. Auch in den Arbeiten von Christensen et al. (2005) wurde *in vivo* beobachtet, dass die DNA Polymerase  $\gamma$ 1 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.

Bezieht man den Expressionsort der *Arabidopsis* Ferritine in die Transportbetrachtung mit ein, so werden nur AtFer1 und AtFer3 in Rosettenblättern von *Arabidopsis thaliana* exprimiert (Tab. 1.1, Petit et al. (2001a)). Da die verwendeten Organellen aus Blattmaterial (Erbse, Spinat) stammten, erfolgte nur für AtFer1 und AtFer3 der Transport in Organellen des Gewebes, in dem diese Proteine natürlicherweise exprimiert werden (Blattgewebe). Zudem wird bei Seneszenz die Expression von AtFer1 induziert (Tarrantino et al. (2003)), daher könnte AtFer1 als Eisenspeicherprotein in beiden Organellen benötigt werden, wenn die Proteine der Elektronentransportketten (Photosynthese, Atmungskette) abgebaut und enthaltene Eisenionen freigesetzt werden.

### 3.3.2 Lokalisierung und Komplexassemblierung der Ferritine in den Organellen

Im Chloroplasten liegen die Ferritine im Stroma und teilweise an die Thylakoide assoziiert vor (Abschnitt 2.2). Um auch innerhalb der Mitochondrien die Lokalisierung der Ferritine zu spezifizieren, wurde eine Fraktionierung der Mitochondrien in eine lösliche Fraktion und eine Membranfraktion durchgeführt. Die 1D- und 2D-PAGE, sowie die *Western* Analysen zeigten den erfolgreichen Aufschluss der Mitochondrien und die klare Trennung der beiden Fraktionen (Abschnitt 2.4.1). Die verwendeten Mitochondrien-spezifischen Antikörper detektierten die jeweiligen Markerproteine innerhalb der entsprechenden Kompartimente der Mitochondrien. Unter Verwendung des Isocitratdehydrogenase Antikörpers wurde das Idh-Dimer in der Matrix (lösliche Fraktion) und das Monomer zusätzlich in der Membranfraktion nachgewiesen (Abb. 2.23). Diese Lokalisierung wurde bereits für Isocitratdehydrogenasen aus *Arabidopsis thaliana* beschrieben (Behal & Oliver (1998)).

Die zuvor gezeigte Lokalisierung der *Arabidopsis* Ferritine im Stroma und an der Thylakoidmembran (Abb. 2.3) wurde im Parallelansatz mit Mitochondrien nochmals bestätigt (Abb. 2.25). In Mitochondrien sind AtFer1, AtFer2 und AtFer3 zwischen löslicher Fraktion und Membranfraktion in etwa gleich verteilt (Abb. 2.25), im Gegensatz zu AtFer4, welches vor allem in der Membranfraktion detektiert wird. Als Kontrollprotein diente das Cytochrom c1 des Cytochrom-bc1-Komplexes der inneren Mitochondrienmembran. Dieses zeigte eine ausschließlich membranständige Lokalisierung.

Die Nähe der Ferritine zu den Elektronentransportketten-tragenden Membranen beider Organellen (Thylakoidmembran, innere Mitochondrienmembran) deutet auf eine Eisenspeicherung an diesen Membranen hin. Membranassoziiertes Ferritin könnte Eisenionen aufnehmen, welche von eisenhaltigen Proteinen freigesetzt werden und so zum Schutz vor oxidativen Stress beitragen. Auch eine Funktion als universelles Eisenspeicherprotein in den löslichen Subkompartimenten beider Organellen (Stroma bzw. Matrix) ist denkbar. Für plastidäres Ferritin wird angenommen, dass es im Plastiden Eisen speichert (Briat et al. (1999)). Im Mitochondrium ist diese Funktion ebenfalls vorstellbar, so dass in diesem Fall analog zu den Plastiden ebenfalls Ferritinkomplexe vorzufinden sein müssten. Dies wurde mittels BN-PAGE untersucht. Die Ergebnisse bestätigten die bereits gezeigte Komplexassemblierung für alle vier Ferritine in den Plastiden (Abb. 2.28, 2.5 und 2.8), dagegen wurden in den Mitochondrien lediglich für zwei der vier *Arabidopsis* Ferritine (AtFer1 und AtFer3) Komplexe detektiert. Folglich sind AtFer1 und AtFer3 vermutlich auch in Mitochondrien funktionell und könnten entsprechende Aufgaben übernehmen. Des Weiteren zeigen diese Experimente, dass die Komplexassemblierung nicht spontan erfolgt, da zwei der Ferritinproteine in Mitochondrien keine Komplexe ausbilden können.

### 3.3.3 Bestätigung des *in vitro* Imports in Mitochondrien und Chloroplasten

Der *in vitro* Organellimport der Ferritine aus *Arabidopsis thaliana* wurde in verschiedenen Experimenten untersucht. Es wurden Stabilitätsversuche der importierten Ferritine, Importzeitreihen und die in Abschnitt 2.5.1 gezeigten Experimente z.B. zur Lichtabhängigkeit des Organelltransports durchgeführt. Die Stabilitäts- und Importzeitreihenversuche deuteten auf einen fortlaufenden Import der Ferritine hin und zeigten, dass diese in beiden Organellen stabil sind. Folglich werden alle vier Ferritine in Mitochondrien und Chloroplasten nicht als falsch lokalisiert erkannt. Die weiteren Versuche (Lichtabhängigkeit des Organellimports, Valinomycinzugabe bzw. Konkurrenz mit Plastidensubstrat) ergaben kein eindeutiges Bild. Der Chloroplastenimport ist auf ATP als Energiequelle angewiesen, welches in der lichtabhängigen Photosynthese gewonnen wird. Der bei fehlender Lichtquelle beobachtete effiziente Import ist auf das im Ansatz enthaltene ATP zurückzuführen. Daher konnten im Dunkeln lediglich geringe Effekte auf den Plastidenimport der Ferritine festgestellt werden (Abb. 2.29). Im Gegensatz dazu veränderte sich der Mitochondrienimport der vier Ferritine unter beiden Lichtverhältnissen nicht.

Der Einsatz von Valinomycin führte wie erwartet zur Verringerung des Mitochondrienimports der Ferritine, welcher allerdings nicht vollständig inhibiert wurde (Abb. 2.31). Zumeist führt die Zugabe von Valinomycin zur vollständigen Inhibierung des Mitochondrienimportes der Proteine (Chow et al. (1997), Menand et al. (1998), Duchêne et al. (2001), Cleary et al. (2002), Duchêne et al. (2005)). Im Gegensatz dazu zeigen sowohl die vier Ferritine als auch die Glutathionreduktase in Gegenwart von Valinomycin keine vollständige Hemmung des Mitochondrienimports (Rudhe et al. (2002a), Rudhe et al. (2002b), Chew et al. (2003a)). Aufgrund der auftretenden Reduzierung des Plastidentransports der Ferritine ist die Aussagekraft der Valinomycininhibierung eher gering. Trotz allem wird der Mitochondrienimport der Ferritine stärker gehemmt als der entsprechende Plastidenimport, so dass es sich wahrscheinlich um einen Import in die Mitochondrien handelt. Im Gegensatz zu den untersuchten Ferritinen wies der Plastidenimport der Ferrochelatase-I auch in Anwesenheit von Valinomycin keine Veränderung auf (Chow et al. (1997)). Möglicherweise hängt der Einfluss von Valinomycin auf den Plastidenimport der Ferritine mit einer Verknüpfung des Protonengradienten mit dem elektrochemischen Gradienten über der Thylakoidmembran zusammen. Insgesamt betrachtet, scheint der Einsatz von Valinomycin (Menand et al. (1998), Rudhe et al. (2002b), Rudhe et al. (2002a), Cleary et al. (2002), Goggin et al. (2003), Chew et al. (2003a), Chew et al. (2003b), Duchêne et al. (2005), Bhushan et al. (2006)) zur Unterscheidung des Organelltransports ungeeignet, da nicht nur wie erwartet der Mitochondrienimport, sondern auch der Plastidentransport inhibiert wird.

Zur Unterscheidung der beiden Organellimporte sind eindeutige Veränderungen nötig. Auch die Kompetitionsversuche mit plastidärem Kompetitorprotein führen zu keiner aussagekräftigen Unterscheidung des Mitochondrien- und Plastidenimports, da mit Ausnahme von AtFer2 der Import in beide Organellen verhindert wird (Abb. 2.33). Es stellt sich daher die Frage, ob bzw. wie gut das 33 kDa Protein als Kompetitor für diese Ansätze geeignet ist. Zur besseren Interpretation der erhaltenen Ergebnisse müsste auch ein mitochondrielles Protein als Kompetitor eingesetzt werden, welches innerhalb der Arbeitsgruppe bislang nicht zur Verfügung steht. Insgesamt betrachtet deuten diese drei experimentellen Ansätze darauf hin, dass der Import der Ferritine in die Mitochondrien nicht eindeutig vom Import in die Chloroplasten zu unterscheiden ist.

Die *in vitro* Daten geben deutliche Evidenzen bezüglich einer dualen Lokalisierung der vier Ferritine, insbesondere da die Ferritine in beiden Organellen eine Funktion als möglicher Eisenspeicher oder -donor übernehmen könnten.

## 3.4 Transportverhalten der Reporterfusionen von AtFer1 und AtFer2

### 3.4.1 *In vitro* Organellimport der Reporterproteinfusionen

Unabhängig von den *in vitro* Methoden zur Bestimmung des Organelltransports, muss auch eine Lokalisierung der Ferritine in der lebenden Zelle gezeigt werden, da bereits Proteine untersucht wurden, bei denen das *dual targeting* Verhalten zwischen *in vitro* und *in vivo* Versuchen voneinander abweicht (Cleary et al. (2002), Duchêne et al. (2005)).

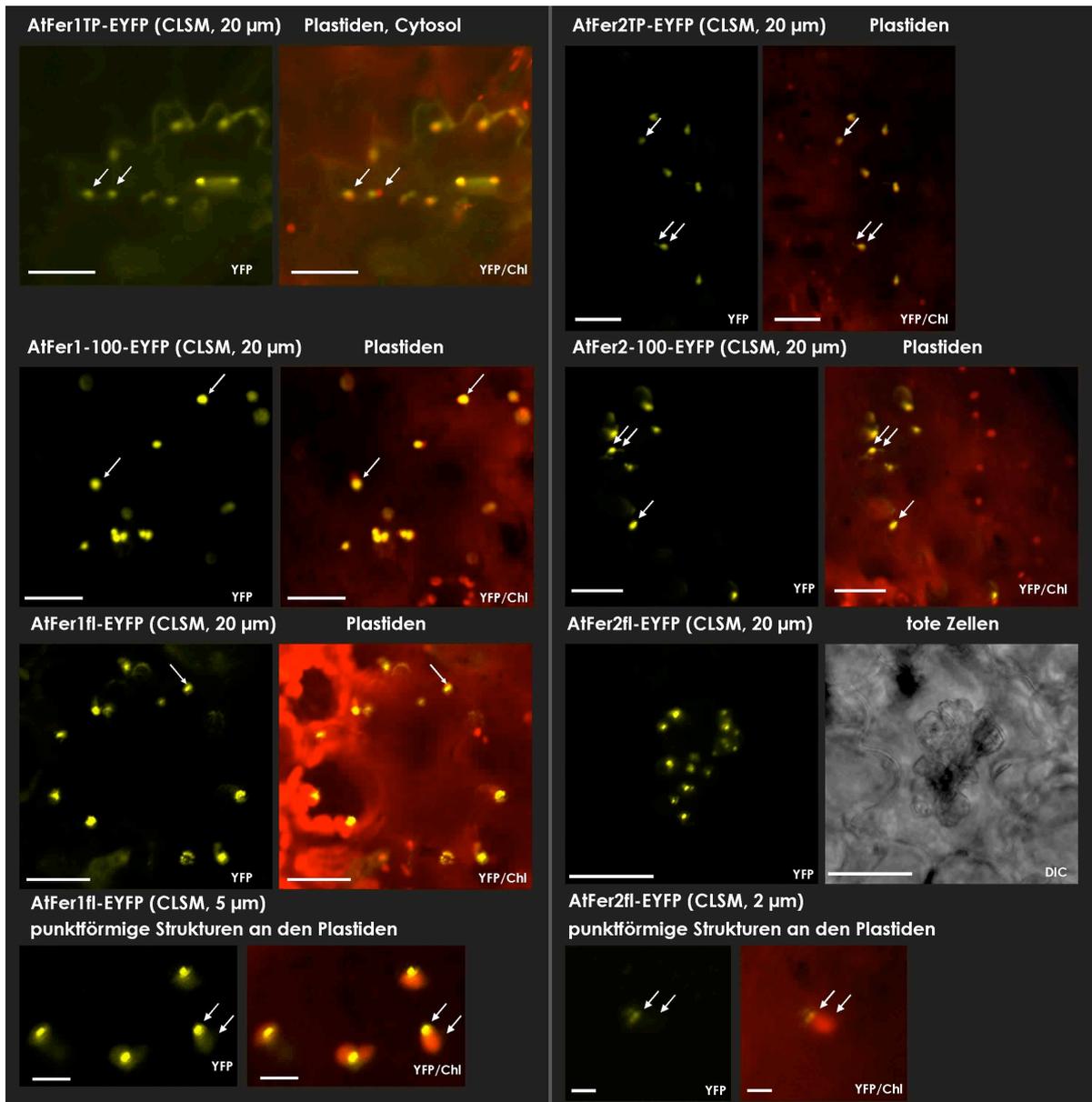
Der an den Carboxyterminus des Transitpeptids, der ersten 100 Aminosäuren oder des Vollängenproteins der zwei Ferritine (AtFer1 und AtFer2) fusionierte Reporter (EYFP, EGFP) sollte keinen Einfluss auf den Import der Ferritine in die Organellen haben. Die durchgeführten *in vitro* Versuche zeigten, dass der Transport entsprechend dem authentischen Protein (AtFer1-100-EYFP, AtFer1fl-EYFP) erfolgte oder stark reduziert (AtFer1TP-EYFP, AtFer2-100-EYFP, AtFer2fl-EYFP) bzw. nicht detektierbar war (AtFer2TP-EYFP) (Tab. 2.4, Abb. 2.36 und 2.42). Das Reporterprotein scheint abhängig vom Protein (AtFer1 bzw. AtFer2), sowie von der gewählten Fusion (Transportsignal, die ersten 100 Aminosäuren oder Volllänge), den Organelltransport negativ zu beeinflussen. So ist es denkbar, dass Erkennungsstellen der Importrezeptoren oder der Prozessierungspeptidasen beider Organellen bei den Transitpeptidfusionen maskiert werden, so dass dies die Effizienz des Transports vermindert. Da bei den 100 Aminosäurefusionen die gleiche Problematik auftritt, scheint eine Maskierung der Prozessierungsstelle nicht die Ursache zu sein.

### 3.4.2 Die plastidäre Lokalisierung von AtFer1 und AtFer2 *in vivo*

Die Reporterfusionen von AtFer1 und AtFer2 dirigieren EYFP *in vivo* ins Stroma der Plastiden (Abb. 3.1, Tab. 2.4). Für alle Reporterfusionen von AtFer1 und AtFer2 konnten keine EYFP-Signale in den Mitochondrien oder mitochondrienähnlichen Strukturen detektiert werden. Folglich zeigen die *in vivo* Daten von AtFer1 und AtFer2 abweichende Ergebnisse zu den *in vitro* Importversuchen der authentischen Ferritine sowie der Reporterfusionen von AtFer1 und AtFer2 (Tab. 2.4, Abb. 2.36 und 2.42).

Es wurde beobachtet, dass alle Fusionen von AtFer1 Fluoreszenzsignale in bzw. an den Plastiden der Epidermiszellen aufweisen (Abb. 3.1). Für die kurzen Reporterfusionen von AtFer1 und AtFer2 (Fusionen der Transitpeptide und der ersten 100 Aminosäuren) wurde eine Plastidenlokalisierung des EYFP-Signals detektiert. Die beobachtete Lokalisierung entspricht der FNR-EGFP-Fusion, welche im Stroma der Chloroplasten vorliegt (Marques et al. (2004)). Des Weiteren zeigen die Transportsignal- und 100 Aminosäuren-Fusionen beider Ferritine Stromuli (*stroma filled tubules*) (Abb. 2.38, 2.39, 2.43 und 2.44), bei diesen handelt es sich um Stroma gefüllte Ausstülpungen der Plastidenhüllmembranen (Arimura et al. (2001), Gunning (2005)). Das Auftreten dieser Strukturen bestätigt somit eine stromale Lokalisierung der Ferritine.

Die Volllängenfusionen beider Ferritine zeigen eine sehr ungewöhnliche Verteilung der EYFP-Fluoreszenz (Abb. 3.1). Bei beiden Reporterfusionen wurden zwei Arten der Lokalisierung beobachtet. AtFer1fl-EYFP wird zum einen in die Plastiden transportiert und zeigt zum anderen ein schwaches Plastidensignal sowie stark fluoreszierende punktförmige Strukturen direkt an den Plastiden. Im Vergleich dazu befindet sich AtFer2fl-EYFP ausschließlich in solchen punktförmigen Strukturen direkt an Plastiden. Des Weiteren wurden mit AtFer2fl-EYFP transformierte Zellen beobachtet, in welchen die YFP-Fluoreszenz in einer in der Zelle entstandenen Anhäufung von Zellmaterial detektiert wird. Bereits im Durchlichtmodus sind keine Zellstrukturen erkennbar, so dass die Expression dieses Konstruktes zum Absterben der Zellen geführt haben könnte. Da alle anderen Konstrukte von AtFer1 und AtFer2 keine toten transformierten Zellen aufwiesen, scheint es sich um ein spezifisches Phänomen der AtFer2fl-EYFP-Fusion zu handeln. Möglicherweise aggregiert das in den Zellen exprimierte Protein so stark, dass die ganze Zelle davon betroffen ist. Eventuell handelt es sich um ein den Aggresomen ähnliches Phänomen (Kopito & Sitia (2000), Kopito (2000)). Aggresomen wurden zuerst in tierischen Zellen beschrieben und sind cytoplasmatische Aggregate fehlerhaft gefalteter Proteine (Johnston et al. (1998)). Die Bildung der Aggresomen erfolgt an *microtubule organizing centers* (MTOC), wobei fehlerhaft gefaltete Proteine an den Mikrotubuli zu den Aggresomen transportiert werden (Kopito (2000)). Auch in Pflanzen können



**Abb. 3.1:** Zusammenfassung der *in vivo* Lokalisierung der Reporterproteinfusionen von **AtFer1** und **AtFer2**. Zusammenstellung fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen nach transienter Expression der Reporterproteinfusionen von AtFer1 und AtFer2 (siehe Abschnitt 2.5.2). Weitere Details siehe Abbildung 2.38.

Aggresomen-ähnliche Strukturen beobachtet werden (Vogel et al. (2007)). Während die Aggresomenbildung in lebenden Zellen statt findet, liegen diese Strukturen in toten Zellen vor. Somit können diese Strukturen keine Aggresomen bzw. Aggresomen-ähnliche Strukturen darstellen. Möglicherweise kommt es infolge einer erhöhten Expression der Fusionsproteine zu einer starken Aggregation, wodurch der Zellstoffwechsel empfindlich gestört wird. Im Fall einer Aggregation könnte die Komplexassemblierung der Ferritine diesen Prozess verstärken. Das EYFP am Protein könnte mit der Komplexassemblierung der Ferritine interferieren und dadurch zur Aggregatbildung führen.

Ein Erklärungsansatz für die punktförmigen Strukturen bei Expression von AtFer1fl-EYFP und AtFer2fl-EYFP könnte ein an Plastiden bindendes oder in der Nähe lokalisierendes Organell darstellen. Auf der anderen Seite ist es auch möglich, dass die Fusionsproteine direkt am Plastiden präzipitieren bzw. aggregieren. Im Fall von AtFer1fl-EYFP könnte der Präzipitation in geringem Umfang ein Plastidenimport vorausgegangen sein, da in den Plastiden eine schwache EYFP-Fluoreszenz nachweisbar ist. Zur tatsächlichen Natur der markierten Strukturen kann anhand der durchgeführten Experimente keine Aussage getroffen werden (Abb 3.1).

### 3.4.3 Vergleich des *in vitro* und *in vivo* Importverhaltens der Ferritine

In diesem Abschnitt sollen nun die Gründe für und gegen eine Lokalisierung der *Arabidopsis* Ferritine in Mitochondrien und Chloroplasten diskutiert werden. Dabei werden die Ergebnisse dieser Arbeit zusammen mit Literaturdaten erörtert.

Betrachtet man die Transportuntersuchungen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im Vergleich zum Expressionsort der *Arabidopsis* Ferritine, fällt auf, dass nur AtFer1 und AtFer3 in Rosettenblättern exprimiert werden (Tab. 1.1, Petit et al. (2001a)). AtFer2 und AtFer4 werden bezüglich ihres Organelltransportes nicht im Pflanzengewebe des Expressionsortes untersucht, da AtFer2 im Samen und AtFer4 zusammen mit AtFer1 in der Blüte exprimiert wird (Petit et al. (2001a)). Somit liegen nur die AtFer1-Reporterproteine nach transienter Expression auch am Expressionsort (Blattgewebe) vor. Die AtFer1-Expression wird ebenfalls bei beginnender Seneszenz induziert (Tarantino et al. (2003)), so dass dieses Ferritin in beiden Organellen zur Aufnahme freiwerdender Eisenionen benötigt werden könnte.

Einerseits zeigen die vier Ferritine aus *Arabidopsis thaliana* *dual targeting in vitro* (Abb. 2.13 und 2.16). Andererseits sind AtFer1 und AtFer2 *in vivo* ausschließlich plastidär lokalisiert (Abb. 3.1). Dieser Unterschied der Lokalisierung ist nicht auf die Reporterfusionen zurückzuführen, da diese im *in vitro* Import in beide Organellen transportiert werden können (Abb. 2.36 und 2.42). Offensichtlich zeigen weder AtFer1 noch AtFer2 *in vivo* einen Transport in beide Organellen. Möglicherweise sind die nicht als Fusion untersuchten Ferritine, AtFer3 und AtFer4, *in vivo* in Mitochondrien und Plastiden lokalisiert, da Ferritin immunologisch in Mitochondrien aus *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen wurde (Zancani et al. (2004)). Andererseits könnte das *in vitro* beobachtete Transportverhalten der Ferritine auch so genanntes *mis-sorting* in die Mitochondrien darstellen. So wurde gezeigt, dass Mitochondrien *in vitro* plastidäre Proteine importieren können, welche *in vivo* ausschließlich in Plastiden lokalisiert sind (Cleary et al.

