

---

**Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung der Vorstufenprotein  
phosphorylierenden Proteinkinase-Familie At2g17700, At4g35780 und  
At4g38470 aus *Arabidopsis thaliana***

---



München 2006

**Isolierung, Identifizierung und  
Charakterisierung der Vorstufenprotein  
phosphorylierenden Proteinkinase-Familie  
At2g17700, At4g35780 und At4g38470 aus  
*Arabidopsis thaliana***

vorgelegt von  
**Torsten Martin**

Dissertation der Fakultät für Biologie  
der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

München  
Dezember 2006

Referent: Prof. Dr. Jürgen Soll

Korreferent: PD Dr. Ute C. Vothknecht

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2006

---

<b>Abkürzungen</b>	<b>I</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Material</b>	<b>7</b>
2.1 Chemikalien	7
2.2 Enzyme	7
2.3 Vektoren	7
2.4 Oligonukleotide	7
2.5 Bakterienstämme	8
2.6 Kits für die DNA-Isolierung und Reinigung	8
2.7 Kinase-Substrate	9
2.8 Antiseren	9
2.9 Chromatographie	9
2.10 Saatgut	9
2.11 Membranen	9
2.12 Molekulargewichtsstandards und Größenmarker	10
<b>3 Methoden</b>	<b>11</b>
3.1 Allgemeine molekular- und mikrobiologische Methoden	11
3.1.1 DNA-Isolierung aus Bakterien	11
3.1.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	11
3.2 Allgemeine proteinbiochemische Methoden	12
3.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration	12
3.2.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	12
3.2.3 Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen	12
3.2.3.1 Coomassie-Färbung	12
3.2.3.2 Colloidal-Coomassie-Färbung	12
3.2.3.3 Silberfärbung	13
3.2.4 Membrantransfer von Proteinen (Western-Blot)	13
3.3 Anreicherung der zytosolischen Vorstufenprotein-Kinase aus <i>A. thaliana</i>	14
3.3.1 Chromatographische Methoden	14
3.3.1.1 Hydrophobe Interaktionschromatographie	14
3.3.1.2 Anionenaustauschchromatographie	15
3.3.1.3 Gelfiltrationschromatographie	15
3.4 Proteinsequenzierung	16
3.5 <i>In vitro</i> Phosphorylierung	16

---

<b>3.6 Expression und Reinigung heterolog exprimierter Proteine</b>	<b>16</b>
3.6.1 Proteinexpression im pET-System und Aufreinigung von „Inclusionbodies“	16
3.6.2 Lösliche Expression und Reinigung von AT2g17700, At4g35780 und At4g38470	17
<b>3.7 Arbeiten mit Nukleinsäuren</b>	<b>18</b>
3.7.1 Klonierung der <i>A. thaliana</i> Gene At2g17700, At4g35780 und At4g38470	18
3.7.2 Isolierung genomischer DNA aus <i>A. thaliana</i> Blättern	18
<b>3.8 Arbeiten mit Immunglobulinen</b>	<b>19</b>
3.8.1 Nachweis von Antigenen auf Nitrozellulose-Membranen	19
3.8.2 Depletion von <i>A. thaliana</i> Blattextrakt durch $\alpha$ -At2g17700	19
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>20</b>
<b>4.1 Isolierung und Identifikation der Vorstufenprotein-Kinase</b>	<b>20</b>
<b>4.2 At2g17700 gehört zu einer kleinen Proteinkinase-Familie</b>	<b>25</b>
4.2.1 Rekombinante Expression und Reinigung der Proteinkinasen	28
<b>4.3 Biochemische Charakterisierung der Proteinkinasen At2g17700, At4g35780 und At4g38470</b>	<b>30</b>
4.3.1 Mutiertes At4g38470 phosphoryliert ausschließlich pSSU in seinem Transitpeptid als einziges chloroplastidäres Vorstufenprotein	37
4.3.2 AtMPK6 phosphoryliert sowohl pSSU als auch pSSU (M31/34)	39
<b>4.4 In-vivo-Analyse der Vorstufenprotein phosphorylierenden Proteinkinasen</b>	<b>41</b>
4.4.1 Knock-out-Pflanzen von At2g17700 und At4g35780 zeigen eine reduzierte Phosphorylierung von pSSU	45
<b>5 Diskussion</b>	<b>48</b>
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>54</b>
<b>7 Literatur</b>	<b>56</b>