(2002), Bhushan et al. (2006)). Des Weiteren ist auch ein gewebespezifisches Transportverhalten denkbar, so dass abhängig vom Expressionsort eine veränderte Lokalisierung vorliegt. Für die DNA Polymerase  $\gamma 1$  wurden in jungen und älteren Zellen unterschiedliche Lokalisierungen beobachtet (Christensen et al. (2005)). In den verwendeten *in vivo* Ansätzen wurden transformierte Epidermiszellen untersucht, möglicherweise ist die Lokalisierung der Ferritine in der Wurzel oder Blüte verändert. Um dies zu analysieren, müsste entweder die transiente Transformation in die entsprechenden Gewebe etabliert oder stabil transgene Pflanzen der Reporterfusionen generiert werden. Transgene Pflanzen hätten den Vorteil, dass alle Zellen die Reporterfusion enthalten und daher jedes Gewebe bzw. Pflanzenorgan fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet werden kann.

Obwohl die Fusionsproteine von AtFer1 und AtFer2 *dual targeting* Verhalten *in vitro* zeigen, können intakte Pflanzenzellen vermutlich besser zwischen beiden Organellen unterscheiden als isolierte Organellen, welche selbst im gemischten Importansatz keine Veränderung des Transportverhaltens der vier Ferritine im Vergleich zum Einzelorganellimport aufwiesen (Abb. 2.16 und 2.15). Dieser spezielle Importansatz kann *mis-sorting* von Proteinen minimieren (Rudhe et al. (2002a)), allerdings liefern diese Experimente vermutlich Protein-abhängig unterschiedlich gute Resultate. Der *in vitro* Import der Ferritine wurde in Mitochondrien und Plastiden aus Erbse (AtFer1-AtFer4)) und Spinat (AtFer1-AtFer3) beobachtet. Der Transport in Organellen verschiedener Pflanzenspezies spricht gegen ein *in vitro mis-sorting* der Ferritine. So wurde beispielsweise für die SSU (kleine Untereinheit der Rubisco) gezeigt, dass ein Mitochondrienimport bei Verwendung von Erbsenmitochondrien, nicht aber von Mitochondrien aus *Arabidopsis* Zellkulturen oder Sojabohne, erfolgt (Lister et al. (2001)).

Es ist auch möglich, dass in den Importexperimenten das Cytosol und damit cytosolische Faktoren für ein korrektes *targeting* fehlen und die isolierten Organellen auf Grund dessen im *in vitro* Versuch plastidäre und mitochondrielle Vorstufenproteine schlecht unterscheiden können. Im Cytosol der intakten Pflanzenzelle könnten Proteine oder Proteinkomplexe an der Spezifität des Organelltransports beteiligt sein. So wurde beispielsweise ein so genannter *guidance* Komplex bestehend aus Hsp70 und 14-3-3-Proteinen nachgewiesen, welcher einen effizienten Plastidenimport der SSU bewirkt (May & Soll (2000)). Die Organellspezifität von Vorläuferproteinen könnte von diesem Komplex oder anderen noch unbekanntem cytosolischen Faktoren abhängig sein. In zukünftigen Analysen wäre es sinnvoll den Einfluss des Cytosols auf den *in organello* Import von *dual targeting* Proteinen zu untersuchen. Obgleich im *in vitro* Ansatz teilweise *mis-sorting* auftreten kann, hat dieser Ansatz in soweit Vorzüge gegenüber der *in vivo* Lokalisierung, als dass sehr genaue experimentelle Bedingungen eingestellt werden können. Im Gegensatz dazu sind im *in vivo* Ansatz die Bedingungen von außen nur schwer veränderbar. Beispiele dafür sind die Lokalisierungen der Vollängenfusionen von AtFer1 und AtFer2 (Abb.

3.1), bei denen unbekannte punktförmige Strukturen mit EYFP gefärbt wurden und transformierte, tote Zellen beobachtet wurden. Der Vorteil der *in vivo* Lokalisierungsstudien liegt in der Analyse des Transportverhaltens in intakten Zellen, insbesondere wird auch der Einfluss des Cytosols mit untersucht. Weiterhin könnte sich bereits der Transport der Fusionsproteine von dem der authentischen Proteine unterscheiden. Eine solche Beobachtung wurde für die AtFer2 Transportsignalfusion gemacht, welche nicht von isolierten Organellen erkannt wird (Abb. 2.36). Nach transienter Expression ist hingegen AtFer2TP-EYFP eindeutig in den Plastiden lokalisiert (Abb. 3.1).

Bezüglich des *dual targeting* Verhaltens der Ferritine wurden diverse *in vitro* Experimente durchgeführt. Diese sind zusammen mit der möglichen amphipathischen  $\alpha$ -Helix der Transitpeptide der Ferritine (Abb. 2.17) und der Veröffentlichung von Zancani et al. (2004) ein deutlicher Hinweis auf eine Lokalisierung in Mitochondrien und Chloroplasten. Andererseits sprechen die *in vivo* Ergebnisse der AtFer1- und AtFer2-Reporterfusionen gegen eine solche duale Lokalisierung. Dahingegen wurde mitochondriell lokalisiertes tierisches Ferritin bereits nachgewiesen (Levi et al. (2001), Drysdale et al. (2002)), so dass pflanzliches Ferritin analog zu diesen in Mitochondrien vorliegen könnte. Ein weiteres mitochondrielles Protein ist Frataxin, welches ebenfalls in der Lage ist, Eisen zu speichern (Cavadini et al. (2000), Adinolfi et al. (2002), Park et al. (2003)). Frataxin ist in Hefen, welchen Ferritin oder zu diesen homologe Proteine fehlen, das einzige Protein zur Eisenspeicherung (Gakh et al. (2002), He et al. (2004)). Zudem ist Frataxin an der Fe/S-Cluster-Synthese im Mitochondrium beteiligt (Lill & Mühlhoff (2005)) und könnte der Ferrochelatase Eisenionen zur Häm-Synthese zur Verfügung stellen (Lesuisse et al. (2003), He et al. (2004), Yoon & Cowan (2004), Bencze et al. (2007)). In tierischen Mitochondrien sind beide Eisen-speichernde Proteine vorhanden. Mitochondrielles humanes Ferritin kann auch Frataxin *knock out* Hefestämme komplementieren (Campanella et al. (2004), Levi & Arosio (2004)). Daher könnten beide Proteine in Mitochondrien sich ergänzende Aufgaben übernehmen. In *Arabidopsis thaliana* existiert ein Frataxin in Mitochondrien, dessen *knock out* embryoletal ist (Vazzola et al. (2007)). Folglich wird Ferritin in der Pflanze entweder nicht in die Mitochondrien importiert oder es kann die Funktionen von Frataxin in diesen nicht übernehmen. In Erbse und *Arabidopsis* wurde Ferritin in Mitochondrien immunologisch nachgewiesen (Zancani et al. (2004)). Es ist daher wahrscheinlich, dass Ferritin in diesen vorliegt. Allerdings stammten diese Mitochondrien aus etiolierten Erbsen und aus *Arabidopsis* Zellkulturen, folglich wurde nicht-grünes Gewebe zur Isolierung der Mitochondrien eingesetzt. Ein ähnlicher immunologischer Nachweis von Ferritin wurde mit *Chlamydomonas reinhardtii* durchgeführt. In diesen Arbeiten wurde Ferritin nur in Chloroplasten, nicht aber in Mitochondrien detektiert (Busch et al. (2008)). Des Weiteren zeigen Frataxin *knock down Arabidopsis* Pflanzen veränderte Enzymaktivitäten von Fe/S-Cluster-Proteinen in den Mitochondri-

en (Busi et al. (2006)). Sollte Ferritin in pflanzlichen Mitochondrien vorliegen, dann ist es vermutlich nicht in der Lage Eisen zur Fe/S-Cluster-Synthese bereitzustellen. Zusätzlich führt die Reduzierung an Frataxin auch zu erhöhtem oxidativen Stress (Busi et al. (2006)), welcher in Anwesenheit von Ferritin im Mitochondrium verhindert werden sollte. Im Gegensatz zu AtFer1 und AtFer3 wird Frataxin in Blattgewebe kaum exprimiert, dagegen wird die stärkste Expression in Blüten detektiert (Busi et al. (2004)), somit könnte mitochondriell lokalisiertes Ferritin in Blattgewebe von Bedeutung sein.

Ein verändertes *in vitro* zu *in vivo* Importverhalten analog dem der Ferritine wurde auch für Ferrochelatase beschrieben. Dieses Enzym ist am Einbau von Eisen in Protohäm beteiligt, und Chow et al. (1997) zeigten für das Protein aus *Arabidopsis thaliana* *dual targeting in vitro*. Auch das entsprechende Hefeprotein ist im Mitochondrium lokalisiert (He et al. (2004)). Allerdings ergaben weitere Untersuchungen, dass Ferrochelatase nur in die Mitochondrien aus Erbsenblättern, nicht aber aus *Arabidopsis* Zellkultur oder Sojabohne, importiert wurden (Lister et al. (2001)). Die beiden Ferrochelatase aus Gurke (*Cucumis sativus*) wurden *in vivo* ausschließlich in Plastiden transportiert (Masuda et al. (2003)). Daher könnten die Ferritine analog der Ferrochelatase einen unterschiedlichen Organelltransport *in vivo* und *in vitro* aufweisen. Beide Proteine kommen mit Eisen in Kontakt und würden in beiden Organellen Aufgaben übernehmen können. Dafür spricht auch, dass andere an der Häm-Synthese beteiligte Proteine entweder *dual targeting* zeigen (Protoporphyrinoxidase, Watanabe et al. (2001)) oder zwei Isoformen aufweisen, eines für jedes Organell (Coproporphyrinogen III Oxidase, Williams et al. (2006)).

Ein weiteres *dual targeting* Protein, die Glutathionreduktase, wurde wie die Ferritine *in vitro* und *in vivo* untersucht (Rudhe et al. (2002a), Rudhe et al. (2002b)). Dieses zeigte im Einzelorganellimport und im gemischten Importansatz einen Transport in Mitochondrien und Chloroplasten. Interessanterweise existieren zur *in vivo* Lokalisierung der Glutathionreduktase zwei Veröffentlichungen, welche einmal eine ausschließlich plastidäre Lokalisierung zeigen (Chew et al. (2003a)), und im anderen Fall sowohl eine Lokalisierung in Mitochondrien als auch in Chloroplasten beschreiben (Chew et al. (2003b)). Diese widersprüchlichen Daten sind seltsam, da in beiden Fällen Vollängen-GFP-Fusionen (transient exprimiert in Sojabohnenzellkulturen) untersucht wurden und beide Veröffentlichungen vom selben Autor stammen.

Die Untersuchungen der Reporterfusionen in dieser Arbeit zeigen, dass solche Konstrukte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* analysiert werden sollten, so dass verschiedene Methoden kombiniert und ergänzt werden können. In der Literatur wird das *dual targeting* häufig nur mit *in vivo* Methoden untersucht (Akashi et al. (1998), Watanabe et al. (2001), Dinkins et al. (2003), Wall et al. (2004), von Braun et al. (2007)). In anderen Veröffentlichungen werden entweder nur Chloroplastenimport und *in vivo* Methoden (Kleine et al.

(2003)) oder Importexperimente in beide Organellen mit *in vivo* Lokalisierungsstudien kombiniert (Menand et al. (1998), Obara et al. (2002), Chew et al. (2003a), Duchêne et al. (2005), Rokov-Plavec et al. (2008)). Wird das *in vitro* und *in vivo* Transportverhalten von Proteinen verglichen, fehlen meist Untersuchungen zum *in vitro* Transport der Fusionsproteine. Diese Analysen könnten beispielsweise bezüglich der Lokalisierung der Fusionen der Glutathionreduktase aufschlussreich sein (Chew et al. (2003a), Chew et al. (2003b)).

Abschließend kann festgestellt werden, dass eine Lokalisierung pflanzlicher Ferritine in beiden Organellen physiologisch sinnvoll erscheint, andererseits im Mitochondrium bereits Frataxin vorliegt.

## 4 Zusammenfassung

Im Kerngenom der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* wurden vier Gene für Ferritin identifiziert (Petit et al. (2001a)). In der vorliegenden Arbeit wurde das Import- und Assemblierungsverhalten der Ferritine aus *Arabidopsis thaliana* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Ferritine in isolierte Chloroplasten importiert und prozessiert werden. Innerhalb der Plastiden liegen die Ferritine im Stroma vor, können aber auch mit der Thylakoidmembran assoziieren. Damit wurde erstmalig seit der Veröffentlichung von van der Mark et al. (1983c) der *in organello* Import pflanzlicher Ferritine in die Chloroplasten gezeigt. Interessanterweise werden für alle vier Ferritine sowohl im Stroma als auch in der Thylakoidfraktion Ferritinkomplexe von ca. 670 kDa detektiert. Man kann daher davon ausgehen, dass die Ferritine auch nach einem solchen Importexperiment funktionell vorliegen und somit wahrscheinlich die Funktion der Eisenspeicherung im Chloroplasten übernehmen können. Eine weitere Beobachtung ist, dass die Vorläuferproteine von AtFer3 und AtFer4 in den Plastiden zu unterschiedlich großen reifen Ferritinen prozessiert werden, während die SPP (stromale Prozessierungspeptidase) die Vorläuferproteine von AtFer3 und AtFer4 nur zu einem reifen Protein prozessiert. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass diese Ferritine innerhalb der Plastiden einer weiteren Prozessierung unterliegen. Weiterhin sind diese zusätzlichen AtFer3 und AtFer4 Proteine funktionell aktiv, da sie in den Ferritinkomplexen von ca. 670 kDa integriert sind.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde aufgrund erster Hinweise bezüglich einer mitochondrialen Lokalisierung pflanzlicher Ferritine (Zancani et al. (2004)) der Transport der *Arabidopsis* Ferritine auch in Mitochondrien untersucht. Das Transportverhalten der vier Ferritine wurde mittels *in organello* Import mit isolierten Organellen analysiert und zeigte *in vitro* eine duale Lokalisierung der vier Ferritine in Mitochondrien und Chloroplasten. Ein solches *targeting* kerncodierter Organellproteine in beide Organellen, Mitochondrien und Chloroplasten, wird als *dual targeting* bezeichnet (Peeters & Small (2001)). In beiden Organellen werden in etwa gleich große reife Proteine detektiert, was darauf hindeutet dass die Prozessierung in beiden an ähnlicher Position im Protein erfolgt. Zur weiteren Charakterisierung der Lokalisierung der Ferritine innerhalb der Mitochondrien wurden diese in lösliche und Membranfraktion geteilt. Die erfolgrei-

che Trennung der löslichen von der Membranfraktion wurde mit immunologischen und gelelektrophoretischen Analysen nachgewiesen. Die Ferritine sind im Gegensatz zum Kontrollprotein, Cytochrom c1, welches nur in der Membranfraktion lokalisiert ist, entweder zwischen löslicher und Membranfraktion in etwa gleich verteilt (AtFer1, AtFer2, AtFer3) oder liegen vor allem in der Membranfraktion vor (AtFer4). Zwei der vier Ferritine (AtFer1 und AtFer3) bilden in den Mitochondrien Ferritinkomplexe aus, welche mit denen der Chloroplasten vergleichbar sind. Folglich sollten diese in den Mitochondrien funktionell vorliegen und somit in der Lage sein, Eisenionen zu speichern. Die *in vitro* Analyse des Transportverhaltens der Ferritine wurde durch *in vivo* Methoden ergänzt. Dazu wurden von zwei Ferritinen (AtFer1 und AtFer2) Reporterproteinfusionen (EYFP) der Transitpeptide, der ersten 100 Aminosäuren sowie der Vollängenproteine erstellt. Diese zeigten in einem ersten *in vitro* Experiment analog den authentischen Proteinen *dual targeting* Verhalten. Allerdings wird nach biolistischer Transformation der Fusionsproteine in Blattgewebe EYFP-Fluoreszenz nur in den Plastiden, nicht jedoch in den Mitochondrien detektiert. Somit ergibt sich eine Diskrepanz zwischen den *in vitro* und den *in vivo* Daten bezüglich der Lokalisierung der Ferritine. Daher konnte nur die plastidäre nicht aber die mitochondrielle Lokalisierung der *Arabidopsis* Ferritine AtFer1 und AtFer2 *in vivo* nachgewiesen werden.

---

# 5 Material & Methoden

## 5.1 Material

### 5.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien (p.a. Qualität) wurden, sofern nicht anders angegeben, bei folgenden Firmen erworben: Biomol (Hamburg), Difco (Detroit, USA), Duchefa (Haarlem, Niederlande), Fluka (Sigma-Aldrich), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen).

Die Radiochemikalien wurden von Amershan Biosciences (Freiburg) bezogen.

### 5.1.2 Enzyme

Von den Firmen MBI Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Frankfurt am Main) und Roche (Mannheim) stammen die Restriktionsendonukleasen. Folgende Enzyme wurden bei weiteren Firmen erworben:

<b>Enzym</b>	<b>Herkunft</b>
Alkalische Phosphatase ( <i>shrimp</i> )	United States Biochemical
AmpliTaq Gold <sup>®</sup> DNA-Polymerase	Applied Biosystems (Roche)
T3 RNA-Polymerase	Stratagene
T7 RNA-Polymerase	Fermentas
T4 DNA-Ligase	Fermentas
T4 DNA-Polymerase	Fermentas
Thermolysin	Sigma-Aldrich
RNase-Inhibitor	Fermentas

### 5.1.3 Molekularbiologische Kits

Anwendung	Bezeichnung	Herkunft
Isolierung von Plasmid-DNA (Miniprep)	NucleoSpin <sup>®</sup> Plasmid	Macherey-Nagel
Isolierung von Plasmid-DNA (Midiprep)	NucleoBond <sup>®</sup> PC100	Macherey-Nagel
Reinigung von DNA-Fragmenten	NucleoSpin <sup>®</sup> Extract	Macherey-Nagel
Sequenzierung von DNA	BigDye <sup>®</sup> Terminator	Applied Biosystems
	dRhodamine	Applied Biosystems
<i>in vitro</i> Translation	Flexi <sup>®</sup> Rabbit	Promega
	Reticulocyte Lysate	
Klonierung von PCR-Produkten	TOPO TA cloning <sup>®</sup>	Invitrogen
	pGEM <sup>®</sup> -T Easy	Promega

### 5.1.4 Membranen für *Western* Analysen

Anwendung	Bezeichnung	Herkunft
Proteintransfer	Immobilon <sup>™</sup> -P (PVDF-Membran)	Millipore

### 5.1.5 Längenstandards/Marker

Bezeichnung	Anwendung	Herkunft
1 Kb DNA Ladder	DNA-Größenmarker	Gibco BRL
SDS-7L	Protein-Größenmarker	Sigma-Aldrich
PageRuler <sup>™</sup> Prestaind	Protein-Größenmarker	Fermentas
HMW Native Marker	Protein-Größenmarker	Amersham Biosciences

### 5.1.6 Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Arbeitskonzentration	Herkunft
Ampicillin	100 mg/ml	100 $\mu$ g/ml	Serva
Kanamycin	50 mg/ml	50 $\mu$ g/ml	Serva

### 5.1.7 Nukleinsäuren und Oligonukleotide

Substanz	Herkunft
RNA-Cap-Strukturanalogon	New England Biolabs
Desoxyribonukleotide, Ribonukleotide	Roche

Die Oligonukleotide (Primer) für die PCR wurden bei MWG-Biotech (Ebersberg) bestellt.

Bezeichnung	Sequenz
<b>Sequenzierungen</b>	
T7-Primer	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'
T3-Primer	5' AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG 3'
M13 <i>forward L.A.</i>	5' GGT TTT CCC AGT CAC GAC GTT G 3'
M13 <i>reverse L.A.</i>	5' CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC C 3'
<b>Klonierung von AtFer1 &amp; AtFer2</b>	
5'Fer1	5' CTT CTA CAT TTT CCA ACG ATG GC 3'
3'Fer1	5' GTG AAC TTA TAG AGG TCC AAG TC 3'
5'Fer2	5' CTA GAT CTT AAG CCC AAA TGT TGC 3'
3'Fer2	5' CAG AAG CTG AAC TCT CCT TCC 3'
<b>Reporterproteinkonstrukte von AtFer1</b>	
5'Fer1-BamHI	5' AGA CGG ATC CCC AAC GAT GGC CTC AAA C 3'
3'TP-Fer1-NcoI	5' CCA TCC ATG GCG GTC ATC GGC ATG TTG T 3'
3'100-Fer1-NcoI	5' CCA TGG GCT CAT TAA TGA CTG CCT CGC 3'
3'fl-Fer1-NcoI	5' TAC TCC ATG GAG GTC CAA GTC AAG TTC A 3'
<b>Reporterproteinkonstrukte von AtFer2</b>	
5'Fer2-BglII	5' CCA CAG ATC TGC CCA AAT GTT GCA CAA G 3'
3'TP-Fer2-NcoI	5' TAG ACC ATG GCG AAT ACA ACT CCG GTT A 3'
3'100-Fer2-NcoI	5' CCA TGG CCT CCA CGT TGA TCT GAT CG 3'
3'fl-Fer2-NcoI	5' ATG ACC ATG GCT CTC CTT CCT AAA ACC T 3'

### 5.1.8 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\phi$ 80d $\Delta$ lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 endA1 recA1 hsdR17 (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) deoR thi-1 supE44 $\lambda$ - gyrA96 relA1
GM2163	F <sup>-</sup> ara-14 leuB6 thi-1 fhuA31 1AtY1 tsx-78 galK2 galT22 glnV44 hisG4 1 rpdL136 (Str <sup>r</sup> ) xyl-5 dam13::Tn9 (Cam <sup>r</sup> ) dcm-6

### 5.1.9 Vektoren

Bezeichnung	Resistenz	Herkunft
pGEM <sup>®</sup> -T Easy	Ampicillin	Promega
pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup>	Ampicillin & Kanamycin	Invitrogen
pBAT	Ampicillin	Annweiler et al. (1991)
pBAT::EGFP/pBAT::EYFP	Ampicillin	von Anja Rödiger zur Verfügung gestellt
pRT- $\Omega$ /Not/Asc (pRT100-Variante)	Ampicillin	Töpfer et al. (1987) Überlacker et al. (1996)
pRT- $\Omega$ /Not/Asc-MCS (*) (pRT- $\Omega$ /Not/Asc-Variante)	Ampicillin	von Daniela Rödel zur Verfügung gestellt

\* in den pRT- $\Omega$ /Not/Asc wurde zwischen NotI- und XbaI-Schnittstelle ein Teil der MCS (*multi cloning site*) des pAcGFP-Vektors (Clontech) eingebracht. Der insertierte Bereich umfasst die zwischen BglII- und BamHI-Schnittstelle liegende MCS des pAcGFP-Vektors.