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Proteinimports in Chloroplasten	4
Abbildung 2: Chromatographische Reinigung der Vorstufenprotein phosphorylierenden Proteinkinase aus <i>Arabidopsis thaliana</i> Blättern	21
Abbildung 3: Elektrophoretische Auftrennung der gepoolten Gelfiltrations-Fractionen.	24
Abbildung 4: Aminosäuresequenz der Proteinkinase At2g17700	25
Abbildung 5: Alignment der <i>A. thaliana</i> Kinasen At2g17700, At4g35780 und At4g38470	26
Abbildung 6: Genexpression von At2g17700, At4g35780 und At4g38470 in unterschiedlichen Organen.	27
Abbildung 7: Affinitätschromatographische Reinigung der heterolog exprimierten <i>A.thaliana</i> Proteinkinasen At2g17700, At4g35780 und At4g38470	29
Abbildung 8: Zeitabhängige Phosphorylierung von pSSU	30
Abbildung 9: Bestimmung der $S_{0,5}$ -Werte für ATP	31
Abbildung 10: Hemmung der pSSU Phosphorylierung durch ADP	33
Abbildung 11: Substratspezifität der <i>A. thaliana</i> Proteinkinasen At2g17700, At4g35780 und At4g38470	35
Abbildung 12: Aminosäuresequenz der Proteinkinase At4g38470-M368	37
Abbildung 13: Substratspezifität der <i>A. thaliana</i> Proteinkinase At4g38470-M368	38
Abbildung 14: Phosphorylierung von pSSU und pSSU (M31/34) durch At2g43790	40
Abbildung 15: T-DNA Insertionslinien SALK_072890 und SALK_139687	41
Abbildung 16: PCR an genomischer DNA zur Überprüfung der T-DNA Insertion	42
Abbildung 17: Bestimmung des Molekulargewichtes von At2g17700 <i>in vivo</i>	44
Abbildung 18: Phosphorylierung von pSSU durch Blattextrakt von <i>A. thaliana</i> Wildtyp- Pflanzen und Blattextrakt gewonnen aus homozygoten T-DNA Insertionslinien SALK_072890 und SALK_139687	45
Abbildung 19: Inhibierung der Enzymaktivität der Vorstufenprotein phoyphorylierenden Proteinkinasen im Blattextrakt von <i>A. thaliana</i> Wildtype-Pflanzen durch $\alpha$ - At2g17700	46

## Abkürzungen

AP	Alkalische Phosphatase
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat-p-Toludinsalz
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Hepes	2-[4-(Hydroxyethyl)-1-Piperaziny]-Ethansulfonsäure
Hsp	Hitzeschockprotein
IgG	Immunglobulin G
LHCP	Lichtsammelkomplexe
LSU	Große Untereinheit der Rubisco
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
NBT	4-Nitrotetrazoliumchloridblau-Hydrat
OE	Protein des sauerstoffproduzierenden Komplexes
ORF	open reading frame
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
psi	pounds per square inch (Pfund pro Quadrat Zoll)
pSSU	Vorstufenprotein von SSU
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SSU	Kleine Untereinheit der Rubisco
TCA	Trichloressigsäure
Tic	Translokone der inneren Hüllmembran von Chloroplasten
Toc	Translokone der äußeren Hüllmembran von Chloroplasten
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
v/v	Volumen zu Volumen Verhältnis
w/v	Masse zu Volumen Verhältnis

# 1 Einleitung

Die Entwicklung zu eukaryotischen Zellen begann vor ca. 1-2 Milliarden Jahren (Butterfield, 2000; Dolezal et al., 2006). Sie unterscheiden sich maßgeblich von prokaryotischen Zellen durch ihre Unterteilung in unterschiedliche Kompartimente. Diese Kompartimente sind umgeben von Membranen, von denen die meisten impermeabel für Makromoleküle sind. Einige dieser Kompartimente gingen aus Endosymbionten hervor (Margulis, 1971). Die heutigen Mitochondrien entwickelten sich durch die Aufnahme eines bis dahin frei lebenden  $\alpha$ -Proteobakterium durch eine Wirtszelle. Durch ein zweites endosymbiontisches Ereignis entstanden die charakteristischen Organellen eukaryotischer phototropher Organismen, die Chloroplasten. Ihr Ursprung ist zurückzuführen auf die Aufnahme eines Vorfahren der heutigen Cyanobakterien (Cavalier-Smith, 2000; Stoebe und Maier, 2002; Timmis et al., 2004).

Im Verlauf der Evolution fand ein massiver Gentransfer von den aufgenommenen Prokaryoten in den Zellkern der Wirtszelle statt (van Dooren et al., 2001). Bei den heutigen modernen Pflanzen wird das Proteom der Chloroplasten auf 3500-4000 Polypeptide geschätzt, wohin das Chloroplastengenom nur 60-200 offene Leserahmen enthält. (Leister, 2003) Diese Entwicklung war nur möglich, weil die Wirtszelle einen effektiven Mechanismus für den Proteinimport von chloroplastidären Proteinen, welche nun im Cytosol synthetisiert werden, entwickeln konnte. Vor dem Transfer des Chloroplastengenoms fand vermutlich ein Gentransfer von den Mitochondrien statt, die ihrerseits ebenfalls posttranslationale Proteinzielsteuerungssysteme und Proteinimportmechanismen benötigen. Das Proteinimport-System von Chloroplasten musste daher Merkmale besitzen, die sich von den Importsystemen der anderen Organellen unterscheiden, um eine fehlerhafte Zielsteuerung von im Chloroplasten lokalisierten Proteinen zu vermeiden.