### 5.1.10 cDNA-Klone zur *in vitro* Transkription und Translation

Alle Klone sind in T3 $\rightarrow$ T7 Orientierung im Vektor eingebaut. Einzige Ausnahme bildet das Cytochrom c1, welches in T7 $\rightarrow$ T3 Richtung im Vektor orientiert ist.

cDNA Klon	Ursprungs-organismus	Vektor	Linearisierung	beschrieben in
23 kDa	Spinat	pBAT	NotI	Clausmeyer (1992)
33 kDa	Spinat	pBAT	NotI	Clausmeyer (1992)
Cytc1	Kartoffel	pBSC	SalI	Braun et al. (1992a) von Rödiger (2003) zur Verfügung gestellt

AtFer1	<i>A. thaliana</i>	pBAT	Ecl136II	diese Arbeit
AtFer2	<i>A. thaliana</i>	pBAT	BstXI	diese Arbeit
AtFer3	<i>A. thaliana</i>	pBAT	Ecl136II	diese Arbeit
AtFer4	<i>A. thaliana</i>	pBAT	NotI	diese Arbeit
AtFer1TP-EYFP	<i>A. thaliana</i>	pBAT	NotI	diese Arbeit
AtFer1TPmut-EYFP	<i>A. thaliana</i>	pBAT	NotI	diese Arbeit
AtFer1-100-EYFP	<i>A. thaliana</i>	pBAT	Ecl136II	diese Arbeit
AtFer1fl-EYFP	<i>A. thaliana</i>	pBAT	NotI	diese Arbeit
AtFer2TP-EYFP	<i>A. thaliana</i>	pBAT	NotI	diese Arbeit
AtFer2-100-EYFP	<i>A. thaliana</i>	pBAT	NotI	diese Arbeit
AtFer2fl-EYFP	<i>A. thaliana</i>	pBAT	XbaI	diese Arbeit

### 5.1.11 cDNA-Klone zur biolistischen Transformation

Alle Klone liegen im pRT- $\Omega$ /Not/Asc-Vektor (pRT100-Variante, Töpfer et al. (1987), Überlacker et al. (1996)) bzw. dessen Abwandlung mit zusätzlicher MCS (pRT- $\Omega$ /Not/Asc-MCS, Daniela Rödel) vor.

cDNA Klon	Vektor	Schnittstellen (*)	beschrieben in
AtFer1TP-EYFP	pRT- $\Omega$ /Not/Asc	BamHI/XbaI	diese Arbeit
AtFer1TPmut-EGFP	pRT- $\Omega$ /Not/Asc	BamHI/XbaI	diese Arbeit
AtFer1-100-EYFP	pRT- $\Omega$ /Not/Asc-MCS	BamHI/Ecl136II	diese Arbeit
		Vektor: BglII/SmaI	
AtFer1fl-EYFP	pRT- $\Omega$ /Not/Asc	BamHI/Ecl136II	diese Arbeit
		Vektor:	
		BamHI/XbaI (blunt)	
AtFer2TP-EYFP	pRT- $\Omega$ /Not/Asc-MCS	SmaI/XbaI	diese Arbeit
AtFer2-100-EYFP	pRT- $\Omega$ /Not/Asc-MCS	SmaI/XbaI	diese Arbeit
AtFer2fl-EYFP	pRT- $\Omega$ /Not/Asc-MCS	SmaI/XbaI	diese Arbeit

\* Zur Restriktion der Reporterfusionen aus dem pBAT-Vektor wurden die angegebenen Schnittstellen verwendet. Der pRT- $\Omega$ /Not/Asc-Vektor wurde, sofern nicht anders angegeben, mit denselben Restriktionsendonukleasen geschnitten.

### 5.1.12 Antikörper

Antikörper	Antigen (gerichtet gegen)	Verd.	MW (Antigen)	Beschreibung
$\alpha$ -GDCH	H-Untereinheit des Glycin Decarboxylase Komplexes	1:5000	17 kDa	Agrisera
$\alpha$ -Idh	Isocitratdehydrogenase	1:5000	45 kDa	Agrisera
$\alpha$ -VDAC1	<i>Voltage-dependent anion-selective channel protein1</i>	1:1000	29 kDa	Agrisera
$\alpha$ -CoxII	Cytochrom Oxidase	1:1000	30 kDa	Agrisera
$\alpha$ -33 kDa	33 kDa Protein (Spinat)	1:2000	14 kDa	Berghöfer (1998)
$\alpha$ -FNR	Ferredoxin-NADPH-Oxidoreduktase (Spinat)	1:2000	34 kDa	Berghöfer (1998)
$\alpha$ -SSU	<i>small subunit of Rubisco</i>	1:2000	33 kDa	Flügge

### 5.1.13 Pflanzenmaterial

Die verwendeten Spinatpflanzen (*Spinacia oleracea* L., Sorte „Lina“) wurden in einer ständig belüfteten Nährlösung (Nutzung von Aquariumpumpen) hydroponisch angezogen. Die Spinatkulturen wurden in einer Klimakammer unter kontrollierten Bedingungen angezogen: Kurztag (8 h Licht/16 h Dunkelheit) bei 20-25 °C. Geerntet wurden 3-4 Monate alte Pflanzen.

Nährlösung	Spuren
6 mM KNO <sub>3</sub>	46 $\mu$ M H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
4 mM Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	9 $\mu$ M MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O
2 mM MgSO <sub>4</sub>	0,77 $\mu$ M ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,32 $\mu$ M CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O
0,04 mM Fe-EDTA	0,12 $\mu$ M Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>
Spuren	

Erbsenkeimlinge (*Pisum sativum* L., Var. „*Feltham First*“) wurden unter Langtagbedingungen (16 h Licht/8 h Dunkelheit) auf Erde angezogen. Nach 8-12 Tagen wurden die jungen Erbsenpflanzen geerntet, zu diesem Zeitpunkt liegen die Blätter der Pflanzen größtenteils geschlossen vor.

## 5.2 Methoden

### 5.2.1 Molekularbiologische Methoden

Die folgenden Methoden wurden nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt: Ligation, Plasmidtransformation in *E. coli*, Isolierung von Plasmid-DNA (nach Birnboim (1979)), DNA-Restriktion, Agarosegelelektrophorese. Entsprechend den Angaben der jeweiligen Hersteller der Kits erfolgten die Plasmidpräparationen, DNA-Extraktionen und DNA-Sequenzierungen.

#### 5.2.1.1 Ferritine - Ursprung & Klonierung in den pBAT-Vektor

Die Ferritine wurden aus cDNA von *Arabidopsis thaliana* amplifiziert (AtFer1, AtFer2) oder beim RIKEN Institut als Vollängenklone erworben (AtFer3, AtFer4). Aufgrund schwacher Amplifikation wurden zwei PCR-Reaktionen durchgeführt, wobei der erste PCR-Ansatz das *template* für die zweite PCR bildete. In der ersten PCR-Reaktion wurden die 5'-Primer von AtFer1 und AtFer2 in Kombination mit M13 *forward* bzw. M13 *reverse* Primern eingesetzt. Für die zweite Reaktion wurde dann mit beiden spezifischen Primern amplifiziert. Die ca. 800 bp großen PCR-Fragmente wurden in den pGEM<sup>®</sup>-T Easy-Vektor ligiert.

Alle vier *Arabidopsis* Ferritine wurden in den pBAT-Vektor umkloniert, wobei nur Klone in T3→T7-Orientierung im Vektor ausgewählt wurden. Zunächst wurden die DNA-Fragmente mittels Restriktionsenzym ausgeschnitten, auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt, entsprechende Banden aus dem Gel ausgeschnitten und mittels Kit (Nucleo-Spin<sup>®</sup> Extract) eluiert. Die isolierten DNA-Fragmente wurden in den mit entsprechenden Enzymen geschnittenen pBAT-Vektor ligiert.

	Ursprung	Ausgangsvektor	verwendete Schnittstellen	
			Ausgangsvektor	pBAT
AtFer1	cDNA	pGEM <sup>®</sup> -T Easy	NotI	NotI
AtFer2	cDNA	pGEM <sup>®</sup> -T Easy	EcoRI	EcoRI
AtFer3	RIKEN (pda06814) RAFL09-74-H04	λFLC-1-B	SfiI (zu <i>blunt end</i> )	EcoRV
AtFer4	RIKEN (pda02944) RAFL06-09-H20	λZAPIII	SfiI (zu <i>blunt end</i> )	EcoRV

### 5.2.1.2 Klonierungsstrategie der Reporterproteininfusionen

Zunächst wurden mittels geeigneter Primer (Einführung von Schnittstellen) und PCR die Transitpeptide (TP), die ersten 100 Aminosäuren bzw. die Volllängenproteine (*full length*) von AtFer1 und AtFer2 amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden in den pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>-Vektor ligiert. Die DNA-Fragmente der verschiedenen Proteine wurden mit BamHI und NcoI (AtFer1) bzw. mit BglIII und NcoI (AtFer2) aus dem pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>-Vektor ausgeschnitten. Die so isolierten Fragmente wurden in den mit BamHI und NcoI verdauten pBAT::EYFP- bzw. pBAT::EGFP-Vektor direkt vor den Reporter ligiert. Dieser diente der Analyse des *in vitro* Importverhaltens der EYFP-/EGFP-Fusionen. Zur Untersuchung der *in vivo* Lokalisierung von AtFer1 und AtFer2 wurden die jeweiligen Fusionen mit geeigneten Schnittstellen aus dem pBAT ausgeschnitten und in einen Pflanzenexpressionsvektor (pRT-Ω/Not/Asc bzw. pRT-Ω/Not/Asc-MCS) kloniert (Abb. 5.1, Schnittstellen siehe Abschnitt 5.1.11).

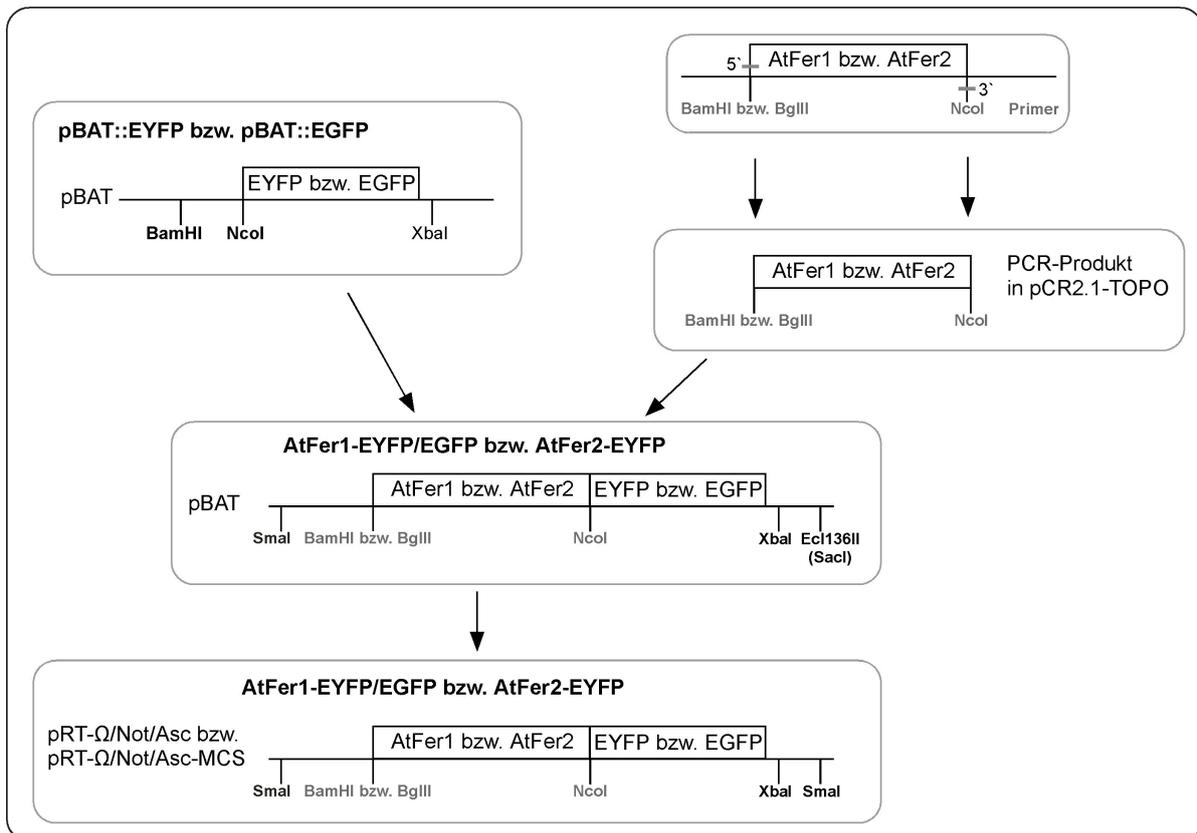


Abb. 5.1: Klonierungsstrategie der AtFer1- und AtFer2-Fusionsproteine.

### 5.2.1.3 *In vitro* Proteinsynthese

#### *In vitro* Transkription

Zunächst wurde das aus *E. coli* isolierte Plasmid (Midiprep, Abschnitt 5.1.3) hinter der eingebrachten cDNA mittels Restriktionsenzym linearisiert und anschließend mittels RNA-Polymerase transkribiert. Bis auf das Cytochrom c1 Protein (T7→T3) lagen alle Proteine in T3→T7-Orientierung im Vektor vor (siehe Abschnitt 5.1.10).

<b>5xNTP (reduziertes GTP)</b>	je 2,5 mM	ATP, CTP, UTP
	je 0,25 mM	GTP
<b>25xGTP</b>	je 11,25 mM	GTP
<b>CAP</b>	je 10 mM	m <sup>7</sup> G(5')ppp(5')G

Orientierung	T3→T7	T7→T3
H <sub>2</sub> O	3,3 $\mu$ l	7,8 $\mu$ l
5xT3-Puffer	5,0 $\mu$ l	-
5xT7-Puffer	-	5,0 $\mu$ l
5xNTP, red GTP	5,0 $\mu$ l	5,0 $\mu$ l
CAP (10 mM)	1,2 $\mu$ l	1,2 $\mu$ l
DTT (100 mM)	7,5 $\mu$ l	2,5 $\mu$ l
linearisierte DNA (1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	2,0 $\mu$ l	2,0 $\mu$ l
RNase-Inhibitor (50 U/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l
T3-RNA-Polymerase (50 U/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l	-
T7-RNA-Polymerase (20 U/ $\mu$ l)	-	1,0 $\mu$ l
Gesamtvolumen	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l

Der Transkriptionsansatz wurde bei 37 °C für 30-60 min inkubiert und nach Zugabe von 1  $\mu$ l 25xGTP für weitere 30 min (37 °C) inkubiert. Der Ansatz wurde dann mit sterilem Wasser auf 100  $\mu$ l aufgefüllt. Davon wurden zur Überprüfung der Transkription 4  $\mu$ l auf einem 1,4 % MOPS-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Der restliche Ansatz wurde gefällt (Zugabe von: 5  $\mu$ l Ammoniumcetat und 250  $\mu$ l 100 % Ethanol) und bei - 20 °C aufbewahrt.

#### *In vitro* Translation

Die zu untersuchenden Proteine wurden im zellfreien eukaryontischen Translationssystem (Retikulozytenlysat aus Kaninchen) in Anwesenheit von radioaktiv markierten Meth-

ionin ( $[^{35}\text{S}]$ -Met) synthetisiert. Für die Translationsreaktion wurde eine entsprechende Menge des gefällten Transkriptionsansatzes ( $5\ \mu\text{l}$  pro Translationsansatz) bei  $4\ ^\circ\text{C}$ , 30 min und 15 300 UpM (Rotor: 12154-H, Sigma 3K12) zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde getrocknet und mit dem Translationsansatz für 90 min bei  $30\ ^\circ\text{C}$  im Wasserbad inkubiert. Die Ansätze wurden entweder direkt verwendet oder bis zur Verwendung bei  $-80\ ^\circ\text{C}$  gelagert.

H <sub>2</sub> O (DEPC-behandelt)	4,35 $\mu\text{l}$
Retikulozytenlysate	6,25 $\mu\text{l}$
1 M KCl	0,90 $\mu\text{l}$
100 mM Aminosäuremix (minus Met)	0,25 $\mu\text{l}$
100 mM DTT	0,25 $\mu\text{l}$
$[^{35}\text{S}]$ -Met	0,50 $\mu\text{l}$
Gesamtvolumen	12,50 $\mu\text{l}$

## 5.2.2 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

### 5.2.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die denaturierende SDS-PAGE basiert auf dem von Laemmli (1970) entwickelten Verfahren. Zur Analyse wurden 10-15 %ige SDS-Gradientengele (Tab. 5.2) und SDS-Mini-Gele (12,5 %ig bzw. 15 %ig, Hoefer Gelsystem, Amershan, Tab. 5.2) eingesetzt.

30 % Acrylamidlösung	29,2 % (w/v)	Acrylamid
	0,8 % (w/v)	Methylenbisacrylamid
10 x SDS-Laufpuffer	250 mM	Tris
	1,95 M	Glycin
	1 %	SDS
4 x Laemmli-Probenpuffer	0,25 M	Tris/HCl pH 6,8
	8 % (w/v)	SDS
	40 % (w/v)	Glycerin
	20 % (w/v)	$\beta$ -Mercaptoethanol
	0,02 % (w/v)	Bromphenolblau

**Pipettierschema für ein Maxi-SDS-Gel.** Gradient: 10-15 %; Größe: 305 x 270 x 1 mm

	Trenngel 10 %	Trenngel 15 %	Sammelgel 5 %
H <sub>2</sub> O	15,4 ml	3,3 ml	13,9 ml
30 % Acrylamid	14,3 ml	20 ml	3,34 ml
2 M Tris/HCl pH 8,8	7,5 ml	7,5 ml	-
1 M Tris/HCl pH 6,8	-	-	2,5 ml
80 % Saccharose	2,4 ml	8,8 ml	-
10 % SDS	400 $\mu$ l	400 $\mu$ l	200 $\mu$ l
10 % APS	160 $\mu$ l	160 $\mu$ l	160 $\mu$ l
TEMED	16 $\mu$ l	16 $\mu$ l	16 $\mu$ l
Gesamtvolumen	40 ml	40 ml	20 ml

**Pipettierschema für je 4 Mini-SDS-Gele der Konzentrationen 15 % und 12,5 %.**

	Trenngel 15 %	Trenngel 12,5 %	Sammelgel 5 %
H <sub>2</sub> O	8,9 ml	11,4 ml	6,95 ml
30 % Acrylamid	15 ml	12,45 ml	1,67 ml
2 M Tris/HCl pH 8,8	5,6 ml	5,55 ml	-
1 M Tris/HCl pH 6,8	-	-	1,25 ml
10 % SDS	300 $\mu$ l	300 $\mu$ l	100 $\mu$ l
10 % APS	190 $\mu$ l	190 $\mu$ l	80 $\mu$ l
TEMED	19 $\mu$ l	19 $\mu$ l	8 $\mu$ l
Gesamtvolumen	30 ml	30 ml	10 ml

### 5.2.2.2 Native Gelsysteme

Für die nicht-denaturierende Gelelektrophorese von Organellproben zur Detektion höhermolekularer Proteinkomplexe kamen folgende native Gelsysteme zum Einsatz: *Blue Native-PAGE*, *Colorless Native-PAGE* und *Tris Glycine Native-PAGE*.

#### **Blue Native Gelelektrophorese (BN-PAGE)**

Für die BN-PAGE wurden Membranproteinkomplexe aus Organellen (Chloroplasten bzw. Mitochondrien) durch die Zugabe von Detergentien solubilisiert. Anschließend wurden diese im elektrischen Feld aufgetrennt. Für die Auftrennung der Chloroplastenproben wurde das BN-Gel mit dem Detergenz Digitonin versetzt. Aufgrund unterschiedlicher Detergentien für Mitochondrien und Chloroplasten wurde bei der Trennung von Mitochondrienproben bzw. Mitochondrien- und Chloroplastenproben auf die Zugabe dieser im Gel verzichtet. Ohne zusätzliches Detergenz entspricht die Zusammensetzung des BN-Gels einem CN-Gel.

Für die BN-PAGE wurden die pelletierten Organellproben (Chloroplasten, Mitochondri-

en bzw. Thylakoide und Mitochondrienmembranen) in Lysepuffer aufgenommen. Diesen Proben wurde ein Detergenz (Digitonin oder Dodecylmaltosid) zur Solubilisierung der Membranen zugesetzt und bei 4 °C, 1 h auf dem Rotator inkubiert. In einem sich anschließenden Zentrifugationsschritt wurden nicht-solubilierte Membranen abgetrennt (1 h bei 25 000 UpM [Beckmann Coulter, MLA-80 Rotor] bzw. 19 000 UpM [Sorvall Super T21, ST-Micro Rotor]). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 5  $\mu$ l 5% Coomassie G250 versetzt. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben auf einem BN-Gel über Nacht (Kühlraum) aufgetrennt.

<b>Organell</b>	<b>Organellen entsprechend</b>	<b>Lysepuffer</b>	<b>Detergenz</b>
Mitochondrien	100 $\mu$ g Protein	20 $\mu$ l	3 $\mu$ l 10 % Dodecylmaltosid
Chloroplasten	25 $\mu$ g Chlorophyll	15 $\mu$ l	7,5 $\mu$ l 5 % Digitonin
BN-Kathoden-Puffer	50 mM Tricin 15 mM Bistris 0,01 % Coomassie G250		
BN-Anoden-Puffer	50 mM Bistris/HCl, pH 7,0		
BN-Lysepuffer	50 mM Bistris/HCl, pH 7,0 1 M $\epsilon$ -Aminocaprinsäure 5 mM EDTA 0,5 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM PMSF (frisch zugeben) 1 mM DTT (frisch zugeben)		

### ***Colorless Native Gelelektrophorese (CN-PAGE)***

Die CN-PAGE ist eine Variante der BN-Gelelektrophorese und ist für die Trennung von löslichen Proteinen geeignet. Beide Elektrophoresemethoden sind nahezu identisch, mit der Ausnahme, dass das CN-Gel kein Digitonin enthält. Des Weiteren fehlt dem CN-Kathodenpuffer das bei der BN-PAGE verwendete Coomassie G250.



**Pipettierschema eines 5-13,5%igen TGN-Gels.** Größe: 200 x 200 x 1 mm.

	Trenngel 5 %	Trenngel 13,5 %	Sammelgel 4 %
H <sub>2</sub> O	5,3 ml	-	4,9 ml
2 M Tris/HCl pH 8,8	3,0 ml	3,0 ml	-
1 M Tris/HCl pH 6,8	-	-	1,2 ml
30 % Acrylamid	2,7 ml	7,2 ml	1,3 ml
2M $\epsilon$ -Aminocaprinsäure	4,0 ml	4,0 ml	2,5 ml
87 % (v/v) Glycerin	0,95 ml	1,7 ml	-
10 % APS	70 $\mu$ l	70 $\mu$ l	90 $\mu$ l
TEMED	7 $\mu$ l	7 $\mu$ l	9 $\mu$ l
Gesamtvolumen	16 ml	16 ml	10 ml

## 5.2.3 Western Blot Analyse

### 5.2.3.1 Elektrotransfer

Der Transfer der Proteine aus Polyacrylamidgelen auf die PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid) erfolgte mittels *SemiDry-Blot* Apparatur (OWL *Separation Systems*) entsprechend den Herstellerangaben (*Immobilon-P Transfer Membrane User Guide*).

Kathodenpuffer	25 mM (w/v)	Tris
(pH 9,4)	40 mM (w/v)	$\epsilon$ -Aminocaprinsäure
	10 % (v/v)	Methanol
	0,1 % (w/v)	SDS

Anodenpuffer I	0,3 M (w/v)	Tris
(pH 10,4)	10 % (v/v)	Methanol

Anodenpuffer II	25 mM (w/v)	Tris
(pH 10,4)	10 % (v/v)	Methanol

Auf die Anode wurden 2 Lagen Blotpapier (*Whatman*) in Anodenpuffer I getränkt und eine Lage Blotpapier in Anodenpuffer II getränkt geschichtet. Darauf folgte die PVDF-Membran, auf welche das in Kathodenpuffer inkubierte Gel gelegt wurde. Den Abschluß bildeten 3 Lagen in Kathodenpuffer getränktes Blotpapier. Die Transferzeit betrug 1,5 bis 2 Stunden bei 1,2 mA/cm<sup>2</sup>. Nach dem Transfer wurde die Membran getrocknet.

### 5.2.3.2 Antikörperbindung und ECL-Entwicklung (*enhanced chemiluminescence*)

10xPBS	750 mM	NaCl			
	30 mM	KCl			
	45 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O			
	15 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>			
Lösung I	5 % (w/v)	Magermilchpulver	Lösung II	0,05 % (v/v)	Tween <sup>®</sup> 20
	0,05 % (v/v)	Tween <sup>®</sup> 20		1x	PBS
	1x	PBS			

#### Pipettierschema der Entwicklerlösung zur ECL-Entwicklung.

	Volumen	Endkonzentration
1 M Tris/HCl pH 8,3	500 $\mu$ l	50 mM
250 mM Luminol (in DMSO)	50 $\mu$ l	1,25 M
250 mM Cumarsäure (in DMSO)	22 $\mu$ l	200 mM
8,8 M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3 $\mu$ l	2,7 mM (0,009 %)
H <sub>2</sub> O ( <i>ad</i> )	10 ml	

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für mindestens 2 Stunden in Lösung I inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (verdünnt in Lösung I) für 2 Stunden. Darauf folgten 4 Waschschrte mit Lösung I (je 5 min) und die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (anti-*Rabbit-IgG-horseradish peroxidase*-Konjugat, 1:30 000 verdünnt in Lösung I) für 1-2 Stunden. Erneut wurde die Membran 4 mal für je 5 min in Lösung II gewaschen. Die ECL-Entwicklerlösung (Tab. 5.2) wurde jeweils frisch hergestellt und die PVDF-Membran für eine Minute mit dieser inkubiert. Anschließend wurde die Membran in Folie eingeschlagen und in einer Filmkassette auf einem ECL-Film (Hyperfilm-ECL, Amershan Biosciences) für 10-20 min exponiert. Der Film wurde entwickelt (Entwickler und Fixierer von Sigma-Aldrich) und getrocknet.

## 5.2.4 Färbemethoden

### 5.2.4.1 Coomassie Färbung

Färbelösung	45 % (v/v)	Methanol	Entfärber	20 % (v/v)	Methanol
	9 % (v/v)	Essigsäure		7 % (v/v)	Essigsäure
	0,4 % (w/v)	Coomassie G-250			

Die Färbung der Gele erfolgte für mindestens 30 min bei RT. Anschließend wurden die Gele so lange mit Entfärber inkubiert bis die Proteinbanden gut erkennbar waren. Der Entfärber wurde dafür mehrfach gewechselt. Mit radioaktiven Proben beladene Gele, wurden für die Detektion der Proteinbanden für ca. 2 h bei 80 °C im Vakuum getrocknet und dann auf einer Phosphorimagerplatte (Fujifilm) exponiert. Die so generierten Autoradiogramme wurden mit Hilfe des Phosphorfluoroimagers Fujifilm FLA-3000 und dem Programm AIDA (*advanced image data analyser*, Raytest/Fujifilm) ausgelesen.

#### 5.2.4.2 Coomassie-Colloidal-Färbung

**Lösung A**      2 % (v/v) *ortho*-Phosphorsäure  
                  10 % (w/v) Ammoniumsulfat

**Lösung B**      5 % (w/v) Coomassie G250

**Fixierer**        40 % (v/v) Methanol  
                  10 % (v/v) Essigsäure

**Färbelösung** 98 % (v/v) Lösung A  
                  2 % (v/v) Lösung B

Die Färbelösung wurde einige Stunden (besser über Nacht) gerührt. Das Gel wurde für mindestens 1 Stunde bei RT im Fixierer inkubiert. Anschließend wurde das Gel in einer Lösung bestehend aus 80 % (v/v) Färbelösung und 20 % (v/v) Methanol für mindestens 4 Stunden (besser über Nacht) gefärbt. Die Entfärbung erfolgt mit bidestiliertem Wasser, welches mehrfach gewechselt wurde. Stärkere Färbungen können mit 20 % (v/v) Methanol entfärbt werden.

#### 5.2.4.3 Silberfärbung

Die verwendete Methode zur Silberfärbung von Polyacrylamidgelen ist in der Arbeit von Molik (2005) beschrieben.

### 5.2.5 Isolierung pflanzlicher Organellen

#### 5.2.5.1 Präparation von Chloroplasten aus *Spinacia oleracea* (Spinat)

Die Isolierung von Chloroplasten aus Spinat ist bei Molik (2005) beschrieben. Die Reinigung der grob angereicherten Chloroplasten wurde durch einen Percollstufengradienten erreicht. Dieser bestand aus einer 85 %igen und einer 45 %igen Percollschicht. Nach Zentrifugation befanden sich die intakten Organellen in der Grenzschicht von 85 %igen und

45%igen Percoll. Die Bestimmung der Konzentration der isolierten, intakten Chloroplasten ist in Abschnitt 5.2.5.5 erläutert.

### 5.2.5.2 Präparation von Chloroplasten aus *Pisum sativum* (Erbse)

Die Isolierung von Erbsenchloroplasten ähnelt sehr stark der Präparation aus Spinatpflanzen und ist in der Arbeit von Molik (2005) ausführlich geschildert. Folgende Veränderung wurde vorgenommen: der einstufige Percollgradient wurde analog zur Chloroplastenisolierung aus Spinat in einen zweistufigen verändert. So dass dieser aus einer 80%igen und einer 35%igen Percollschicht besteht und die intakten Chloroplasten sich nach Zentrifugation in der Grenzschicht zwischen den beiden sammeln. Die Bestimmung der Organellkonzentration ist in Abschnitt 5.2.5.5 beschrieben.

### 5.2.5.3 Parallelpräparation von Mitochondrien und Chloroplasten aus *Pisum sativum* (Erbse)

#### Lösungen

<b>Extraktionspuffer (EB)</b>	450 mM	Saccharose
(Mitochondrien)	15 mM	MOPS
	1,5 mM	EGTA-KOH pH 7,2
pH 7,4 mit KOH einstellen, autoklavieren und bei 4 °C lagern		
frisch zusetzen:	0,6 %	PVP
	0,2 %	BSA
	10 mM	DTT
	0,2 mM	PMSF
<b>Waschpuffer (WB)</b>	300 mM	Saccharose
(Mitochondrien)	10 mM	MOPS
	1 mM	EGTA-KOH pH 7,2
pH 7,2 mit KOH einstellen, autoklavieren und bei 4 °C lagern		
frisch zusetzen:	0,2 mM	PMSF
<b>Resuspensionspuffer (RB)</b>	400 mM	Mannitol
(Mitochondrien)	10 mM	Tricin-KOH pH 7,2
	1 mM	EGTA-KOH pH 7,2
pH 7,2 mit KOH einstellen, autoklavieren und bei 4 °C lagern		
frisch zusetzen:	0,2 mM	PMSF

<b>5xGradientenpuffer</b>		1,5 M	Saccharose		
(Mitochondrien)		50 mM	MOPS		
pH 7,2 mit KOH einstellen, autoklavieren und bei 4 °C lagern					
<b>5xSRM (Chloroplasten)</b>		1,65 M	Sorbitol		
(Sorbitolresuspensionsmedium)		250 mM	HEPES/KOH pH 8,0		
<b>Percollstufen</b>	Stufe	<b>18 %</b>	<b>23 %</b>	<b>40 %</b>	
(Mitochondrien, Erbse)	5xGradientenpuffer	4 ml	4 ml	4 ml	
	Percoll	3,7 ml	4,7 ml	8 ml	
	dH <sub>2</sub> O	12,3 ml	11,3 ml	8 ml	
	Volumen	20 ml	20 ml	20 ml	
<b>Percollstufen</b>	Stufe	<b>35 %</b>	<b>80 %</b>		
(Chloroplasten, Erbse)	Percoll	17,5 ml	40 ml		
	5xSRM	10 ml	10 ml		
	dH <sub>2</sub> O	22,5 ml	-		
	Volumen	50 ml	50 ml		

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis bzw. im Kühlraum durchgeführt. Die Lösungen, Zentrifugen und Rotoren wurden ebenfalls vorgekühlt verwendet. Um eine Zerstörung der Organellen zu vermeiden, wurden nur abgeschnittene Pipettenspitzen zum pipettieren verwendet. Für die Isolierung wurden 40 g Erbsenpflanzen (8-12 d alt) mit 250 ml EB im *Waring Blender* zerkleinert (mehrere Pulse für 2-3 Sekunden). Das Homogenat wurde anschließend über 2 Lagen Miracloth (100  $\mu$ m Porengröße, Calbiochem, LA Jolla, USA) und eine Lage Nylongewebe (31  $\mu$ m Porengröße) filtriert. Das resultierende Filtrat wurde anschließend für 5 min bei 2 000 g (SLC-250T-Rotor, Sorvall Super T21) zentrifugiert. Im Sediment befanden sich die Chloroplasten und im Überstand die Mitochondrien. Das Pellet wurde für die parallel stattfindende Chloroplastenpräparation verwendet und entsprechend der Chloroplastenisolierung (Abschnitt 5.2.5.2, ab dem Pellet des ersten Zentrifugationsschrittes) weiter aufgearbeitet. Der Überstand (Mitochondrien) wurde zunächst für 5 min bei 6 000 g und der dabei erhaltene Überstand für weitere 10 min bei 16 000 g zentrifugiert. Das erhaltene Pellet enthielt die grob angereicherten Mitochondrien und wurde mit Hilfe eines Pinsels vorsichtig in 2 ml WB resuspendiert. In zwei 30 ml Corex-Röhrchen wurde ein dreistufiger Gradient, bestehend aus 6 ml 40 %, 8 ml 23 % und 6 ml 18 % Percoll vorgelegt. Die Mitochondriensuspension wurde nun vorsichtig auf die Gradienten aufgetragen und für 45 min bei 12 000 g zentrifugiert (ausgeschaltete Bremse ab 5000 g, ST-H50, Sorvall Super T21). Die intakten Mitochondrien befanden sich in der Grenzschicht von 40%igen und 23%igen Percoll und wurden in einen mit 100 ml RB vorgelegten 250 ml Zentrifugenbecher überführt. Anschließend wurden die Mitochon-

drien bei 10 000 UpM für 15 min pelletiert (SLC-250T-Rotor, Sorvall Super T21). Der Überstand wurde vorsichtig abgossen (sehr lockeres Pellet), das Pellet in RB gelöst und in zwei 30 ml Corexröhrchen überführt. Die Mitochondrien wurden weitere 15 min bei 10 000 UpM (SL-50T-Rotor, Sorvall Super T21) sedimentiert, dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Das Mitochondrienpellet wurde in 1 ml RB resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß transferiert. Die Mitochondrien wurden abschließend in einer Tischzentrifuge (Biofuge, Heraeus) pelletiert und in 200-300  $\mu$ l RB aufgenommen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte wie in Abschnitt 5.2.5.5 erläutert.

#### 5.2.5.4 Parallelpräparation von Mitochondrien und Chloroplasten aus *Spinacia oleracea* (Spinat)

Für die Isolierung von Organellen aus Spinat wurden ca. 30 g Spinatblätter am Vortag geerntet und über Nacht im Dunkeln gelagert. Sowohl die Mittelrippe als auch der Stiel wurden vor dem Aufschluss entfernt. Die Isolierung erfolgte analog der Parallelpräparation aus Erbse (Abschnitt 5.2.5.3). Das im ersten Zentrifugationsschritt erhaltene Pellet wurde für die Spinatchloroplastenisolierung eingesetzt und der Überstand für die Präparation der Mitochondrien. Die Spinatchloroplasten wurden entsprechend der in Abschnitt 5.2.5.1 beschriebenen Methode isoliert. Die Mitochondrienpräparation unterschied sich in der Zusammensetzung des Percollstufengradienten. Für Spinatmitochondrien wurde ein Gradient bestehend aus 5 ml 45 %, 12 ml 25 % und 5 ml 5 % Percoll verwendet. Die Proteinbestimmung der finalen Mitochondriensuspension ist in Abschnitt 5.2.5.5 beschrieben.

<b>Homogenisationsmedium</b>	0,33 M	Sorbitol		
(Chloroplasten, Spinat)	50 mM	HEPES/KOH pH 7,6		
	2 mM	EDTA		
	1 mM	MgCl <sub>2</sub>		
	1 mM	MnCl <sub>2</sub>		
frisch zugeben:	5 mM	Na-Ascorbat		
<b>PBF-Percoll-Stammlösung</b>	3 % (w/v)	PEG 6000		
(gelöst in Percoll)	1 % (w/v)	BSA		
(Chloroplasten, Spinat)	1 % (w/v)	Ficoll 4000		
<b>Percollstufen</b>	Stufe	<b>5 %</b>	<b>25 %</b>	<b>45 %</b>
(Mitochondrien, Spinat)	5xGradientenpuffer	10 ml	10 ml	10 ml
	Percoll	2,5 ml	12,5 ml	22,5 ml
	dH <sub>2</sub> O	37,5 ml	27,5 ml	17,5 ml
	Volumen	50 ml	50 ml	50 ml

Percollstufen	Stufe	45 %	85 %
(Chloroplasten, Spinat)	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 $\mu$ l	120 $\mu$ l
	1 M MgCl <sub>2</sub>	50 $\mu$ l	30 $\mu$ l
	dH <sub>2</sub> O	24,8 ml	2,8 ml
	Volumen	50 ml	30 ml

### 5.2.5.5 Bestimmung der Organellkonzentration

#### Chlorophyllbestimmung von Chloroplastensuspensionen

Je 10  $\mu$ l Chloroplastensuspension wurden mit 990  $\mu$ l 80 % Aceton gemischt. Diese Lösung wurde bei 13 000 UpM 5 min zentrifugiert. Die Absorption des erhaltenen Überstandes wurde bei 663 nm und 645 nm im Photometer (Shimadzu UV-1602) gemessen und die Chlorophyllkonzentration nach der Formel (1) berechnet.

$$(1) \quad c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = (A_{663\text{nm}} \times 8,02 + A_{645\text{nm}} \times 20,2)/10$$

#### Proteinbestimmung von Mitochondriensuspensionen

Zur Bestimmung der Mitochondrienkonzentration wurde der Proteingehalt nach Bradford bestimmt. Dazu wurde 1  $\mu$ l Mitochondriensuspension in 99  $\mu$ l 1 M Harnstoff und 700  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O gegeben. Diese Mischung wurde 1 min bei 13 000 UpM (Biofuge/Heraeus) zentrifugiert und der Überstand mit 200  $\mu$ l Bradford-Reagenz (*dye reagent*, Biorad) versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation wurde die Absorption bei 595 nm im Spektrophotometer gemessen (Shimadzu UV-1602). Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe einer Eichgeraden (BSA als Standard).

## 5.2.6 *In vitro* Importexperimente mit isolierten Organellen

### 5.2.6.1 Lösungen für *in vitro* Importexperimente in Mitochondrien und Chloroplasten

5xSRM (Chloroplasten)	1,65 M	Sorbitol
(Sorbitolresuspensionsmedium)	250 mM	HEPES/KOH pH 8,0

<b>2xDualimportpuffer</b> (pH 7,4) (Mitochondrien/Chloroplasten)	600 mM 30 mM 10 mM 0,1 %	Saccharose HEPES KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> BSA
<b>HM</b> (Chloroplasten)	10 mM 5 mM	HEPES/KOH pH 8,0 MgCl <sub>2</sub>
<b>SRME (HME) 10 bzw. 50</b>	SRM (HM) Puffer mit 10 bzw. 50 mM EDTA	
<b>Resuspensionspuffer (RB)</b> (pH 7,2) (Mitochondrien)	400 mM 10 mM 1 mM 0,2 mM	Mannitol Tricin-KOH pH 7,2 EGTA-KOH pH 7,2 PMSF (frisch zugeben)
<b>SFB</b> (Mitochondrien) (pH 7,4)	10 mM 60 mM 1 mM	HEPES Saccharose PMSF
<b>SFBE</b>	SFB Puffer mit 10 mM EDTA	
<b>35 % Percollkissen</b> Chloroplasten	3,5 ml 2,0 ml 4,5 ml	Percoll 5xSRM H <sub>2</sub> O
<b>4 % Percollkissen</b> (Dualimport-Trennung der Organellen)	0,4 ml 2,0 ml 7,6 ml	Percoll 5xGradientenpuffer dH <sub>2</sub> O
<b>Thermolysin-Lösung</b>	2 mg/ml 25 mM	Thermolysin CaCl <sub>2</sub>
<b>Dual-Mastermix</b> (frisch herstellen) (Mitochondrien/Chloroplasten)	1x 4 mM 4 mM 4 mM 4 mM 0,2 mM 5 mM 4,5 mM 10 mM 10 mM	Dualimportpuffer MgCl <sub>2</sub> Methionin ATP GTP ADP Malat DTT K-Acetat NaHCO <sub>3</sub>

### 5.2.6.2 Standard-Chloroplastenimport

Standardansatz	$x \mu\text{l}$	Chloroplastensuspension (50 $\mu\text{g}$ Chlorophyll entsprechend)
	$y \mu\text{l}$	1xSRM
	1,5 $\mu\text{l}$	100 mM ATP
	3,0 $\mu\text{l}$	250 mM Methionin
	12,5 $\mu\text{l}$	<i>in vitro</i> Translationsansatz
	150 $\mu\text{l}$	Gesamtvolumen

Die Inkubation der Importansätze erfolgte für 20 min bei 25 °C im belichteten Wasserbad. Durch Zugabe von 1 ml eiskaltem 1xSRM wurde die Importreaktion abgestoppt. Die Pipettenspitzen wurden für die folgenden Schritte (bis zur Lyse der Chloroplasten) in abgeschnittener Form eingesetzt. Die Chloroplasten wurden für 3 min bei 6 000 UpM (4 °C, Biofuge Heraeus) sedimentiert und das Pellet in 250  $\mu\text{l}$  1xSRM resuspendiert. Zum Abbau der nicht-importierten Proteine, wurde die Chloroplastensuspension mit 25  $\mu\text{l}$  Thermolysin-Lösung (2 mg/ml in 25 mM  $\text{CaCl}_2$ ) versetzt und für 30-40 min auf Eis inkubiert. Die Proteasebehandlung wurde durch die Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  SRME50 gestoppt. Diese Suspension wurde auf ein 35%iges Percollkissen (500  $\mu\text{l}$ ) geschichtet und bei 8 000 UpM für 8 min zentrifugiert. Dadurch konnten die intakten (Pellet am Boden) von den Organelltrümmern (Überstand) getrennt werden. Nach Entfernung dieser, wurde das Pellet mit 900  $\mu\text{l}$  SRME10 gewaschen und anschließend die Chloroplasten abzentrifugiert (3 min, 6 000 UpM). Dieses Chloroplastenpellet wurde durch Resuspendieren in 75  $\mu\text{l}$  HME10 und Inkubation auf Eis (10 min) osmotisch lysiert. Ein folgender Zentrifugationsschritt (5 min, 13 000 UpM) trennte das freigesetzte Stroma (Überstand) von den Thylakoiden (Pellet). Das abgenommene Stroma wurde mit 25  $\mu\text{l}$  4xLaemmli-Probenpuffer versetzt (Stroma-Fraktion). Die Thylakoide wurden zur Entfernung des restlichen Stroma in 200  $\mu\text{l}$  HM gewaschen (Zentrifugation 5 min, 13 000 UpM). Das in weiteren 200  $\mu\text{l}$  gelöste Thylakoidpellet wurde auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt. Eine Hälfte blieb unbehandelt (T- Fraktion), die andere (100  $\mu\text{l}$ ) wurde einer Proteasebehandlung unterzogen (10  $\mu\text{l}$  der Thermolysin-Lösung, 30-40 min Inkubation auf Eis). Zum Abstoppen der Reaktion wurden 20  $\mu\text{l}$  HME50 zugegeben. Beide Thylakoidfraktionen wurden abschließend sedimentiert (5 min, 13 000 UpM) und die Sedimente in je 50  $\mu\text{l}$  2xLaemmli-Probenpuffer (+ 20 mM EDTA) resuspendiert. Alle Fraktionen wurden für 5 min bei 100 °C denaturiert und von jeder Fraktion 25  $\mu\text{l}$  (entsprechend 12,5  $\mu\text{g}$  Chlorophyll) auf ein SDS-Gradientengel aufgetragen.