Der Importprozess benötigt eine Reihe löslicher, zytosolischer und stromaler Faktoren und einige membranassoziierte und integrale Komponenten. Die meisten dieser Proteine sind bekannt und gut untersucht (Chen und Schnell, 1999; Jarvis und Soll, 2001; Keegstra und Cline, 1999). Proteine, welche für den posttranslationalen Import in Chloroplasten vorgesehen sind, unterscheiden sich maßgeblich in zwei Eigenschaften. Der überwiegende Teil der plastidären Vorstufenproteine, welche an zytosolischen Ribosomen translatiert wird, trägt eine N-terminale Extension, genannt Transitpeptid oder Transitsequenz. Das Transitpeptid ist sowohl notwendig als auch ausreichend für die Zielsteuerung zum Plastid und den Import in

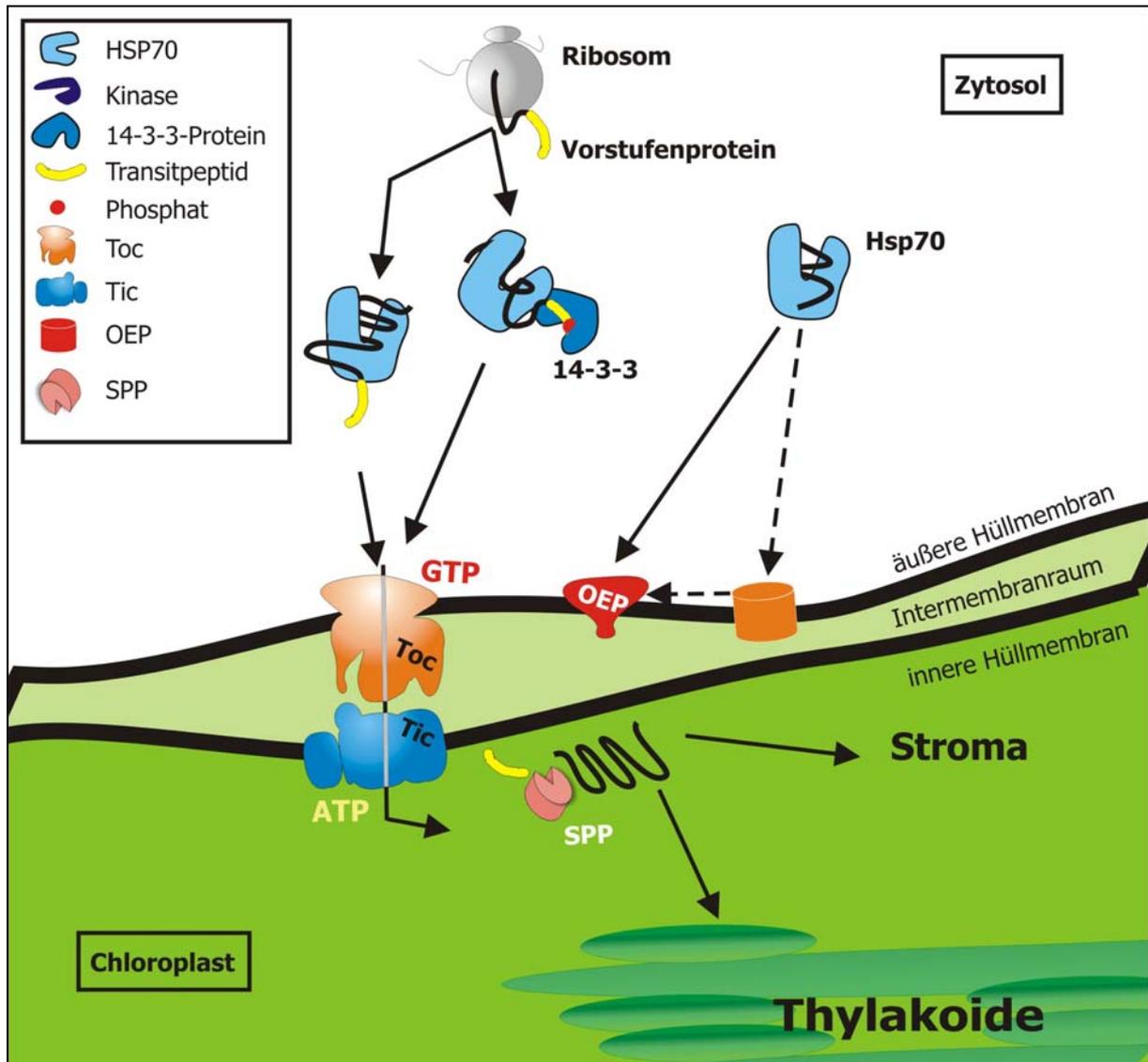
das Organell (Dobberstein et al., 1977). Die Transitsequenz wird nach erfolgtem Import in das Organell von einer stromalen Peptidase abgespalten (Soll und Schleiff, 2004). Ein gemeinsames Motiv für chloroplastidäre Transitsequenzen wurde bislang noch nicht identifiziert. Es gibt keine oder wenig Übereinstimmung in der Zusammensetzung oder der Länge der Transitsequenz. Trotzdem konnten ein paar generelle Eigenschaften identifiziert werden (Emanuelsson und von Heijne, 2001; von Heijne und Nishikawa, 1991). Allgemein variieren die Transitpeptide zwischen 20-150 Aminosäuren. Sie sind angereichert mit hydroxylierten Aminosäuren wie Serin oder Threonin. Die weitere Zusammensetzung besteht aus kleinen hydrophoben Aminosäuren. Dies resultiert im Allgemeinen in eine positive Ladung des Peptids (Bruce, 2001). Die meisten Proteine, die in der Membran oder im Lumen der Thylakoide lokalisiert sind, besitzen ein zweiteiliges Zielsteuerungssignal.