### 5.2.6.3 Stromaextrakt - Isolierung und Inkubation

Ein definiertes Volumen einer Chloroplastensuspension wurde 2 min bei 13 000 UpM (Biofuge/Heraeus) zentrifugiert. Das Chloroplastenpellet wurde in HM-Puffer aufgenommen, so dass die Chlorophyllkonzentration  $0,75 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  betrug. Diese Suspension wurde zur Lyse der Plastiden für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Thylakoide abzentrifugiert (5 min, 13 000 UpM) und der Überstand (Stroma) in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Das Stroma ( $40 \mu\text{l}$  mit  $2,7 \mu\text{l}$  HM-Puffer) wurde mit  $1,5 \mu\text{l}$  Translation für 20 min auf Eis ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) bzw. bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  im Licht inkubiert. Durch die Zugabe von  $15,8 \mu\text{l}$  4xLaemmli-Probenpuffer und Denaturierung der Proben für 5 min bei  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  wurde die Inkubation der Translation abgestoppt. Jeweils  $30 \mu\text{l}$  wurden auf einem SDS-Gradientengel elektrophoretisch aufgetrennt.

### 5.2.6.4 Importe - Einzelorganellansatz und gemischter Organellansatz

Für die Importversuche wurde die Konzentration der Organellen auf:

- Mitochondrien  $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  Proteingehalt
- Chloroplasten  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  Chlorophyllgehalt

eingestellt.

Der Importansatz mit den gemischten Organellen wurde nach Rudhe et al. (2002a) und die Einzelimportansätze analog dazu durchgeführt. Um eine Zerstörung der Organellen durch Scherkräfte zu vermeiden, wurden zum Pipettieren intakter Organellen abgeschnittene Pipettenspitzen verwendet. Alle Arbeitsschritte, außer der Importreaktion im Licht, erfolgten auf Eis. Die verwendeten Lösungen und Zentrifugen waren vorgekühlt. Die Organellen wurden mit dem Dual-Mastermix und dem *in vitro* translatierten Protein im Licht bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  für 30 min im belichteten Wasserbad inkubiert.

Ansatz	Mitochondrien-einzelimport (M)	gemischter Import (CM)	Chloroplasten-einzelimport (C)
Mitochondrien ( $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	$10 \mu\text{l}$	$10 \mu\text{l}$	-
Chloroplasten ( $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	-	$25 \mu\text{l}$	$25 \mu\text{l}$
<i>in vitro</i> Translationsansatz	$10 \mu\text{l}$	$10 \mu\text{l}$	$10 \mu\text{l}$
Dual-Mastermix	<u><math>90 \mu\text{l}</math></u>	<u><math>65 \mu\text{l}</math></u>	<u><math>75 \mu\text{l}</math></u>
<b>Gesamtvolumen</b>	$110 \mu\text{l}$	$110 \mu\text{l}$	$110 \mu\text{l}$

Die Importreaktion wurde durch Zugabe von 90  $\mu$ l 1xDualimportpuffer abgestoppt. Im Einzelimportexperiment (M, C) wurden die Organellen nach dem Abstoppen abzentrifugiert.

Die Organellen wurden stets bei folgenden Geschwindigkeiten sedimentiert:

- Mitochondrien 15 min, 13 000 UpM
- Chloroplasten 3 min, 6 000 UpM

und anschließend in 200  $\mu$ l 1xDualimportpuffer wieder resuspendiert. Dies erfolgte nur, wenn Einzelimportansätze (M, C) durchgeführt wurden. Der Organellansatz (M, C, CM) von 200  $\mu$ l wurde nun in zwei 100  $\mu$ l Ansätze geteilt. Ein Organellansatz (M+, C+, CM+) wurde mit Protease behandelt (Zugabe von 10  $\mu$ l Thermolysinlösung) und 30-40 min auf Eis inkubiert. Dagegen blieb der andere Ansatz unbehandelt (M-, C-, CM-). Die Thermolysinreaktion wurde durch die Zugabe von 4  $\mu$ l 0,5 M EDTA abgestoppt. Die Organellproben der Einzelimportexperimente (M-, M+, C-, C+) wurden anschließend zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Mitochondrien bzw. Chloroplasten in je 400  $\mu$ l RB- bzw. SRM-Puffer resuspendiert. Diesem Waschschritt folgte ein Zentrifugationsschritt und die sich anschließende Aufnahme der Sedimente in 20  $\mu$ l 2x Laemmli-Probenpuffer (+ 20 mM EDTA). Diese wurden für 5 min bei 100 °C denaturiert und die gesamte Probe (entsprechend 50  $\mu$ g Protein bzw. 12,5  $\mu$ g Chlorophyll) auf ein SDS-Gradientengel aufgetragen.

Die Organellen des gemischten Importansatzes (CM-, CM+) mussten nach Thermolysinbehandlung wieder voneinander getrennt werden. Dazu wurden die Fraktionen (CM-, CM+) auf ein 4%iges Percollkissen (500  $\mu$ l) geladen und für 30 sek bei 8 000-9 000 UpM zentrifugiert. Die Chloroplasten (C<sub>g</sub>-, C<sub>g</sub>+) befanden sich am Boden des Reaktionsgefäßes (lockeres Pellet) und die Mitochondrien (M<sub>g</sub>-, M<sub>g</sub>+) lagen auf dem Percollkissen auf. Der mitochondrienhaltige Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Sowohl die Mitochondrien- als auch die Chloroplastenproben des gemischten Importansatzes wurden entsprechend dem Einzelorganellimport in den entsprechenden Puffern gewaschen und die Organellpellets in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen (siehe Einzelimportproben).

### 5.2.6.5 Modifizierung der Importexperimente

#### Licht/Dunkel

Bei diesem Experiment wurde die Lichtabhängigkeit des Chloroplastenimportes (Bildung von ATP für den Transport) ausgenutzt. Der Import erfolgte unter Standardbedingungen (Einzelimportexperiment siehe Abschnitt 5.2.6.4) mit folgenden Änderungen: Die

Importreaktion fand entweder im Licht oder im Dunkeln bei 25 °C für 5 bzw. 15 min statt.

### Valinomycin

Valinomycin inhibiert den Mitochondrienimport und wurde wie folgt eingesetzt: Die Valinomycin-Stammlösung (10 mM Valinomycin in 100 % Ethanol) wurde mit 1xDualimportpuffer auf 100  $\mu\text{M}$  (1 % Ethanol) verdünnt. Für den Import in Anwesenheit von Valinomycin wurden 1,1  $\mu\text{l}$  der 100  $\mu\text{M}$  Lösung bzw. als Kontrolle 1,1  $\mu\text{l}$  1 % Ethanollösung mit den Organellen (Einzelimportexperiment siehe Abschnitt 5.2.6.4) für 30 min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe der Translation wurde die Importreaktion gestartet (Volumen von 111,1  $\mu\text{l}$ ). Der Import erfolgte wie im Einzelimportexperiment beschrieben (Abschnitt 5.2.6.4).

### Kompetition

Die Kompetitionsexperimente wurden mit dem überexprimierten 33 kDa Protein (gelöst in 7 M Harnstoff) durchgeführt. Die Konzentration des 33 kDa Proteins im Importansatz lag bei 1  $\mu\text{M}$ . Die Kompetitorlösung (200  $\mu\text{M}$ ) wurde schrittweise in 1xDualimportpuffer verdünnt, so dass diese Kompetitorlösung eine Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  bei einer Harnstoffmenge von 1,25 M aufwies.

Konzentration	0 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$
25 $\mu\text{M}$ 33 kDa Kompetitor	-	4,64 $\mu\text{l}$
1,25 M Harnstoff	6 $\mu\text{l}$	1,36 $\mu\text{l}$
Volumen	6 $\mu\text{l}$	6 $\mu\text{l}$

Diese 6  $\mu\text{l}$  Kompetitormix wurden zusammen mit der Translation im Reaktionsgefäß vorgelegt. Anschließend wurde zunächst der Dual-Mastermix und dann die Organellen entsprechend einem Einzelorganellimportexperiment (siehe Abschnitt 5.2.6.4) zugegeben. Der Ansatz mit Harnstoff diente als Kontrolle und wurde mit dem Kompetitoransatz verglichen. Der Import und die Probenaufarbeitung erfolgte analog dem Standardimport (siehe Abschnitt 5.2.6.4). Die Harnstoffmenge im Importexperiment betrug 65 mM.

#### 5.2.6.6 Fraktionierung der Organellen nach Einzelorganellimport

Der Aufschluss der Organellen erfolgte entweder durch osmotische Lyse (Chloroplasten) oder durch Gefrier-/Tau-Zyklen (Mitochondrien). Im Anschluss wurden durch Zentrifugation die Membranen von den löslichen Fraktionen getrennt. Dazu wurden Einzelorganellimportexperimente durchgeführt. Die eingesetzten Mengen wurden an das Experiment angepaßt. So wird pro Organellprobe für die SDS-PAGE 50  $\mu\text{g}$  Protein bzw.

12,5  $\mu\text{g}$  Chlorophyll benötigt (1,5 facher Standardimport, Abschnitt 5.2.6.4). Für eine zusätzliche native Trennung wurden 100  $\mu\text{g}$  Protein bzw. 25  $\mu\text{g}$  Chlorophyll auf ein BN-Gel geladen, so dass für den Import ein 3,5 facher Ansatz verwendet wurde (Abschnitt 5.2.6.4).

Nach dem ersten Zentrifugationsschritt (siehe Abschnitt 5.2.6.4) wurden die Pellets der Organellen in 300  $\mu\text{l}$  (1,5 facher Ansatz) bzw. 700  $\mu\text{l}$  (3,5 facher Ansatz) Dualimportpuffer resuspendiert. Je 100  $\mu\text{l}$  (50  $\mu\text{g}$  Protein bzw. 12,5  $\mu\text{g}$  Chlorophyll) entsprechend M- bzw. C- wurden abgenommen, zentrifugiert und in 2xLaemmli-Probenpuffer (+ 20 mM EDTA) aufgenommen. Die restlichen Organellen wurden mit 20 bzw. 60  $\mu\text{l}$  Thermolysinlösung versetzt und 30-40 min auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde mit der entsprechenden Menge 0,5 M EDTA (10 bzw. 30  $\mu\text{l}$ ) abgestoppt und die Organellen abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 bzw. 300  $\mu\text{l}$  RB (Mitochondrien) oder SRM (Chloroplasten) aufgenommen. Je 50  $\mu\text{l}$  der Protease-behandelten Organellen (M+, C+) wurden für die SDS-PAGE abgenommen und entsprechend der Proben von M- und C- denaturiert. Des Weiteren wurden beim 3,5 fachen Ansatz 100  $\mu\text{l}$  Organellen (entsprechend 100  $\mu\text{g}$  Protein bzw. 25  $\mu\text{g}$  Chlorophyll) für die BN-PAGE abgenommen. Die verbleibenden Organellen (50 bzw. 150  $\mu\text{l}$ ) wurden zur Fraktionierung dieser eingesetzt. Die 150  $\mu\text{l}$  Organellen des 3,5 fachen Ansatzes wurden in Proben zur SDS-PAGE (50  $\mu\text{l}$ ) und BN-PAGE (100  $\mu\text{l}$ ) aufgeteilt.

Die verwendete osmotische Lyse der Chloroplasten ist angelehnt an den Standardchloroplastenimport (Abschnitt 5.2.6.2). Dabei wurden die abzentrifugierten, Protease-behandelten Chloroplasten in 25  $\mu\text{l}$  (SDS-Proben) bzw. 50  $\mu\text{l}$  HME10-Puffer (BN-Proben) aufgenommen und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 13 000 UpM wurde der Überstand (Stroma) abgenommen und entweder mit 10  $\mu\text{l}$  4xLaemmli-Probenpuffer (SDS-PAGE) bzw. mit 10  $\mu\text{l}$  4xCN-Probenpuffer (BN-PAGE) versetzt. Das Pellet (Thylakoide) wurde in 20  $\mu\text{l}$  2xLaemmli-Probenpuffer (+20 mM) resuspendiert. Die Proben der BN-PAGE (C+, Thylakoide) wurden in 15  $\mu\text{l}$  BN-Lysepuffer resuspendiert und mit 7,5  $\mu\text{l}$  5 % Digitonin versetzt. Im Anschluss wurden die Membranen bei 4 °C auf dem Rotator für 1 h solubilisiert. Nicht-solubilierte Membranen wurden in einem Zentrifugationsschritt von 1 h bei 25 000 UpM (Beckmann Coulter, MLA-80 Rotor) bzw. 19 000 UpM (Sorvall Super T21, ST-Micro Rotor) abgetrennt. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, mit 5  $\mu\text{l}$  5 % Coomassie G250 versetzt und nach 10 minütiger Inkubation wurden die Proben auf einem BN-Gel über Nacht (Kühlraum) aufgetrennt.

Die Mitochondrienproben wurden abzentrifugiert und die Pellets in 5  $\mu\text{l}$  (SDS-PAGE) bzw. 10  $\mu\text{l}$  SFBE-Puffer (BN-PAGE) resuspendiert. Zum Aufschluss der Mitochondrien wurden diese 3 Gefrier-/Tau-Zyklen in flüssigem Stickstoff unterzogen. Die Trennung

der Membranen von den löslichen Bestandteilen erfolgte mittels Zentrifugation (20 min, 55 000 UpM, Beckmann Coulter, MLA-80 Rotor). Die Überstände (SF-lösliche Fraktion) wurden analog dem Stroma mit Laemmli- bzw. CN-Probenpuffer versetzt. Die Pellets (MF-Membranfraktion) für die SDS-PAGE wurden mit 20  $\mu$ l 2xLaemmli-Probenpuffer (+20 mM EDTA) versetzt. Die Proben der BN-PAGE (M+, MF) wurden in 20  $\mu$ l BN-Lysepuffer aufgenommen und durch Zugabe von 3  $\mu$ l 10 % Dodecylmaltosid solubilisiert. Die weitere Aufarbeitung (Rotator, Zentrifugation, Probenaufnahme) entspricht der der plastidären BN-Proben (C+, Thylakoide).

### 5.2.7 Biolistische Transformation von Blattgewebe

---

#### verwendete Materialien

---

autoklavierte Träger

Agar-Platten                      2 % (w/v)

Goldpartikel                      0,6  $\mu$ m Durchmesser

---

Die Goldpartikel-Suspension wurde immer frisch präpariert. Dazu wurden 2 mg Goldpartikel dreimal in 100 % EtOH (1 ml) gewaschen (Zentrifugation: 15-20 sek bei 13 000 UpM, Biofuge, Heraeus) und anschließend in 33,3  $\mu$ l sterilem bidestilliertem Wasser aufgenommen. Die Konzentration der eingesetzten Plasmid-DNA wurde auf 300 ng/ $\mu$ l eingestellt.

#### Präzipitationsansatz für eine Transformation (2,5 $\mu$ l):

Lösung	Volumen
60 $\mu$ g/ $\mu$ l Gold	3,3 $\mu$ l
300 ng/ $\mu$ l DNA-Plasmid	1,3 $\mu$ l
2,5 M CaCl <sub>2</sub>	4,0 $\mu$ l
0,1 M Spermidin	1,0 $\mu$ l
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>9,6 <math>\mu</math>l</b>

Der dargestellte Fällungsansatz wurde sorgfältig gemischt und bei RT 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Goldpartikel sedimentiert und 7,1  $\mu$ l des Überstandes (9,6  $\mu$ l) abgenommen. Die Goldpartikel wurden in den restlichen 2,5  $\mu$ l (für eine Transformation) erneut resuspendiert.

Die zur Transformation verwendeten Blätter (*Pisum sativum*, *Arabidopsis thaliana*, *Spinacia oleracea*) wurden mittig auf Agarplatten aufgelegt. Zur biolistischen Transformation von Erbse wurden bereits geöffnete Blätter verwendet.

Die biolistische Apparatur wurde in einer Sterilbank platziert und mit der Vakuumpumpe und der Heliumgasflasche verbunden. Der Heliumdruck zur Beschleunigung der Goldpartikel wurde auf 12 bar eingestellt. Der Präzipitationsansatz ( $2,5 \mu\text{l}$  pro Transformation) wurde auf den Träger geladen und in die biolistische Apparatur eingesetzt. Das Blattgewebe (auf Agarplatten aufliegend) wurde in der Apparatur unter dem Träger positioniert. Der Abstand zwischen dem Träger und dem Blattgewebe betrug 8 cm. Ein Vakuum von -8 bar wurde in der biolistischen Kammer angelegt und die Partikel mit Heliumdruck ins Gewebe geschossen. Die Agarplatten wurden mit 1 ml sterilem Leitungswasser versetzt und mit Parafilm verschlossen. Die Blätter wurden bis zur mikroskopischen Analyse über Nacht (ca. 12-14 h) bei RT im Dunkeln aufbewahrt.

---

# Literaturverzeichnis

- Adam, A., Endres, M., Sirrenberg, C., Lottspeich, F., Neupert, W., & Brunner, M. (1999). Tim9, a new component of the TIM22.54 translocase in mitochondria. *EMBO J*, 18(2), 313–9.
- Adamec, J., Rusnak, F., Owen, W. G., Naylor, S., Benson, L., Gacy, A., & Isaya, G. (2000). Iron-dependent self-assembly of recombinant yeast frataxin: implications for Friedreich ataxia. *Am J Hum Genet*, 67(3), 549–62.
- Address, K. J., Basilion, J. P., Klausner, R. D., Rouault, T. A., & Pardi, A. (1997). Structure and dynamics of the iron responsive element RNA: implications for binding of the RNA by iron regulatory binding proteins. *J Mol Biol*, 274(1), 72–83.
- Adinolfi, S., Trifuoggi, M., Politou, A. S., Martin, S., & Pastore, A. (2002). A structural approach to understanding the iron-binding properties of phylogenetically different frataxins. *Hum Mol Genet*, 11(16), 1865–77.
- Ahting, U., Thun, C., Hegerl, R., Typke, D., Nargang, F. E., Neupert, W., & Nussberger, S. (1999). The TOM core complex: the general protein import pore of the outer membrane of mitochondria. *J Cell Biol*, 147(5), 959–68.
- Akashi, K., Grandjean, O., & Small, I. (1998). Potential dual targeting of an Arabidopsis archaeobacterial-like histidyl-tRNA synthetase to mitochondria and chloroplasts. *FEBS Lett*, 431(1), 39–44.
- Akita, M., Nielsen, E., & Keegstra, K. (1997). Identification of protein transport complexes in the chloroplastic envelope membranes via chemical cross-linking. *J Cell Biol*, 136(5), 983–94.
- Almirón, M., Link, A. J., Furlong, D., & Kolter, R. (1992). A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes Dev*, 6(12B), 2646–54.
- Annweiler, A., Hipskind, R. A., & Wirth, T. (1991). A strategy for efficient in vitro translation of cDNAs using the rabbit beta-globin leader sequence. *Nucleic Acids Res*, 19(13), 3750.
- Arimura, S., Hirai, A., & Tsutsumi, N. (2001). Numerous and highly developed tubular projections from plastids observed in Tobacco epidermal cells. *Plant Sci*, 160(3), 449–454.

- Arnaud, N., Murgia, I., Boucherez, J., Briat, J.-F., Cellier, F., & Gaymard, F. (2006). An iron-induced nitric oxide burst precedes ubiquitin-dependent protein degradation for Arabidopsis AtFer1 ferritin gene expression. *J Biol Chem*, 281(33), 23579–88.
- Arnaud, N., Ravet, K., Borlotti, A., Touraine, B., Boucherez, J., Fizames, C., Briat, J.-F., Cellier, F., & Gaymard, F. (2007). The iron-responsive element (IRE)/iron-regulatory protein 1 (IRP1)-cytosolic aconitase iron-regulatory switch does not operate in plants. *Biochem J*, 405(3), 523–31.
- Arosio, P., Adelman, T. G., & Drysdale, J. W. (1978). On ferritin heterogeneity. Further evidence for heteropolymers. *J Biol Chem*, 253(12), 4451–8.
- Babcock, M., de Silva, D., Oaks, R., Davis-Kaplan, S., Jiralerspong, S., Montermini, L., Pandolfo, M., & Kaplan, J. (1997). Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science*, 276(5319), 1709–12.
- Balk, J. & Lobréaux, S. (2005). Biogenesis of iron-sulfur proteins in plants. *Trends Plant Sci*, 10(7), 324–31.
- Bannai, H., Tamada, Y., Maruyama, O., Nakai, K., & Miyano, S. (2002). Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics*, 18(2), 298–305.
- Becker, T., Hritz, J., Vogel, M., Caliebe, A., Bukau, B., Soll, J., & Schleiff, E. (2004). Toc12, a novel subunit of the intermembrane space preprotein translocon of chloroplasts. *Mol Biol Cell*, 15(11), 5130–44.
- Behal, R. H. & Oliver, D. J. (1998). NAD(+)-dependent isocitrate dehydrogenase from Arabidopsis thaliana. Characterization of two closely related subunits. *Plant Mol Biol*, 36(5), 691–8.
- Bencze, K. Z., Yoon, T., Millán-Pacheco, C., Bradley, P. B., Pastor, N., Cowan, J. A., & Stemmler, T. L. (2007). Human frataxin: iron and ferrochelatase binding surface. *Chem Commun (Camb)*, (18), 1798–800.
- Berghöfer, J. (1998). *Charakterisierung von Komponenten der plastidären Proteintransportmaschinerie*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Berghöfer, J. & 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(2), 328–32.
- Berthold, J., Bauer, M. F., Schneider, H. C., Klaus, C., Dietmeier, K., Neupert, W., & Brunner, M. (1995). The MIM complex mediates preprotein translocation across the mitochondrial inner membrane and couples it to the mt-Hsp70/ATP driving system. *Cell*, 81(7), 1085–93.