Eine zweite Klasse an chloroplastidären Proteinen besitzt kein abspaltbares Transitpeptid. Die Information für die korrekte Zielsteuerung zu den Chloroplasten liegt in der Aminosäuresequenz des maturen Proteins. Zu diesen Proteinen gehören fast alle Polypeptide der äußeren Hüllmembran und zwei Proteine der inneren Hüllmembran von Chloroplasten Tic32 und ceQORH (Hofmann und Theg, 2005; Miras et al., 2002; Nada und Soll, 2004). Nach der Synthese der Proteine binden in der Regel zytosolische Chaperone der Hsp70-Familie an die zu importieren Proteine (Rial et al., 2000). Diese Chaperone binden sowohl an Proteine mit Transitpeptid als auch an Proteine ohne Transitpeptid. Sie bewirken, dass die Polypeptide in einem ungefalteten Zustand bleiben (Waegemann, 1990). Im Gegensatz zu Proteinen, welche in Peroxisomen oder den Zellkern importiert werden, müssen chloroplastidäre Proteine ungefaltet sein, um für die Translokation kompetent zu sein (Gorlich, 1998; Heiland und Erdmann, 2005; Jackson-Constan et al., 2001) Die Bindung an Chaperone bewirkt außerdem, dass die biologische Funktion der chloroplastidären Proteine nicht im falschen Kompartiment, dem Zytosol, ausgeübt wird (May und Soll, 2000). Nicht nur chloroplastidäre Vorstufenproteine binden posttranslational an Hsp70-Chaperone. Proteine, welche für den Import in Mitochondrien oder das endoplasmatische Retikulum vorgesehen sind, binden ebenfalls an Hitzeschockproteine der Hsp70 Klasse (Deshaies et al., 1988; Zimmermann et al., 1988).

An der Oberfläche der Chloroplasten werden die Vorstufenproteine durch die Rezeptoren des TOC-Komplexes (translocon of the outer envelope of chloroplast) erkannt. Der TOC-Komplex ist für die Translokation der Vorstufenproteine in das Organell verantwortlich. Der Kernkomplex besteht aus den Komponenten TOC159, TOC75 und TOC34. Die GTP

regulierten Rezeptoren TOC34 und TOC159 erkennen die Vorstufenproteine und schleusen sie unter GTP Hydrolyse zur Pore weiter (Kessler und Schnell, 2004). Die Pore, durch welche die Vorstufenproteine geschleust werden, wird durch TOC75 gebildet (Tranel et al., 1995). Der Transport durch die innere Hüllmembran von Chloroplasten wird durch den TIC-Komplex (translocon of the inner envelope of chloroplast) ermöglicht. Mehrere Untereinheiten des Komplexes wurden bereits identifiziert. Zu ihnen gehören: TIC110, TIC62, TIC55, TIC40, TIC32, TIC22 und TIC20. Das zentrale Protein des Translokons ist TIC110. Es bildet *in vitro* die Pore durch die die Vorstufenproteine in den Chloroplasten geschleust werden (Heins et al., 2002). In den meisten Fällen wird das zu importierende Protein wahrscheinlich simultan über den TOC/TIC-Komplex in das Organell gebracht. Die Energie für den Importprozess wird, im Gegensatz zu dem Transport über die innere Membran von Mitochondrien, nicht durch ein Membranpotential zur Verfügung gestellt. Als Energiequelle für den Transport über die äußere Hüllmembran von Chloroplasten dient *in vitro* die Hydrolyse von GTP durch TOC159 für die Translokation (Rehling et al., 2004; Schleiff et al., 2003). Durch die Hydrolyse von ATP werden die Vorstufenproteine über die innere Hüllmembran geschleust (Jarvis und Soll, 2002; Soll und Schleiff, 2004).

Die überwiegende Mehrheit der Proteine, die in Chloroplasten importiert werden, besitzt ein N-terminales Transitpeptid und wird über den TOC/TIC-Komplex in das Organell gebracht. Eine Vielzahl dieser Proteine kann von einer im Zytosol lokalisierten Proteinkinase in ihrem Transitpeptid an einem Serin oder Threonin ATP-abhängig phosphoryliert werden. Die genaue Position der Phosphorylierung hängt von dem jeweiligen Vorstufenprotein ab. Proteine, die für den Import in Pflanzen-Mitochondrien bestimmt sind und ebenfalls ein N-terminales Transitpeptid besitzen, werden von dieser Protein-Kinase nicht phosphoryliert. Die Proteinkinase kommt ausschließlich in Pflanzen vor. Nur Extrakte, welche aus Pflanzen gewonnen wurden, waren in der Lage chloroplastidäre Vorstufenproteine zu phosphorylieren. Aus Retikulozyten gewonnene Extrakte konnten keine Phosphorylierung der Vorstufenproteinen herbeiführen (Waegemann und Soll, 1996). Das Aminosäure-Motiv, welches die Phosphorylierungsstelle umgibt, ist dem Phosphopeptid-Binde-Motiv für 14-3-3 Proteine ähnlich (May und Soll, 2000). 14-3-3-Proteine aus Pflanzen interagieren spezifisch mit Vorstufenproteinen, die in Weizenkeimlysat synthetisiert worden. Die Interaktion des 14-3-3-Proteins mit dem chloroplastidären Vorstufenprotein benötigt eine intakte



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des Proteinimports in Chloroplasten**

Die Mehrzahl der Proteine, die der Chloroplast benötigt, werden an zytosolischen Ribosomen synthetisiert. Posttranslational werden sie in das Organell importiert. Die Vorstufenproteine können im Zytosol von Pflanzenzellen in ihrem N-terminalen Transitpeptid phosphoryliert werden. Dies führt zur Assemblierung des Guidance-Komplexes, welcher aus dem Vorstufenprotein, einem Hsp70-Chaperon und einem 14-3-3-Protein-Dimer besteht. Alternativ können nicht phosphorylierte Vorstufenproteine ausschließlich an ein Hsp70-Chaperon binden. Beide Komplexe binden GTP-abhängig an die Rezeptoren des TOC-Komplexes. Die Vorstufenproteine werden über den TOC/TIC-Komplex in den Chloroplasten transportiert, in dessen Stroma das Transitpeptid von einer stromalen Peptidase (SPP) abgespalten wird. Die fertigen Proteine entfalten ihre biologische Funktion im Stroma der Chloroplasten oder werden über verschiedene Importwege in die Thylakoide importiert. Polypeptide ohne ein abspaltbares Transitpeptid binden ebenfalls an Hsp70 und inserieren spontan in die äußere Hüllmembran von Chloroplasten. An diesem Prozess sind vermutlich noch weitere Proteine beteiligt. OEP, outer-envelope protein (Protein der äußeren Hüllmembran); SPP, stromal processing peptidase

Phosphorylierungsstelle innerhalb des Transitpeptids. Wenn die Vorstufenproteine anstatt in Weizenkeimlysat in Reticulozytenlysate synthetisiert werden, findet ebenfalls keine Interaktion mit 14-3-3-Proteinen statt.

Analog dazu wurde gezeigt, dass Vorstufenproteine, die in Pflanzen-Mitochondrien importiert werden, mit 14-3-3-Proteinen aus Reticulozytenlysate interagieren. Es findet jedoch keine Interaktion von Vorstufenproteinen, die für den Import in Pflanzen-Mitochondrien bestimmt sind, mit 14-3-3-Proteinen aus Weizenkeimlysate statt. Die Phosphorylierung der chloroplastidären Vorstufenproteine führt zur Assemblierung eines so genannten „Guidance Komplexes“, der aus dem Vorstufenprotein, einem 14-3-3-Protein und einem Hsp70-Caperon besteht (Abbildung 1).

Das 14-3-3-Protein liegt als Dimer in dem Komplex vor. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Vorstufenproteine, welche in ihrem Transitpeptid phosphoryliert wurden, mit einer höheren Rate importiert werden. Im Vergleich zu Vorstufenproteinen, welche nicht mit den Komponenten des Guidance-Komplexes assoziiert sind, liegt die Importrate von phosphorylierten Vorstufenproteinen 3-4-mal höher (May und Soll, 2000). Phosphorylierte Vorstufenproteine sind jedoch nicht in der Lage in den Chloroplasten zu importieren, obwohl die Erkennung der Vorstufenproteine an der Chloroplastenoberfläche nicht beeinträchtigt ist. Die Translokation des Vorstufenproteins stoppt in einem frühen Stadium des Import-Prozesses solange das Transitpeptid phosphoryliert ist. Eine Fortsetzung der Translokation findet nur nach Dephosphorylierung der Transitsequenz, durch eine bislang nicht identifizierte Phosphatase statt (May und Soll, 1999). Diese Beobachtungen werden von Becker und Mitarbeiter bestätigt. Sie zeigten, dass in der Transitsequenz phosphoryliertes pSSU an den primären Rezeptor des TOC-Komplexes, TOC34, bindet (Becker et al., 2004b). Eine Translokation des Vorstufenproteins in TOC-Proteoliposomen findet daraufhin nicht statt. Der nachgeschaltete Rezeptor TOC159 bindet das phosphorylierte Vorstufenprotein nicht. Nicht phosphoryliertes pSSU interagiert jedoch mit TOC159. Zusätzlich wird die GTPase-Aktivität von TOC159 durch die Bindung mit dem dephosphorylierten Vorstufenprotein stimuliert. Die Hydrolyse von GTP stellt daraufhin die nötige Energie für den Transport des Vorstufenproteins durch den Kanal zur Verfügung (Becker et al., 2004a; Schleiff et al., 2003). Die inhibitorische Wirkung der Phosphorylierung des Transitpeptids auf den Import ist nicht ausschließlich auf Chloroplasten beschränkt. Der Import von verschiedenen nukleären Proteinen kann ebenfalls durch die Phosphorylierung eines Serins oder Threonins nahe dem