- Bhushan, S., Kuhn, C., Berglund, A. K., Roth, C., & Glaser, E. (2006). The role of the N-terminal domain of chloroplast targeting peptides in organellar protein import and mis-sorting. *FEBS Lett*, 580(16), 3966–72.
- Birnboim, H. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7(6), 1513–1523.
- Bjork, I. & Fish, W. W. (1971). Native and subunit molecular weights of apoferritin. *Biochemistry*, 10(15), 2844–8.
- Bozzi, M., Mignogna, G., Stefanini, S., Barra, D., Longhi, C., Valenti, P., & Chiancone, E. (1997). A novel non-heme iron-binding ferritin related to the DNA-binding proteins of the Dps family in *Listeria innocua*. *J Biol Chem*, 272(6), 3259–65.
- Branda, S. S., Cavadini, P., Adamec, J., Kalousek, F., Taroni, F., & Isaya, G. (1999). Yeast and human frataxin are processed to mature form in two sequential steps by the mitochondrial processing peptidase. *J Biol Chem*, 274(32), 22763–9.
- Braun, H. P., Emmermann, M., Kruft, V., Bödicker, M., & Schmitz, U. K. (1995). The general mitochondrial processing peptidase from wheat is integrated into the cytochrome bc1-complex of the respiratory chain. *Planta*, 195(3), 396–402.
- Braun, H. P., Emmermann, M., Kruft, V., & Schmitz, U. K. (1992a). Cytochrome c1 from potato: a protein with a presequence for targeting to the mitochondrial intermembrane space. *Mol Gen Genet*, 231(2), 217–25.
- Braun, H. P., Emmermann, M., Kruft, V., & Schmitz, U. K. (1992b). The general mitochondrial processing peptidase from potato is an integral part of cytochrome c reductase of the respiratory chain. *EMBO J*, 11(9), 3219–27.
- Braun, H. P. & Schmitz, U. K. (1999). The protein-import apparatus of plant mitochondria. *Planta*, 209(3), 267–74.
- Briat, J.-F. & Lebrun, M. (1999). Plant responses to metal toxicity. *C R Acad Sci III*, 322(1), 43–54.
- Briat, J.-F. & Lobréaux, S. (1997). Iron transport and storage in plants. *Trends in Plant Science*, 2(5), 187–193.
- Briat, J.-F., Lobréaux, S., Grignon, N., & Vansuyt, G. (1999). Regulation of plant ferritin synthesis: how and why. *Cell Mol Life Sci*, 56(1-2), 155–66.
- Busch, A., Rimbauld, B., Naumann, B., Rensch, S., & Hippler, M. (2008). Ferritin is required for rapid remodeling of the photosynthetic apparatus and minimizes photo-oxidative stress in response to iron availability in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J*, 55, 201–211.

- Busi, M. V., Maliandi, M. V., Valdez, H., Clemente, M., Zabaleta, E. J., Araya, A., & Gomez-Casati, D. F. (2006). Deficiency of *Arabidopsis thaliana* frataxin alters activity of mitochondrial Fe-S proteins and induces oxidative stress. *Plant J*, 48(6), 873–82.
- Busi, M. V., Zabaleta, E. J., Araya, A., & Gomez-Casati, D. F. (2004). Functional and molecular characterization of the frataxin homolog from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett*, 576(1-2), 141–4.
- Caliebe, A., Grimm, R., Kaiser, G., Lübeck, J., Soll, J., & Heins, L. (1997). The chloroplastic protein import machinery contains a Rieske-type iron-sulfur cluster and a mononuclear iron-binding protein. *EMBO J*, 16(24), 7342–50.
- Campanella, A., Isaya, G., O'Neill, H. A., Santambrogio, P., Cozzi, A., Arosio, P., & Levi, S. (2004). The expression of human mitochondrial ferritin rescues respiratory function in frataxin-deficient yeast. *Hum Mol Genet*, 13(19), 2279–88.
- Campuzano, V., Montermini, L., Moltò, M. D., Pianese, L., Cossée, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A., Zara, F., Canizares, J., Koutnikova, H., Bidichandani, S. I., Gellera, C., Brice, A., Trouillas, P., De Michele, G., Filla, A., De Frutos, R., Palau, F., Patel, P., Di Donato, S., Mandel, J. L., Coccozza, S., Koenig, M., & Pandolfo, M. (1996). Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science*, 271(5254), 1423–7.
- Cavadini, P., Adamec, J., Taroni, F., Gakh, O., & Isaya, G. (2000). Two-step processing of human frataxin by mitochondrial processing peptidase. Precursor and intermediate forms are cleaved at different rates. *J Biol Chem*, 275(52), 41469–75.
- Cavadini, P., O'Neill, H. A., Benada, O., & Isaya, G. (2002). Assembly and iron-binding properties of human frataxin, the protein deficient in Friedreich ataxia. *Hum Mol Genet*, 11(3), 217–27.
- Cavalier-Smith, T. (2000). Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends Plant Sci*, 5(4), 174–82.
- Cavalier-Smith, T. (2002). Chloroplast evolution: secondary symbiogenesis and multiple losses. *Curr Biol*, 12(2), R62–4.
- Chan, N. C., Likic, V. A., Waller, R. F., Mulhern, T. D., & Lithgow, T. (2006). The C-terminal TPR domain of Tom70 defines a family of mitochondrial protein import receptors found only in animals and fungi. *J Mol Biol*, 358(4), 1010–22.
- Chasteen, N. D. & Harrison, P. M. (1999). Mineralization in ferritin: an efficient means of iron storage. *J Struct Biol*, 126(3), 182–94.

- Cheesman, M. R., Thomson, A. J., Greenwood, C., Moore, G. R., & Kadir, F. (1990). Bis-methionine axial ligation of haem in bacterioferritin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature*, 346(6286), 771–3.
- Chen, X., Smith, M. D., Fitzpatrick, L., & Schnell, D. J. (2002). In vivo analysis of the role of atTic20 in protein import into chloroplasts. *Plant Cell*, 14(3), 641–54.
- Chew, O., Lister, R., Qbadou, S., Heazlewood, J. L., Soll, J., Schleiff, E., Millar, A. H., & Whelan, J. (2004). A plant outer mitochondrial membrane protein with high amino acid sequence identity to a chloroplast protein import receptor. *FEBS Lett*, 557(1-3), 109–14.
- Chew, O., Rudhe, C., Glaser, E., & Whelan, J. (2003a). Characterization of the targeting signal of dual-targeted pea glutathione reductase. *Plant Mol Biol*, 53(3), 341–56.
- Chew, O., Whelan, J., & Millar, A. H. (2003b). Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in Arabidopsis mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. *J Biol Chem*, 278(47), 46869–77.
- Chou, M. L., Fitzpatrick, L. M., Tu, S. L., Budziszewski, G., Potter-Lewis, S., Akita, M., Levin, J. Z., Keegstra, K., & Li, H. M. (2003). Tic40, a membrane-anchored co-chaperone homolog in the chloroplast protein translocon. *EMBO J*, 22(12), 2970–80.
- Chow, K. S., Singh, D. P., Roper, J. M., & 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(44), 27565–71.
- Christensen, A. C., Lyznik, A., Mohammed, S., Elowsky, C. G., Elo, A., Yule, R., & Mackenzie, S. A. (2005). Dual-domain, dual-targeting organellar protein presequences in Arabidopsis can use non-AUG start codons. *Plant Cell*, 17(10), 2805–16.
- Claros, M. G. & Vincens, P. (1996). Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem*, 241(3), 779–86.
- Clausen, C., Ilkavets, I., Thomson, R., Philippar, K., Vojta, A., Möhlmann, T., Neuhaus, E., Fulgosi, H., & Soll, J. (2004). Intracellular localization of VDAC proteins in plants. *Planta*, 220(1), 30–7.
- Clausmeyer, S. (1992). *Import, Sortierung, Assemblierung von kernkodierten Proteinen des Chloroplasten*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- 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., & Robinson, C. (2002). Isolated plant mitochondria import chloroplast precursor proteins in vitro with the same efficiency as chloroplasts. *J Biol Chem*, 277(7), 5562–9.

- Crichton, R. R., Eason, R., Barclay, A., & Bryce, C. F. (1973). The subunit structure of horse spleen apoferritin; the molecular weight of the oligomer and its stability to dissociation by dilution. *Biochem J*, 131(4), 855–7.
- Crichton, R. R., Ponce-Ortiz, Y., Koch, M. H., Parfait, R., & Stuhmann, H. B. (1978). Isolation and characterization of phytoferritin from pea (*Pisum sativum*) and Lentil (*Lens esculenta*). *Biochem J*, 171(2), 349–56.
- Dekker, P. J., Ryan, M. T., Brix, J., Müller, H., Hönlinger, A., & Pfanner, N. (1998). Preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane: molecular dissection and assembly of the general import pore complex. *Mol Cell Biol*, 18(11), 6515–24.
- Dessi, P., Pavlov, P. F., Wallberg, F., Rudhe, C., Brack, S., Whelan, J., & Glaser, E. (2003). Investigations on the in vitro import ability of mitochondrial precursor proteins synthesized in wheat germ transcription-translation extract. *Plant Mol Biol*, 52(2), 259–71.
- Dinkins, R. D., Conn, H. M., Dirk, L. M. A., Williams, M. A., & Houtzb, R. L. (2003). The *Arabidopsis thaliana* peptide deformylase 1 protein is localized to both mitochondria and chloroplast. *Plant Science*, 165, 751–758.
- Dong, X., Sun, Q., Wei, D., Li, J., Li, J., Tang, B., Jia, Q., Hu, W., Zhao, Y., & Hua, Z. C. (2007). A novel ferritin gene, SferH-5, reveals heterogeneity of the 26.5-kDa subunit of soybean (*Glycine max*) seed ferritin. *FEBS Lett*, 581(30), 5796–802.
- Dong, X., Tang, B., Li, J., Xu, Q., Fang, S., & Hua, Z. (2008). Expression and purification of intact and functional soybean (*Glycine max*) seed ferritin complex in *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol*, 18(2), 299–307.
- Drysdale, J., Arosio, P., Invernizzi, R., Cazzola, M., Volz, A., Corsi, B., Biasiotto, G., & Levi, S. (2002). Mitochondrial ferritin: a new player in iron metabolism. *Blood Cells Mol Dis*, 29(3), 376–83.
- Duchêne, A. M., Giritch, A., Hoffmann, B., Cognat, V., Lancelin, D., Peeters, N. M., Zaepfel, M., Maréchal-Drouard, L., & 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(45), 16484–9.
- Duchêne, A. M., Peeters, N., Dietrich, A., Cosset, A., Small, I. D., & Wintz, H. (2001). Overlapping destinations for two dual targeted glycyl-tRNA synthetases in *Arabidopsis thaliana* and *Phaseolus vulgaris*. *J Biol Chem*, 276(18), 15275–83.
- Duy, D., Wanner, G., Meda, A. R., von Wirén, N., Soll, J., & Philippar, K. (2007). PIC1, an ancient permease in *Arabidopsis* chloroplasts, mediates iron transport. *Plant Cell*, 19(3), 986–1006.

- Dyall, S. D., Brown, M. T., & Johnson, P. J. (2004). Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science*, 304(5668), 253–7.
- Eisenstein, R. S. (2000). Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. *Annu Rev Nutr*, 20, 627–62.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., & von Heijne, G. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol*, 300(4), 1005–16.
- Eubel, H., Heinemeyer, J., & Braun, H. P. (2004). Identification and characterization of respirasomes in potato mitochondria. *Plant Physiol*, 134(4), 1450–9.
- Eubel, H., Jansch, L., & Braun, H. P. (2003). New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant Physiol*, 133(1), 274–86.
- Fankuchen, I. (1943). FERRITIN. V. X-RAY DIFFRACTION DATA ON FERRITIN AND APOFERRITIN. *J. Biol. Chem.*, 150, 57–59.
- Fobis-Loisy, I., Loridon, K., Lobréaux, S., Lebrun, M., & Briat, J.-F. (1995). Structure and differential expression of two maize ferritin genes in response to iron and abscisic acid. *Eur J Biochem*, 231(3), 609–19.
- Foury, F. & Cazzalini, O. (1997). Deletion of the yeast homologue of the human gene associated with Friedreich's ataxia elicits iron accumulation in mitochondria. *FEBS Lett*, 411(2-3), 373–7.
- Frolow, F., Kalb, A. J., & Yariv, J. (1994). Structure of a unique twofold symmetric haem-binding site. *Nat Struct Biol*, 1(7), 453–60.
- Fujiwara, K., Okamura-Ikeda, K., & Motokawa, Y. (1990). cDNA sequence, in vitro synthesis, and intramitochondrial lipoylation of H-protein of the glycine cleavage system. *J Biol Chem*, 265(29), 17463–7.
- Gakh, O., Adamec, J., Gacy, A. M., Twosten, R. D., Owen, W. G., & Isaya, G. (2002). Physical evidence that yeast frataxin is an iron storage protein. *Biochemistry*, 41(21), 6798–804.
- Gallois, B., d'Estaintot, B. L., Michaux, M.-A., Dautant, A., Granier, T., Précigoux, G., Soruco, J.-A., Roland, F., Chavas-Alba, O., Herbas, A., & Crichton, R. R. (1997). X-ray structure of recombinant horse L-chain apoferritin at 2.0 Å resolution: implications for stability and functions. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2, 360–367.
- Gálvez, S., Bismuth, E., Sarda, C., & Gadad, P. (1994). Purification and Characterization of Chloroplastic NADP-Isocitrate Dehydrogenase from Mixotrophic Tobacco Cells (Comparison with the Cytosolic Isoenzyme). *Plant Physiol*, 105(2), 593–600.

- Gálvez, S., Roche, O., Bismuth, E., Brown, S., Gadal, P., & Hodges, M. (1998). Mitochondrial localization of a NADP-dependent isocitrate dehydrogenase isoenzyme by using the green fluorescent protein as a marker. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(13), 7813–8.
- Gaymard, F., Boucherez, J., & Briat, J.-F. (1996). Characterization of a ferritin mRNA from *Arabidopsis thaliana* accumulated in response to iron through an oxidative pathway independent of abscisic acid. *Biochem J*, 318, 67–73.
- Gdaniec, Z., Sierzputowska-Gracz, H., & Theil, E. C. (1998). Iron regulatory element and internal loop/bulge structure for ferritin mRNA studied by cobalt(III) hexamine binding, molecular modeling, and NMR spectroscopy. *Biochemistry*, 37(6), 1505–12.
- Geissler, A., Rassow, J., Pfanner, N., & Voos, W. (2001). Mitochondrial import driving forces: enhanced trapping by matrix Hsp70 stimulates translocation and reduces the membrane potential dependence of loosely folded preproteins. *Mol Cell Biol*, 21(20), 7097–104.
- Gentle, I., Perry, A. J., Alcock, F. H., Likic, V. A., Dolezal, P., Ng, E. T., Purcell, A. W., McConnville, M., Naderer, T., Chanez, A. L., Charrière, F., Aschinger, C., Schneider, A., Tokatlidis, K., & Lithgow, T. (2007). Conserved motifs reveal details of ancestry and structure in the small TIM chaperones of the mitochondrial intermembrane space. *Mol Biol Evol*, 24(5), 1149–60.
- George, G. N., Richards, T., Bare, R. E., Gea, Y., Prince, R. C., Stiefel, E. I., & Watt, G. D. (1993). Direct observation of bis-sulfur ligation to the heme of bacterioferritin. *Journal of the American Chemical Society*, 115(17), 7716–7718.
- Giegé, P., Sweetlove, L. J., & Leaver, C. J. (2003). Identification of Mitochondrial Protein Complexes in *Arabidopsis* Using Two-Dimensional Blue-Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 21, 133–144.
- Glaser, E. & Dessi, P. (1999). Integration of the mitochondrial-processing peptidase into the cytochrome bc1 complex in plants. *J Bioenerg Biomembr*, 31(3), 259–74.
- Glaser, E., Sjöling, S., Tanudji, M., & Whelan, J. (1998). Mitochondrial protein import in plants. Signals, sorting, targeting, processing and regulation. *Plant Mol Biol*, 38(1-2), 311–38.
- Goggin, D. E., Lipscombe, R., Fedorova, E., Millar, A. H., Mann, A., Atkins, C. A., & Smith, P. M. (2003). Dual intracellular localization and targeting of aminoimidazole ribonucleotide synthetase in cowpea. *Plant Physiol*, 131(3), 1033–41.
- Granick, S. (1942). FERRITIN. I. PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF HORSE SPLEEN FERRITIN. *J. Biol. Chem.*, 146(2), 451–461.
- Granick, S. (1943). FERRITIN. IV. OCCURRENCE AND IMMUNOLOGICAL PROPERTIES OF FERRITIN. *J. Biol. Chem.*, 149(1), 157–167.

- Granick, S. (1946). FERRITIN. IX. INCREASE OF THE PROTEIN APOFERRITIN IN THE GASTROINTESTINAL MUCOSA AS A DIRECT RESPONSE TO IRON FEEDING. THE FUNCTION OF FERRITIN IN THE REGULATION OF IRON ABSORPTION. *J. Biol. Chem.*, 164(2), 737–746.
- Granick, S. & Hahn, P. F. (1944). FERRITIN. VIII. SPEED OF UPTAKE OF IRON BY THE LIVER AND ITS CONVERSION TO FERRITIN IRON. *J. Biol. Chem.*, 155(2), 661–669.
- Granick, S. & Michaelis, L. (1943). FERRITIN. II. APOFERRITIN OF HORSE SPLEEN. *J. Biol. Chem.*, 147(1), 91–97.
- Grant, R. A., Filman, D. J., Finkel, S. E., Kolter, R., & Hogle, J. M. (1998). The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA. *Nat Struct Biol*, 5(4), 294–303.
- Gray, G. R., Villarimo, A. R., Whitehead, C. L., & McIntosh, L. (2004). Transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants with increased expression levels of mitochondrial NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase: evidence implicating this enzyme in the redox activation of the alternative oxidase. *Plant Cell Physiol*, 45(10), 1413–25.
- Gray, M. W. (1999). Evolution of organellar genomes. *Curr Opin Genet Dev*, 9(6), 678–87.
- Greenberg, D. M., Copp, D. H., & Cuthbertson, E. M. (1943). STUDIES IN MINERAL METABOLISM WITH THE AID OF ARTIFICIAL RADIOACTIVE ISOTOPES. VII. THE DISTRIBUTION AND EXCRETION, PARTICULARLY BY WAY OF THE BILE, OF IRON, COBALT, AND MANGANESE. *J. Biol. Chem.*, 147(3), 749–756.
- Gunning, B. E. (2005). Plastid stromules: video microscopy of their outgrowth, retraction, tensioning, anchoring, branching, bridging, and tip-shedding. *Protoplasma*, 225(1-2), 33–42.
- Gutensohn, M., Fan, E., Frielingsdorf, S., Hanner, P., Hou, B., Hust, B., & Klösgen, R. B. (2006). Toc, Tic, Tat et al.: structure and function of protein transport machineries in chloroplasts. *J Plant Physiol*, 163(3), 333–47.
- Gutensohn, M., Pahnke, S., Kolukisaoglu, U., Schulz, B., Schierhorn, A., Voigt, A., Hust, B., Rollwitz, I., Stöckel, J., Geimer, S., Albrecht, V., Flügge, U. I., & Klösgen, R. B. (2004). Characterization of a T-DNA insertion mutant for the protein import receptor atToc33 from chloroplasts. *Mol Genet Genomics*, 272(4), 379–96.
- Hahn, P. F., Granick, S., Bale, W. F., & Michaelis, L. (1943). FERRITIN. VI. CONVERSION OF INORGANIC AND HEMOGLOBIN IRON INTO FERRITIN IRON IN THE ANIMAL BODY. STORAGE FUNCTION OF FERRITIN IRON AS SHOWN BY RADIOACTIVE AND MAGNETIC MEASUREMENTS. *J. Biol. Chem.*, 150(2), 407–412.