nukleären Lokalisierungssignal inhibiert werden (Hennekes et al., 1993; Moll et al., 1991; Yang et al., 1999).

Die Phosphorylierung der Transitpeptide ist nicht direkt involviert in die Zielsteuerung zu den Chloroplasten. Die Mutation der Phosphorylierungssequenz im Transitpeptid von Vorstufenproteine resultiert *in vitro* nicht in eine fehlerhafte Sortierung der Polypeptide in das falsche Kompartiment (Soll und Schleiff, 2004). Allgemein ist jedoch bekannt, dass die Phosphorylierung von Proteinen durch Kinasen in Pflanzen wichtige Funktionen übernehmen. Proteinkinasen sind beteiligt bei der Koordination des Zellwachstums und der Zellteilung (Ingram und Waites, 2006). Über die Signaltransduktion durch Kinasen reagieren Pflanzen auf ihre Umwelt. So spielt die Phosphorylierung von Proteine bei der Stressantwort (Salzstress, Verletzungen, Trockenheit, Pathogeninfektion) eine entscheidende Rolle (Bogre et al., 1999; Jonak et al., 1996; Tena et al., 2001). Auch bei der Signalübermittlung durch Pflanzenhormonen sind Proteinkinasen beteiligt (Benavente und Alonso, 2006; Jonak et al., 1994; Zhang et al., 2006). Dabei wird der Phosphorylierungszustand der Polypeptide dynamisch durch sowohl Proteinkinasen als auch Phosphatasen kontrolliert. (Mizoguchi et al., 2006). Bei den Proteinkinasen unterscheidet man zwischen zwei Enzymfamilien: die Tyrosin-Kinasen und die Serin/Threonin-Kinasen, wobei bislang noch keine reinen Tyrosin-Kinasen aus Pflanzen kloniert wurden (Hanks et al., 1988; Hanks und Quinn, 1991; Rudrabhatla et al., 2006). Die Proteinkinasen in Pflanzen umfassen eine sehr große Gruppe von Enzymen, von denen größtenteils die genaue Funktion unbekannt ist. Gegenwärtige Annotationen von Proteinfamilien in *A. thaliana* berichten von 1053 Kinasen, was ungefähr 4% der gesamten Arabidopsis Proteine entspricht (Peck, 2006).

Das Wissen, welche Kinase bei welcher Antwort aktiviert wird und welche Proteine die jeweiligen Substrate darstellen, ist immens wichtig, um ein großes Spektrum biologischer Prozesse zu verstehen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die bislang unbekannte Proteinkinase, welche für die spezifische Phosphorylierung von chloroplastidären Vorstufenproteinen verantwortlich ist, aus *Arabidopsis thaliana* zu isolieren und zu identifizieren.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in höchster Qualität von Sigma Aldrich (München), Roth (Karlsruhe), Roche (Penzberg) und Merck (Darmstadt) bezogen.

Radiochemikalien wurden von Amersham Biosciences (Freiburg) gekauft.

### 2.2 Enzyme

Die verwendeten Enzyme wurden von den Firmen MBI Fermentas (St.Leon-Rot), New England Biolabs (Boston, USA) und Eppendorf (Hamburg) bezogen.

### 2.3 Vektoren

Vektor Name	Hersteller
pTrcHis2/TOPO TA	Invitrogen
pCR8/GW/TOPO	Invitrogen
pet11c	Novagen

### 2.4 Oligonukleotide

Für die Klonierung von At2g17700, At4g35780 und At4g38470 in pTRCHis2/TOPO wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