- Hamel, P., Sakamoto, W., Wintz, H., & 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(6), 1319–27.
- Harrison, P. M. & Arosio, P. (1996). The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta*, 1275(3), 161–203.
- Haseloff, J. & Amos, B. (1995). GFP in plants. *Trends Genet*, 11(8), 328–9.
- Haseloff, J., Siemering, K. R., Prasher, D. C., & Hodge, S. (1997). Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(6), 2122–7.
- He, Y., Alam, S., Proteasa, S. V., Zhang, Y., Lesuisse, E., Dancis, A., & Stemmler, T. L. (2004). Yeast frataxin solution structure, iron binding, and ferrochelatase interaction. *Biochemistry*, 43(51), 16254–62.
- Heins, L., Mehrle, A., Hemmler, R., Wagner, R., K uchler, M., H ormann, F., Sveshnikov, D., & Soll, J. (2002). The preprotein conducting channel at the inner envelope membrane of plastids. *EMBO J*, 21(11), 2616–25.
- Heins, L. & Schmitz, U. K. (1996). A receptor for protein import into potato mitochondria. *Plant J*, 9(6), 829–39.
- Hell, K., Herrmann, J., Pratje, E., Neupert, W., & Stuart, R. A. (1997). Oxa1p mediates the export of the N- and C-termini of pCoxII from the mitochondrial matrix to the intermembrane space. *FEBS Lett*, 418(3), 367–70.
- Hell, R. & Stephan, U. W. (2003). Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta*, 216(4), 541–51.
- Hempstead, P. D., Yewdall, S. J., Fernie, A. R., Lawson, D. M., Artymiuk, P. J., Rice, D. W., Ford, G. C., & Harrison, P. M. (1997). Comparison of the three-dimensional structures of recombinant human H and horse L ferritins at high resolution. *J Mol Biol*, 268(2), 424–48.
- Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U., & Andrews, N. C. (2004). Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell*, 117(3), 285–97.
- Hintze, K. J. & Theil, E. C. (2005). DNA and mRNA elements with complementary responses to hemin, antioxidant inducers, and iron control ferritin-L expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(42), 15048–52.
- Hintze, K. J. & Theil, E. C. (2006). Cellular regulation and molecular interactions of the ferritins. *Cell Mol Life Sci*, 63(5), 591–600.
- Hirsch, S., Muckel, E., Heemeyer, F., von Heijne, G., & Soll, J. (1994). A receptor component of the chloroplast protein translocation machinery. *Science*, 266(5193), 1989–92.

- Hoogenboom, B. W., Suda, K., Engel, A., & Fotiadis, D. (2007). The supramolecular assemblies of voltage-dependent anion channels in the native membrane. *J Mol Biol*, 370(2), 246–55.
- Hörmann, F., Kütchler, M., Sveshnikov, D., Oppermann, U., Li, Y., & Soll, J. (2004). Tic32, an essential component in chloroplast biogenesis. *J Biol Chem*, 279(33), 34756–62.
- Hyde, B. B., Hodge, A. J., Kahn, A., & Birnstiel, M. L. (1963). Studies on Phytoferritin I. Identification and Localization. *J. Ultrastructure Research*, 9, 248–258.
- Ilari, A., Stefanini, S., Chiancone, E., & Tsernoglou, D. (2000). The dodecameric ferritin from *Listeria innocua* contains a novel intersubunit iron-binding site. *Nat Struct Biol*, 7(1), 38–43.
- Inaba, T. & Schnell, D. J. (2008). Protein trafficking to plastids: one theme, many variations. *Biochem J*, 413(1), 15–28.
- Iverson, T. M. (2006). Evolution and unique bioenergetic mechanisms in oxygenic photosynthesis. *Curr Opin Chem Biol*, 10(2), 91–100.
- Jameson, G. N., Jin, W., Krebs, C., Perreira, A. S., Tavares, P., Liu, X., Theil, E. C., & Huynh, B. H. (2002). Stoichiometric production of hydrogen peroxide and parallel formation of ferric multimers through decay of the diferric-peroxo complex, the first detectable intermediate in ferritin mineralization. *Biochemistry*, 41, 13435–43.
- Jänsch, L., Kruff, V., Schmitz, U. K., & Braun, H. P. (1996). New insights into the composition, molecular mass and stoichiometry of the protein complexes of plant mitochondria. *Plant J*, 9(3), 357–68.
- Jänsch, L., Kruff, V., Schmitz, U. K., & Braun, H. P. (1998). Unique composition of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane from plants. *J Biol Chem*, 273(27), 17251–7.
- Jarvis, P. (2008). Targeting of nucleus-encoded proteins to chloroplasts in plants. *New Phytol*, doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02452.x.
- Jiang, T. B. (2005). Isolation and Expression Pattern Analysis of Two Ferritin Genes in Tobacco. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47(4), 477–486.
- Johnston, J. A., Ward, C. L., & Kopito, R. R. (1998). Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol*, 143(7), 1883–98.
- Kalousek, F., Isaya, G., & Rosenberg, L. E. (1992). Rat liver mitochondrial intermediate peptidase (MIP): purification and initial characterization. *EMBO J*, 11(8), 2803–9.
- Ke, Y., Sierzputowska-Gracz, H., Gdaniec, Z., & Theil, E. C. (2000). Internal loop/bulge and hairpin loop of the iron-responsive element of ferritin mRNA contribute to maximal iron regulatory protein 2 binding and translational regulation in the iso-iron-responsive element/iso-iron regulatory protein family. *Biochemistry*, 39(20), 6235–42.

- Kerscher, O., Holder, J., Srinivasan, M., Leung, R. S., & Jensen, R. E. (1997). The Tim54p-Tim22p complex mediates insertion of proteins into the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol*, 139(7), 1663–75.
- Kessler, F., Blobel, G., Patel, H. A., & Schnell, D. J. (1994). Identification of two GTP-binding proteins in the chloroplast protein import machinery. *Science*, 266(5187), 1035–9.
- Kessler, F. & Schnell, D. J. (2006). The function and diversity of plastid protein import pathways: a multilane GTPase highway into plastids. *Traffic*, 7(3), 248–57.
- Kleine, T., Lockhart, P., & Batschauer, A. (2003). An Arabidopsis protein closely related to Synechocystis cryptochrome is targeted to organelles. *Plant J*, 35(1), 93–103.
- Koehler, C. M., Merchant, S., Oppliger, W., Schmid, K., Jarosch, E., Dolfini, L., Junne, T., Schatz, G., & Tokatlidis, K. (1998). Tim9p, an essential partner subunit of Tim10p for the import of mitochondrial carrier proteins. *EMBO J*, 17(22), 6477–86.
- Kopito, R. R. (2000). Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol*, 10(12), 524–30.
- Kopito, R. R. & Sitia, R. (2000). Aggresomes and Russell bodies. Symptoms of cellular indigestion? *EMBO Rep*, 1(3), 225–31.
- Kouranov, A., Chen, X., Fuks, B., & Schnell, D. J. (1998). Tic20 and Tic22 are new components of the protein import apparatus at the chloroplast inner envelope membrane. *J Cell Biol*, 143(4), 991–1002.
- Kouranov, A. & Schnell, D. J. (1997). Analysis of the interactions of preproteins with the import machinery over the course of protein import into chloroplasts. *J Cell Biol*, 139(7), 1677–85.
- Koutnikova, H., Campuzano, V., Foury, F., Dollé, P., Cazzalini, O., & Koenig, M. (1997). Studies of human, mouse and yeast homologues indicate a mitochondrial function for frataxin. *Nat Genet*, 16(4), 345–51.
- Küchler, M., Decker, S., Hörmann, F., Soll, J., & Heins, L. (2002). Protein import into chloroplasts involves redox-regulated proteins. *EMBO J*, 21(22), 6136–45.
- Kuhn, R., Sorensen, N. A., & Birkofer, L. (1940). Über die Eisenproteide der Milz; der Bauplan des Ferritins. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 73B(7), 823–837.
- Kwok, E. Y. & Hanson, M. R. (2004). Stromules and the dynamic nature of plastid morphology. *J Microsc*, 214(Pt 2), 124–37.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–5.

- Laufberger, V. (1937). Sur la Cristallisation de la Ferritine. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 19, 1575–1582.
- Laulhere, J. P., Laboure, A. M., & Briat, J.-F. (1989). Mechanism of the transition from plant ferritin to phytosiderin. *J Biol Chem*, 264(6), 3629–35.
- Laulhere, J. P., Lescure, A. M., & Briat, J.-F. (1988). Purification and characterization of ferritins from maize, pea, and soya bean seeds. Distribution in various pea organs. *J Biol Chem*, 263(21), 10289–94.
- Lawson, D. M., Artymiuk, P. J., Yewdall, S. J., Smith, J. M., Livingstone, J. C., Treffry, A., Luzzago, A., Levi, S., Arosio, P., & Cesareni, G. (1991). Solving the structure of human H ferritin by genetically engineering intermolecular crystal contacts. *Nature*, 349(6309), 541–4.
- Lescure, A. M., Massenet, O., & Briat, J.-F. (1990). Purification and characterization of an iron-induced ferritin from soybean (*Glycine max*) cell suspensions. *Biochem J*, 272(1), 147–50.
- Lescure, A. M., Proudhon, D., Pesey, H., Ragland, M., Theil, E. C., & Briat, J.-F. (1991). Ferritin gene transcription is regulated by iron in soybean cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(18), 8222–6.
- Lesuisse, E., Santos, R., Matzanke, B. F., Knight, S. A., Camadro, J. M., & Dancis, A. (2003). Iron use for haeme synthesis is under control of the yeast frataxin homologue (Yfh1). *Hum Mol Genet*, 12(8), 879–89.
- Levi, S. & Arosio, P. (2004). Mitochondrial ferritin. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(10), 1887–9.
- Levi, S., Corsi, B., Bosisio, M., Invernizzi, R., Volz, A., Sanford, D., Arosio, P., & Drysdale, J. (2001). A human mitochondrial ferritin encoded by an intronless gene. *J Biol Chem*, 276(27), 24437–40.
- Levi, S., Luzzago, A., Cesareni, G., Cozzi, A., Franceschinelli, F., Albertini, A., & Arosio, P. (1988). Mechanism of ferritin iron uptake: activity of the H-chain and deletion mapping of the ferro-oxidase site. A study of iron uptake and ferro-oxidase activity of human liver, recombinant H-chain ferritins, and of two H-chain deletion mutants. *J Biol Chem*, 263(34), 18086–92.
- Levi, S., Salfeld, J., Franceschinelli, F., Cozzi, A., Dorner, M. H., & Arosio, P. (1989). Expression and structural and functional properties of human ferritin L-chain from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 28(12), 5179–84.
- Levi, S., Yewdall, S., Harrison, P. M., Santambrogio, P., Cozzi, A., Rovida, E., Albertini, A., & Arosio, P. (1992). Evidence of H- and L-chains have co-operative roles in the iron-uptake mechanism of human ferritin. *Biochem J*, 288, 591–6.

- Lewin, A., Moore, G. ., & Le Brun, N. E. (2005). Formation of protein-coated iron minerals. *Dalton Trans*, (22), 3597–610.
- Likic, V. A., Perry, A., Hulett, J., Derby, M., Traven, A., Waller, R. F., Keeling, P. J., Koehler, C. M., Curran, S. P., Gooley, P. R., & Lithgow, T. (2005). Patterns that define the four domains conserved in known and novel isoforms of the protein import receptor Tom20. *J Mol Biol*, 347(1), 81–93.
- Lill, R. & Mühlenhoff, U. (2005). Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trends Biochem Sci*, 30(3), 133–41.
- Lister, R., Chew, O., Lee, M. N., Heazlewood, J. L., Clifton, R., Parker, K. L., Millar, A. H., & Whelan, J. (2004). A transcriptomic and proteomic characterization of the Arabidopsis mitochondrial protein import apparatus and its response to mitochondrial dysfunction. *Plant Physiol*, 134(2), 777–89.
- Lister, R., Chew, O., Rudhe, C., Lee, M. N., & Whelan, J. (2001). Arabidopsis thaliana ferrochelatase-I and -II are not imported into Arabidopsis mitochondria. *FEBS Lett*, 506(3), 291–5.
- Lister, R., Murcha, M. W., & Whelan, J. (2003). The Mitochondrial Protein Import Machinery of Plants (MPIMP) database. *Nucleic Acids Res*, 31(1), 325–7.
- Lister, R. & Whelan, J. (2006). Mitochondrial protein import: convergent solutions for receptor structure. *Curr Biol*, 16(6), R197–9.
- Lobréaux, S. & Briat, J.-F. (1991). Ferritin accumulation and degradation in different organs of pea (*Pisum sativum*) during development. *Biochem J*, 274, 601–6.
- Lobréaux, S., Hardy, T., & Briat, J.-F. (1993). Abscisic acid is involved in the iron-induced synthesis of maize ferritin. *EMBO J*, 12(2), 651–7.
- Lobréaux, S., Massenet, O., & Briat, J.-F. (1992a). Iron induces ferritin synthesis in maize plantlets. *Plant Mol Biol*, 19(4), 563–75.
- Lobréaux, S., Thoirion, S., & Briat, J.-F. (1995). Induction of ferritin synthesis in maize leaves by an iron-mediated oxidative stress. *The Plant Journal*, 8(3), 443–449.
- Lobréaux, S., Yewdall, S. J., Briat, J.-F., & Harrison, P. M. (1992b). Amino-acid sequence and predicted three-dimensional structure of pea seed (*Pisum sativum*) ferritin. *Biochem J*, 288, 931–9.
- Lübeck, J., Soll, J., Akita, M., Nielsen, E., & Keegstra, K. (1996). Topology of IEP110, a component of the chloroplastic protein import machinery present in the inner envelope membrane. *EMBO J*, 15(16), 4230–8.

- M., N. M. U., Ollagnier-de Choudens, S., Sanakis, Y., Abdel-Ghany, S. E., Rousset, C., Ye, H., Fontecave, M., Pilon-Smits, E. A. H., & Pilon, M. (2007). Characterization of Arabidopsis thaliana SufE2 and SufE3: functions in chloroplast iron-sulfur cluster assembly and Nad synthesis. *J Biol Chem*, 282(25), 18254–64.
- Ma, Y., Kouranov, A., LaSala, S. E., & Schnell, D. J. (1996). Two components of the chloroplast protein import apparatus, IAP86 and IAP75, interact with the transit sequence during the recognition and translocation of precursor proteins at the outer envelope. *J Cell Biol*, 134(2), 315–27.
- Macasev, D., Newbigin, E., Whelan, J., & 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(3), 811–6.
- Macasev, D., Whelan, J., Newbigin, E., Silva-Filho, M. C., Mulhern, T. D., & Lithgow, T. (2004). Tom22', an 8-kDa trans-site receptor in plants and protozoans, is a conserved feature of the TOM complex that appeared early in the evolution of eukaryotes. *Mol Biol Evol*, 21(8), 1557–64.
- Mackenzie, S. A. (2005). Plant organellar protein targeting: a traffic plan still under construction. *Trends Cell Biol*, 15(10), 548–54.
- Maramorosch, K. & Hirumi, H. (1973). Phytoferritin accumulations in leaves of diseased coconut palms. *Protoplasma*, 78(1), 175–80.
- Marques, J. P., Schattat, M. H., Hause, G., Dudeck, I., & 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(403), 1697–706.
- Masuda, T., Goto, F., & Yoshihara, T. (2001). A novel plant ferritin subunit from soybean that is related to a mechanism in iron release. *J Biol Chem*, 276(22), 19575–9.
- Masuda, T., Goto, F., Yoshihara, T., Ezure, T., Suzuki, T., Kobayashi, S., Shikata, M., & Utsumi, S. (2007). Construction of homo- and heteropolymers of plant ferritin subunits using an in vitro protein expression system. *Protein Expr Purif*, 56(2), 237–46.
- Masuda, T., Suzuki, T., Shimada, H., Ohta, H., & Takamiya, K. (2003). Subcellular localization of two types of ferrochelatase in cucumber. *Planta*, 217(4), 602–9.
- May, T. & Soll, J. (2000). 14-3-3 proteins form a guidance complex with chloroplast precursor proteins in plants. *Plant Cell*, 12(1), 53–64.
- Meisinger, C., Ryan, M., Hill, K., Model, K., Lim, J. H., Sickmann, A., Müller, H., Meyer, H. E., Wagner, R., & Pfanner, N. (2001). Protein import channel of the outer mitochondrial membrane: a highly stable Tom40-Tom22 core structure differentially interacts with preproteins, small tom proteins, and import receptors. *Mol Cell Biol*, 21(7), 2337–48.

- Menand, B., Maréchal-Drouard, L., Sakamoto, W., Dietrich, A., & 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(18), 11014–9.
- Meyer, E. H., Taylor, N. L., & Millar, A. H. (2008). Resolving and identifying protein components of plant mitochondrial respiratory complexes using three dimensions of gel electrophoresis. *J Proteome Res*, 7(2), 786–94.
- Michaelis, L., Coryell, C. D., & Granick, S. (1943). FERRITIN. III. THE MAGNETIC PROPERTIES OF FERRITIN AND SOME OTHER COLLOIDAL FERRIC COMPOUNDS. *J. Biol. Chem.*, 148(3), 463–480.
- Millar, A. H., Whelan, J., & Small, I. (2006). Recent surprises in protein targeting to mitochondria and plastids. *Curr Opin Plant Biol*, 9(6), 610–5.
- Molik, S. (2005). *Das plastidäre Rieske Fe/S-Protein: Analyse des Transport- und Assemblierungsprozesses*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Mori, S. (1999). Iron acquisition by plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2(3), 250–3.
- Murcha, M. W., Elhafez, D., Millar, A. H., & Whelan, J. (2005). The C-terminal region of TIM17 links the outer and inner mitochondrial membranes in *Arabidopsis* and is essential for protein import. *J Biol Chem*, 280(16), 16476–83.
- Murgia, I., Delledonne, M., & Soave, C. (2002). Nitric oxide mediates iron-induced ferritin accumulation in *Arabidopsis*. *Plant J*, 30(5), 521–8.
- Neupert, W. & Herrmann, J. M. (2007). Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem*, 76, 723–49.
- Nielsen, E., Akita, M., Davila-Aponte, J., & Keegstra, K. (1997). Stable association of chloroplastic precursors with protein translocation complexes that contain proteins from both envelope membranes and a stromal Hsp100 molecular chaperone. *EMBO J*, 16(5), 935–46.
- Obara, K., Sumi, K., & 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(7), 697–705.
- Oliver, D. J. (1994). The Glycine Decarboxylase Complex from Plant Mitochondria. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 45, 323–327.
- Olsen, L. J. & Keegstra, K. (1992). The binding of precursor proteins to chloroplasts requires nucleoside triphosphates in the intermembrane space. *J Biol Chem*, 267(1), 433–9.
- Olsen, L. J., Theg, S. M., Selman, B. R., & Keegstra, K. (1989). ATP is required for the binding of precursor proteins to chloroplasts. *J Biol Chem*, 264(12), 6724–9.

- Pain, D. & Blobel, G. (1987). Protein import into chloroplasts requires a chloroplast ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(10), 3288–92.
- Papinutto, E., Dundon, W. G., Pitulis, N., Battistutta, R., Montecucco, C., & Zanotti, G. (2002). Structure of two iron-binding proteins from *Bacillus anthracis*. *J Biol Chem*, 277(17), 15093–8.
- Park, S., Gakh, O., Mooney, S. M., & Isaya, G. (2002). The ferroxidase activity of yeast frataxin. *J Biol Chem*, 277(41), 38589–95.
- Park, S., Gakh, O., O'Neill, H. A., Mangravita, A., Nichol, H., Ferreira, G. C., & Isaya, G. (2003). Yeast frataxin sequentially chaperones and stores iron by coupling protein assembly with iron oxidation. *J Biol Chem*, 278(33), 31340–51.
- Peña, M. M. & Bullerjahn, G. S. (1995). The DpsA protein of *Synechococcus* sp. Strain PCC7942 is a DNA-binding hemoprotein. Linkage of the Dps and bacterioferritin protein families. *J Biol Chem*, 270(38), 22478–82.
- Peeters, N. & Small, I. (2001). Dual targeting to mitochondria and chloroplasts. *Biochim Biophys Acta*, 1541(1-2), 54–63.
- Perry, A. J., Hulett, J. M., Likic, V. A., Lithgow, T., & Gooley, P. R. (2006). Convergent evolution of receptors for protein import into mitochondria. *Curr Biol*, 16(3), 221–9.
- Perry, A. J., Hulett, J. M., Lithgow, T., & Gooley, P. R. (2005). <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N resonance assignments of the cytosolic domain of Tom20 from *Arabidopsis thaliana*. *J Biomol NMR*, 33(3), 198.
- Perry, A. J., Rimmer, K. A., Mertens, H. D., Waller, R. F., Mulhern, T. D., Lithgow, T., & Gooley, P. R. (2008). Structure, topology and function of the translocase of the outer membrane of mitochondria. *Plant Physiol Biochem*, 46(3), 265–74.
- Perry, S. E. & Keegstra, K. (1994). Envelope membrane proteins that interact with chloroplastic precursor proteins. *Plant Cell*, 6(1), 93–105.
- Perryman, R. A., Mooney, B., & Harmey, M. A. (1995). Identification of a 42-kDa plant mitochondrial outer membrane protein, MOM42, involved in the import of precursor proteins into plant mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, 316(2), 659–64.
- Petit, J. M., Briat, J.-F., & Lobréaux, S. (2001a). Structure and differential expression of the four members of the *Arabidopsis thaliana* ferritin gene family. *Biochem J*, 359(Pt 3), 575–82.
- Petit, J. M., van Wuytswinkel, O., Briat, J.-F., & Lobréaux, S. (2001b). Characterization of an iron-dependent regulatory sequence involved in the transcriptional control of AtFer1 and ZmFer1 plant ferritin genes by iron. *J Biol Chem*, 276(8), 5584–90.

- Proudhon, D., Briat, J.-F., & Lescure, A. M. (1989). Iron Induction of Ferritin Synthesis in Soybean Cell Suspensions. *Plant Physiol*, 90(2), 586–590.
- Proudhon, D., Wei, J., Briat, J.-F., & Theil, E. C. (1996). Ferritin gene organization: differences between plants and animals suggest possible kingdom-specific selective constraints. *J Mol Evol*, 42(3), 325–36.
- Pujol, C., Maréchal-Drouard, L., & 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(2), 356–67.
- Qbadou, S., Becker, T., Bionda, T., Reger, K., Ruprecht, M., Soll, J., & Schleiff, E. (2007). Toc64—a preprotein-receptor at the outer membrane with bipartite function. *J Mol Biol*, 367(5), 1330–46.
- Qbadou, S., Becker, T., Mirus, O., Tews, I., Soll, J., & Schleiff, E. (2006). The molecular chaperone Hsp90 delivers precursor proteins to the chloroplast import receptor Toc64. *EMBO J*, 25(9), 1836–47.
- Qu, I. Q., Yoshihara, T., Ooyama, A., Goto, F., & Takaiwa, F. (2005). Iron accumulation does not parallel the high expression level of ferritin in transgenic rice seeds. *Planta*, 222(2), 225–33.
- Ragland, M., Briat, J.-F., Gagnon, J., Laulhere, J. P., Massenet, O., & Theil, E. C. (1990). Evidence for conservation of ferritin sequences among plants and animals and for a transit peptide in soybean. *J Biol Chem*, 265(30), 18339–44.
- Ramage, L., Junne, T., Hahne, K., Lithgow, T., & Schatz, G. (1993). Functional cooperation of mitochondrial protein import receptors in yeast. *EMBO J*, 12(11), 4115–23.
- Rassow, J., Dekker, P. J., van Wilpe, S., Meijer, M., & Soll, J. (1999). The preprotein translocase of the mitochondrial inner membrane: function and evolution. *J Mol Biol*, 286(1), 105–20.
- Ravet, K., Touraine, B., Boucherez, J., Briat, J.-F., Gaymard, F., & Cellier, F. (2008). Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in Arabidopsis. *The Plant Journal*, doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2008.03698.x, only abstract available until 27.10.2008.
- Ren, B., Tibbelin, G., Kajino, T., Asami, O., & Ladenstein, R. (2003). The multi-layered structure of Dps with a novel di-nuclear ferroxidase center. *J Mol Biol*, 329(3), 467–77.
- Richter, G. W. & Walker, G. F. (1967). Reversible association of apoferritin molecules. Comparison of light-scattering and other data. *Biochemistry*, 6(9), 2871–80.
- Richter, S. & Lamppa, G. K. (1998). A chloroplast processing enzyme functions as the general stromal processing peptidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(13), 7463–8.

- Richter, S. & Lamppa, G. K. (2003). Structural properties of the chloroplast stromal processing peptidase required for its function in transit peptide removal. *J Biol Chem*, 278(41), 39497–502.
- Rödiger, A. (2003). Die Rieske-Fe/S-Proteine aus Chloroplasten und Mitochondrien: Charakterisierung der funktionellen Domänen für Organellspezifität, Membrantransport und Assemblierung. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Rohrer, J. S., Islam, Q. T., Watt, G. D., Sayers, D. E., & Theil, E. C. (1990). Iron environment in ferritin with large amounts of phosphate, from *Azotobacter vinelandii* and horse spleen, analyzed using extended X-ray absorption fine structure (EXAFS). *Biochemistry*, 29(1), 259–64.
- Rokov-Plavec, J., Dulic, M., Duchêne, A. M., & Weygand-Durasevic, I. (2008). Dual targeting of organellar seryl-tRNA synthetase to maize mitochondria and chloroplasts. *Plant Cell Rep*, 27(7), 1157–68.
- Römheld, V. & Marschner, H. (1986). Evidence for a Specific Uptake System for Iron Phytosiderophores in Roots of Grasses. *Plant Physiol*, 80(1), 175–180.
- Rothen, A. (1944). FERRITIN AND APOFERRITIN IN THE ULTRACENTRIFUGE. STUDIES ON THE RELATIONSHIP OF FERRITIN AND APOFERRITIN; PRECISION MEASUREMENTS OF THE RATES OF SEDIMENTATION OF APOFERRITIN. *J. Biol. Chem.*, 152(3), 679–693.
- Rudhe, C., Chew, O., Whelan, J., & Glaser, E. (2002a). A novel in vitro system for simultaneous import of precursor proteins into mitochondria and chloroplasts. *Plant J*, 30(2), 213–20.
- Rudhe, C., Clifton, R., Whelan, J., & Glaser, E. (2002b). N-terminal domain of the dual-targeted pea glutathione reductase signal peptide controls organellar targeting efficiency. *J Mol Biol*, 324(4), 577–85.
- Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Savino, G., Briat, J.-F., & Lobréaux, S. (1997). Inhibition of the iron-induced ZmFer1 maize ferritin gene expression by antioxidants and serine/threonine phosphatase inhibitors. *J Biol Chem*, 272(52), 33319–26.
- Schägger, H. & von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem*, 199(2), 223–31.
- Schneider, A., Behrens, M., Scherer, P., Pratje, E., Michaelis, G., & Schatz, G. (1991). Inner membrane protease I, an enzyme mediating intramitochondrial protein sorting in yeast. *EMBO J*, 10(2), 247–54.

- Schneider, H. C., Berthold, J., Bauer, M. F., Dietmeier, K., Guiard, B., Brunner, M., & Neupert, W. (1994). Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import. *Nature*, 371(6500), 768–74.
- Schnell, D. J. & Blobel, G. (1993). Identification of intermediates in the pathway of protein import into chloroplasts and their localization to envelope contact sites. *J Cell Biol*, 120(1), 103–15.
- Schnell, D. J., Kessler, F., & Blobel, G. (1994). Isolation of components of the chloroplast protein import machinery. *Science*, 266(5187), 1007–12.
- Schünemann, D. (2007). Mechanisms of protein import into thylakoids of chloroplasts. *Biol Chem*, 388(9), 907–15.
- Szczekan, S. R. & Joshi, J. G. (1987). Isolation and characterization of ferritin from soyabeans (*Glycine max*). *J Biol Chem*, 262(28), 13780–8.
- Seckbach, J. (1968). Studies on the deposition of plant ferritin as influenced by iron supply to iron-deficient beans. *J Ultrastruct Res*, 22(5), 413–23.
- Seckbach, J. (1972). Electron microscopical observations of leaf ferritin from iron-treated *Xanthium* plants: localization and diversity in the organelle. *J Ultrastruct Res*, 39(1), 65–76.
- Seki, M., Carninci, P., Nishiyama, Y., Hayashizaki, Y., & Shinozaki, K. (1998). High-efficiency cloning of *Arabidopsis* full-length cDNA by biotinylated CAP trapper. *Plant J*, 15(5), 707–20.
- Seki, M., Narusaka, M., Kamiya, A., Ishida, J., Satou, M., Sakurai, T., Nakajima, M., Enju, A., Akiyama, K., Oono, Y., Muramatsu, M., Hayashizaki, Y., Kawai, J., Carninci, P., Itoh, M., Ishii, Y., Arakawa, T., Shibata, K., Shinagawa, A., & Shinozaki, K. (2002). Functional annotation of a full-length *Arabidopsis* cDNA collection. *Science*, 296(5565), 141–5.
- Shingles, R., North, M., & McCarty, R. E. (2002). Ferrous ion transport across chloroplast inner envelope membranes. *Plant Physiol*, 128(3), 1022–30.
- Sierzputowska-Gracz, H., McKenzie, R. A., & Theil, E. C. (1995). The importance of a single G in the hairpin loop of the iron responsive element (IRE) in ferritin mRNA for structure: an NMR spectroscopy study. *Nucleic Acids Res*, 23(1), 146–53.
- Silva-Filho, M. C. (2003). One ticket for multiple destinations: dual targeting of proteins to distinct subcellular locations. *Curr Opin Plant Biol*, 6(6), 589–95.
- Small, I., Peeters, N., Legeai, F., & Lurin, C. (2004). Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics*, 4(6), 1581–90.

- Small, I., Wintz, H., Akashi, K., & Mireau, H. (1998). Two birds with one stone: genes that encode products targeted to two or more compartments. *Plant Mol Biol*, 38(1-2), 265–77.
- Söllner, T., Pfaller, R., Griffiths, G., Pfanner, N., & Neupert, W. (1990). A mitochondrial import receptor for the ADP/ATP carrier. *Cell*, 62(1), 107–15.
- Spence, M. J., Henzl, M. T., & Lammers, P. J. (1991). The structure of a *Phaseolus vulgaris* cDNA encoding the iron storage protein ferritin. *Plant Mol Biol*, 17(3), 499–504.
- Staiger, D. (2002). Chemical strategies for iron acquisition in plants. *Angew Chem Int Ed Engl*, 41(13), 2259–64.
- Stefanini, S., Desideri, A., Vecchini, P., Drakenberg, T., & Chiancone, E. (1989). Identification of the iron entry channels in apoferritin. Chemical modification and spectroscopic studies. *Biochemistry*, 28(1), 378–82.
- Stiefel, E. I. & Watt, G. D. (1979). Azotobacter cytochrome b557.5 is a bacterioferritin. *Nature*, 279(5708), 81–3.
- Takagi, H., Shi, D., Ha, Y., Allewell, N. M., & Theil, E. C. (1998). Localized unfolding at the junction of three ferritin subunits. A mechanism for iron release? *J Biol Chem*, 273(30), 18685–8.
- Tarantino, D., Petit, J. M., Lobreaux, S., Briat, J.-F., Soave, C., & Murgia, I. (2003). Differential involvement of the IDRS cis-element in the developmental and environmental regulation of the AtFer1 ferritin gene from Arabidopsis. *Planta*, 217(5), 709–16.
- Theg, S. M., Bauerle, C., Olsen, L. J., Selman, B. R., & Keegstra, K. (1989). Internal ATP is the only energy requirement for the translocation of precursor proteins across chloroplastic membranes. *J Biol Chem*, 264(12), 6730–6.
- Theil, E. (2004). Iron, ferritin, and nutrition. *Annu Rev Nutr*, 24, 327–43.
- Theil, E. C. (1987). Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms. *Annu Rev Biochem*, 56, 289–315.
- Tonello, F., Dundon, W. G., Satin, B., Molinari, M., Tognon, G., Grandi, G., Del Giudice, G., Rappuoli, R., & Montecucco, C. (1999). The *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein is an iron-binding protein with dodecameric structure. *Mol Microbiol*, 34(2), 238–46.
- Töpfer, R., Matzeit, V., Gronenborn, B., Schell, J., & Steinbiss, H. H. (1987). A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucleic Acids Res*, 15(14), 5890.
- Torti, F. M. & Torti, S. V. (2002). Regulation of ferritin genes and protein. *Blood*, 99(10), 3505–16.

- Tranel, P. J., Froehlich, J., Goyal, A., & Keegstra, K. (1995). A component of the chloroplastic protein import apparatus is targeted to the outer envelope membrane via a novel pathway. *EMBO J*, 14(11), 2436–46.
- Treffry, A., Bauminger, E. R., Hechel, D., Hodson, N. W., Nowik, I., Yewdall, S. J., & Harrison, P. M. (1993). Defining the roles of the threefold channels in iron uptake, iron oxidation and iron-core formation in ferritin: a study aided by site-directed mutagenesis. *Biochem J*, 296, 721–8.
- Treffry, A., Zhao, Z., Quail, M. A., Guest, J. R., & Harrison, P. M. (1995). Iron(II) oxidation by H chain ferritin: evidence from site-directed mutagenesis that a transient blue species is formed at the dinuclear iron center. *Biochemistry*, 34(46), 15204–13.
- Trikha, J., Theil, E. C., & Allewell, N. M. (1995). High resolution crystal structures of amphibian red-cell L ferritin: potential roles for structural plasticity and solvation in function. *J Mol Biol*, 248(5), 949–67.
- Tsuji, Y., Ayaki, H., Whitman, S. P., Morrow, C. S., Torti, S. V., & Torti, F. M. (2000). Coordinate transcriptional and translational regulation of ferritin in response to oxidative stress. *Mol Cell Biol*, 20(16), 5818–27.
- Überlacker, B., Klinge, B., & Werr, W. (1996). Ectopic expression of the maize homeobox genes ZmHox1a or ZmHox1b causes pleiotropic alterations in the vegetative and floral development of transgenic tobacco. *Plant Cell*, 8(3), 349–62.
- van der Mark, F., Bienfait, F., & van den Ende, H. (1983a). Variable amounts of translatable ferritin mRNA in bean leaves with various iron contents. *Biochem Biophys Res Commun*, 115(2), 463–9.
- van der Mark, F., Klerk, H., & Bienfait, F. (1983b). Two higher molecular weight forms related to ferritin are synthesized in vitro by RNA from developing cotyledons and leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Molecular Biology*, 2(6), 311–315.
- van der Mark, F., van den Briel, W., & Huisman, H. G. (1983c). Phytoferritin is synthesized in vitro as a high-molecular-weight precursor. Studies on the synthesis and the uptake in vitro of the precursors of ferritin and ferredoxin by intact chloroplasts. *Biochem J*, 214(3), 943–50.
- van Wuytswinkel, O. & Briat, J.-F. (1995). Conformational changes and in vitro core-formation modifications induced by site-directed mutagenesis of the specific N-terminus of pea seed ferritin. *Biochem J*, 305, 959–65.
- van Wuytswinkel, O., Savino, G., & Briat, J.-F. (1995). Purification and characterization of recombinant pea-seed ferritins expressed in *Escherichia coli*: influence of N-terminus deletions on protein solubility and core formation in vitro. *Biochem J*, 305, 253–61.

- Vazzola, V., Losa, A., Soave, C., & Murgia, I. (2007). Knockout of frataxin gene causes embryo lethality in Arabidopsis. *FEBS Lett*, 581(4), 667–72.
- Vogel, F., Hofius, D., & Sonnewald, U. (2007). Intracellular trafficking of Potato leafroll virus movement protein in transgenic Arabidopsis. *Traffic*, 8(9), 1205–14.
- von Braun, S. S., Sabetti, A., Hanic-Joyce, P. J., Gu, J., Schleiff, E., & Joyce, P. B. (2007). Dual targeting of the tRNA nucleotidyltransferase in plants: not just the signal. *J Exp Bot*, 58, 4083–93.
- von Heijne, G. (1986). Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *EMBO J*, 5(6), 1335–42.
- von Heijne, G., Steppuhn, J., & Herrmann, R. G. (1989). Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur J Biochem*, 180, 535–45.
- Wall, M. K., Mitchenall, L. A., & Maxwell, A. (2004). Arabidopsis thaliana DNA gyrase is targeted to chloroplasts and mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(20), 7821–6.
- Wardeska, J. G., Viglione, B., & Chasteen, N. D. (1986). Metal ion complexes of apoferritin. Evidence for initial binding in the hydrophilic channels. *J Biol Chem*, 261(15), 6677–83.
- Wardrop, A. J., Wicks, R. E., & Entsch, B. (1999). Occurrence and expression of members of the ferritin gene family in cowpeas. *Biochem J*, 337, 523–30.
- Watanabe, N., Che, F. S., Iwano, M., Takayama, S., Yoshida, S., & 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(23), 20474–81.
- Wei, J. & Theil, E. C. (2000). Identification and characterization of the iron regulatory element in the ferritin gene of a plant (soybean). *J Biol Chem*, 275(23), 17488–93.
- Werhahn, W., Niemeyer, A., Jänsch, L., Kruff, V., Schmitz, U. K., & 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(2), 943–54.
- Wicks, R. E. & Entsch, B. (1993). Functional genes found for three different plant ferritin subunits in the legume, *Vigna unguiculata*. *Biochem Biophys Res Commun*, 192(2), 813–9.
- Williams, P., Hardeman, K., Fowler, J., & Rivin, C. (2006). Divergence of duplicated genes in maize: evolution of contrasting targeting information for enzymes in the porphyrin pathway. *Plant J*, 45(5), 727–39.
- Wu, C., Seibert, F. S., & Ko, K. (1994). Identification of chloroplast envelope proteins in close physical proximity to a partially translocated chimeric precursor protein. *J Biol Chem*, 269(51), 32264–71.

- Ye, H., Pilon, M., & Pilon-Smits, E. A. (2006). CpNifS-dependent iron-sulfur cluster biogenesis in chloroplasts. *New Phytol*, 171(2), 285–92.
- Yoon, T. & Cowan, J. A. (2004). Frataxin-mediated iron delivery to ferrochelatase in the final step of heme biosynthesis. *J Biol Chem*, 279(25), 25943–6.
- Young, M. E., Keegstra, K., & Froehlich, J. E. (1999). GTP promotes the formation of early-import intermediates but is not required during the translocation step of protein import into chloroplasts. *Plant Physiol*, 121(1), 237–44.
- Zancani, M., Peresson, C., Biroccio, A., Federici, G., Urbani, A., Murgia, I., Soave, C., Micali, F., Vianello, A., & Macrì, F. (2004). Evidence for the presence of ferritin in plant mitochondria. *Eur J Biochem*, 271(18), 3657–64.
- Zsigmond, L., Rigó, G., Szarka, A., Székely, G., Otvös, K., Darula, Z., Medzihradszky, K., Koncz, C., Koncz, Z., & Szabados, L. (2008). Arabidopsis PPR40 connects abiotic stress responses to mitochondrial electron transport. *Plant Physiol*, 146(4), 1721–37.

# 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),

Manuela Sondermann

# Danksagung

Ich habe diese Arbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. B. Klösgen angefertigt und möchte mich zunächst bei ihm für die Unterstützung, Kreativität und die Ideen bedanken, welche zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Prof. Dr. G.-J. Krauß und dem DFG-Graduiertenkolleg 416 (Adaptive physiologisch-biochemische Reaktionen auf ökologisch relevante Wirkstoffe) danke ich für die kritischen Anmerkungen bei den jährlichen Berichtskolloquien, sowie die langjährige, finanzielle Unterstützung.

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Dabei insbesondere bei Anja Rödiger für die methodische Unterweisung bei der Präparation von Mitochondrien und den Importexperimenten mit Mitochondrien sowie unsere gemeinsamen Aktionen z.B. zur Isolierung von Organellen aus Spinat oder aus unterschiedlich alten Erbsenpflanzen. Ein weiteres Dankeschön gilt Stefanie Max für die Unterstützung bei den letzten Importexperimenten zu den Reporterproteininfusionen. Des Weiteren gilt mein Dank Bianca Baudisch für die Unterstützung bei der biolistischen Transformation und der Fluoreszenzmikroskopie (Epifluoreszenzmikroskop und CLSM). Für die Hilfe bei der Erstellung der Kristallstrukturbilder von Ferritin danke ich René Schlesier.

Den jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Klösgen danke ich für die entspannte Arbeitsatmosphäre, die kleinen aufbauenden Gespräche und Freizeitaktivitäten wie beispielsweise Grillen. Für die Pflege der Pflänzchen gilt ein herzliches Dankeschön Herrn Platzer. Bei den technischen Angestellten bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Bewältigung der Tücken des Laboralltags.

Für ihre Freundschaft, Geduld und Hilfe möchte ich mich ganz besonders bei Peter & Yvonne Hanner, Friederike Janssen und Stefanie Max, sowie Beatrice Jakubzik, Anja Seifert und Franziska Jarczowski bedanken. Meinen herzlichen Dank an die Korrektoren Friederike, Steffi, Peter, Mario, David, Bianca und Beatrice für die geopferte Zeit, der geleisteten Rechtschreibunterstützung, sowie den Hinweisen zur Lesbarkeit der Arbeit. Eine Hilfe dabei war auch der online verfügbare Wortschatz der Universität Leipzig.

Ich bin Peter dankbar für den Tip zu L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X und seine Hilfe, sowie der des Internets bei der Lösung von Problemen, die auch bei diesem Programm nicht ausblieben.

Nicht zu vergessen sind die Kollegen des „Schreibbüros“ René, Peter und Martin, welche mir während des Schreibens u.a. mit ihrem Humor zur Seite standen.

Es ist mir wichtig, mich auch bei den Schriftstellern der von mir gelesenen Bücher für ihre Phantasie zu bedanken, welche mir mit ihren Werken sowohl meine Freizeit als auch die täglichen Straßenbahnfahrten zur Universität und wieder zurück versüßt haben.

Besonders gut gefallen mir die humorvollen Gedichte und Sprüche von Mascha Kaleko, welche einen kurzen passenden Vers verfasst hat.

Mascha Kaleko

*Das bißchen Ruhm*

Was ähnelt wohl dem bißchen Ruhme  
So sehr wie eine Treibhausblume?  
Soll dir das arme Pflänzchen sprießen,  
Mußt du es täglich brav begießen.  
Und Dünger streun. Und Unkraut jäten.  
Aufs Wetter sehn. Und leise treten.  
Doch pfeifst du drauf, so wirst du nie  
gekrönt von der A-ka-de-mie.

Meinen Eltern, Brüdern und auch der Familie meines Mannes verdanke ich viel Rückhalt und Unterstützung. Sie standen mir sowohl während des Studiums als auch der Promotion helfend zur Seite.

Bei meinem Mann David bedanke ich mich für sein umfangreiches Computerwissen, sowie seine Unterstützung in beruflichen als auch privaten Dingen, in guten wie schlechten Tagen.

# Publikationen

**Sondermann M**, Klösgen RB

Targeting of ferritins from *Arabidopsis thaliana* to plant organelles.

Manuskript in Vorbereitung

Stumpe M, Göbel C, Demchenko K, **Hoffmann M**, Klösgen RB, Pawlowski K,  
Feussner I (2006)

Identification of an allene oxide synthase (CYP74C) that leads to formation of alpha-ketols from 9-hydroperoxides of linoleic and linolenic acid in below-ground organs of potato. *Plant J*, 47(6), 883-96

Giese JO, Herbers K, **Hoffmann M**, Klösgen RB, Sonnewald U (2005)

Isolation and functional characterization of a novel plastidic hexokinase from *Nicotiana tabacum*. *FEBS Lett*, 579(3):827-31

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

---

Name	Manuela Sondermann
Anschrift	Merseburger Strasse 131, 06112 Halle/Saale
Geburtsdatum	05.07.1979
Geburtsort	Leipzig
Staatsangehörigkeit	deutsch

## Schulbildung

---

1986-1992	35. Polytechnische Oberschule, Leipzig
1992-1998	Friedrich-List-Schule - GYMNASIUM, Leipzig Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

## Studium & Tätigkeit

---

09/1998-11/2003	Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
01/2003-09/2003	Diplomarbeit: Charakterisierung des Transportverhaltens plastidärer Peptidyl-prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerasen aus <i>Arabidopsis thaliana</i>
11/2003	Abschluß: Diplom-Biochemikerin
ab 12/2003	Arbeiten zur vorliegenden Dissertation
12/2003-11/2006	Stipendiatin der Graduiertenschule 416 (Adaptive physiologisch-biochemische Reaktionen auf ökologisch relevante Wirkstoffe)
12/2006/-11/2008	wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biologie, Institutsbereich Pflanzenphysiologie

Manuela Sondermann