Primer für At2g17700

**Name:** TM at2g17700for **Sequenz:** ATGACGATCAAAGATGAGTCGGAGAGT T

**Name:** TM at2g17700rev **Sequenz:** CACTACGACGTT TACCTCTTTCATTATCTGTT

Primer für At4g35780

**Name:** At4g35780 for **Sequenz:** ATGGCGATCAAAGAGGAGACGGAGGAGAGTT

**Name:** At4g35780 rev **Sequenz:** ACCATGTTTATCCTTGTGGCGCTCATCATCTCCAAC

Primer für At4g38470

**Name:** At4g38470 for **Sequenz:** ATGGTGATGGAGGACAACGAGAGTTGCGCTAGT

**Name:** At4g38470 rev **Sequenz:** ATGATGTGTGGTGCTTCTCCTCAGGGCTGCAAATA

Zur Identifizierung von T-DNA Insertionsmutanten wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

Für Salk\_072890 (KO At2g17700)

**Name:** 1334-forintron2at2g17 **Sequenz:** TCT TTCGCTTAGATTATTCAATTTTGTT

**Name:** 1178-Revexon4at2g17700 **Sequenz:** ACCAAAAGTTGGAGGAGCAAGAA

**Name:** LBa1 **Sequenz:** tggttcacgtagtgggcatcg

Für Salk\_139687 (KO At4g35470)

**Name:** 1368-at4g35exon3 **Sequenz:** GGATCAACGTCACCAGAATTTC

**Name:** 1369-at4g35genomic **Sequenz:** CATAATTACACCCTCTCTCTCTCTCTC

**Name:** LBa1 **Sequenz:** tggttcacgtagtgggcatcg

## 2.5 Bakterienstämme

Es wurden die *E.coli*-Stämme DH5 $\alpha$  von GibcoBRL (Eggenstein) und BL21 DE3 von Novagen (Madison, USA) verwendet.

## 2.6 Kits für die DNA-Isolierung und Reinigung

Zur DNA-Isolierung wurden das Plasmid-Midi-Kit von Macherey und Nagel (Düren), sowie das Plasmid-Mini-Kit von Eppendorf (Hamburg) verwendet.

Für die Reinigung von Nukleinsäuren wurde das NucleoSpin Extract II von Macherey und Nagel (Düren) verwendet.

## 2.7 Kinase-Substrate

Plasmide für die heterologe Überexpression von pSSU, pSSU M31/34, pOE33, pOE23, pOE23 M22, iOE23 und pF1 $\beta$  wurden von Waegemann und Soll beschrieben (Waegemann und Soll, 1996)

## 2.8 Antiseren

Primäre Antikörper gegen At2g17700 ( $\alpha$ -At2g17700) und At4g35780 ( $\alpha$ -At4g35780) wurden durch Injektion des in *E. coli* exprimierten, gereinigten Antigens in Hasen gewonnen. Die Injektionen sowie die Tierhaltung wurden von BioGenes (Berlin) übernommen.

Sekundäre Antikörper gegen Hasen-IgG in Ziege wurden von Sigma (München) gekauft.

## 2.9 Chromatographie

Für die 6xHis-Affinitätschromatographie wurde Ni-NTA<sup>2+</sup> Säulenmaterial von Qiagen (Hilden) verwendet.

Alle anderen verwendeten Säulenmaterialien sowie die entsprechenden Säulen wurden von Amershambiosciences (Freiburg) bezogen.

Für die automatisierte Chromatographie wurde das ÄKTA-FPLC-System von Amersham Biosciences (Freiburg) verwendet.

## 2.10 Saatgut

Wildtype Pflanzen von *A. thaliana* Ecotyp Columbia (Col-0) wurden von Lehle (Round Rock, USA) verwendet. T-DNA Insertions-Linien von *A. thaliana* wurden von The Salk Institute for Biological Studies (La Jolla, USA) bezogen.

## 2.11 Membranen

Nitrozellulose-Membranen (Protran BA-S83, 0,2 $\mu$ m) wurden von der Firma Schleicher & Schüll (Dassel), PVDF-Membranen (Hybond<sup>TM</sup> -PVDF) von der Firma Amersham Biosciences (Freiburg) geliefert.

## **2.12 Molekulargewichtsstandards und Größenmarker**

Für die denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese werden der MW-SDS-700L Firma Sigma (München) als Molekulargewichtsstandard eingesetzt. Als Größenmarker für die Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren dient EcoRI/HindIII verdaute Phagen  $\lambda$  DNA von MBI Fermentas (St. Leon-Rot).

## **3 Methoden**

### **3.1 Allgemeine molekular- und mikrobiologische Methoden**

#### **3.1.1 DNA-Isolierung aus Bakterien**

Für die Isolierung von extrachromosomalen Plasmiden aus prokaryotischen Organismen wurden Kulturen (3 ml), welche in einem Komplexmedium mit dem entsprechen Selektionsantibiotikum über Nacht bei 37° C gewachsen waren, verwendet.

Die Isolierung von Plasmiden aus Bakterienkulturen erfolgte entweder nach der ‚Rapid-boiling‘ Methode von Del Sal und Mitarbeiter (Del Sal et al., 1988) oder durch alkalische Lyse nach Birnboim und Mitarbeiter (Birnboim und Doly, 1979)

#### **3.1.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Die standardisierte PCR erfolgt in einem 100 µl Reaktionsansatz unter folgenden Bedingungen: 1-2 U thermostabile DNA-Taq-Polymerase, je 50-125 µM dNTPs, 100pmol der entsprechenden Oligonukleotide, 10-100 ng der zu amplifizierenden Plasmid-DNA als Matrize. Die Pufferbedingungen werden nach Angaben des Herstellers (Eppendorf, Hamburg) der DNA-Taq-Polymerase eingestellt. Die Amplifikation erfolgt in 30-40 Zyklen für je 60 Sekunden bei 94°C zur Denaturierung der Plasmid-DNA, 30 Sekunden bei 42-58°C zur Hybridisierung der Oligonukleotide mit der Matrize und je nach Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments 60-180 Sekunden bei 68-72°C zur Synthese der DNA. Die Amplifikation wird mit 10% des PCR-Ansatzes mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

## **3.2 Allgemeine proteinbiochemische Methoden**

### **3.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Bestimmung des Proteingehalts wird entsprechend der Methode von Lowry (Lowry et al., 1951) oder mit Hilfe des Bradford-Protein-Assays (Biorad, USA) durchgeführt (Bradford, 1976).

### **3.2.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in denaturierenden Polyacrylamidgelen erfolgte im diskontinuierlichen Gelsystem nach Laemmli (Laemmli, 1970). Es wurden Trenngele einer Acrylamidkonzentration von 10 - 15 % (w/v) verwendet. Die Proteinproben wurden vor der Elektrophorese in vierfach konzentriertem Probenpuffer (Laemmli-Puffer) solubilisiert und für 90 Sekunden bei 95°C inkubiert.

### **3.2.3 Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen**

#### **3.2.3.1 Coomassie-Färbung**

Im Anschluss an die Trennung der Proteine durch SDS-PAGE erfolgte eine Färbung mit Coomassie. Dazu wurden die Gele zunächst für 15 min in Färbelösung (40 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Eisessig, 0,18 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250) inkubiert und anschließend der unspezifisch gefärbte Hintergrund mit Entfärber (40 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Eisessig, 3 % (v/v) Glycerin) entfernt.

#### **3.2.3.2 Colloidal-Coomassie-Färbung**

Um eine höhere Sensitivität bei Coomassie gefärbten Gelen zu erlangen wurde eine Colloidal-Coomassie-Färbung nach Neuhoff durchgeführt (Neuhoff et al., 1988). Dazu wurde eine wässrige Lösung mit 0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 10% (w/v)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2% (w/v)  $\text{H}_3\text{PO}_4$  angesetzt. Zur Färbung der Gele wurde diese Lösung 4:1 mit Methanol (tech) verdünnt. Es folgte eine Inkubation für 10-15 Stunden. Um die Hintergrundfärbung zu reduzieren wurde kurz mit  $\text{H}_2\text{O}$  (bidest) entfärbt.

### **3.2.3.3 Silberfärbung**

Zur Anfärbung gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine mit Silbernitrat wurden die Proteine zunächst durch Inkubation in 40 % Methanol (v/v), 7 % Essigsäure (v/v), 3 % Glycerin fixiert und anschließend nach Blum (Blum et al., 1987) angefärbt.

### **3.2.4 Membrantransfer von Proteinen (Western-Blot)**

Über SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden auf Nitrozellulose-Membranen mit Hilfe einer „semi-dry-blot“-Apparatur (Amershambiosciences, Freiburg) transferiert (Towbin et al., 1979) Der Aufbau des Western-Blots war sandwichartig und bestand aus sechs Filterpapiere (Whatman 0,2mm), getränkt in Kathodenpuffer (25 mM Tris/HCl pH 7.6; 4 mM Aminocaprinsäure, 20% Methanol), den in Kathodenpuffer getränktem Acrylamidgel, gefolgt von der in Anodenpuffer II (25 mM Tris/HCl pH 10.4; 20% Methanol) getränkten Nitrozellulose-Membran. Darüber wurden sechs in Anodenpuffer II getränkte Whatman-Papiere und sechs in Anodenpuffer I (0,3 M Tris/HCl pH 10.4; 20% Methanol) getränkte Filterpapiere gelegt. Es wurde für 45-60 Minuten transferiert. Die angelegte Stromstärke war abhängig von der Fläche des zu transferierenden Gels. Der Koeffizient zur Berechnung der angelegten Stromstärke betrug 0,8. Er wurde mit der Fläche der Membran multipliziert.

### **3.3 Anreicherung der zytosolischen Vorstufenprotein-Kinase aus *A. thaliana***

Als Ausgangsmaterial der chromatographischen Anreicherung der Vorstufen-Protein-Kinase wurden Blätter von *Arabidopsis thaliana* Ecotype Columbia verwendet. Das Blattmaterial wurde in einem handelsüblichen Mixer unter Zugabe von PS-A (20 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) zerkleinert. Der gewonnene Blattextrakt wurde durch vier Lagen Mull und zwei Lagen Gaze (Schweizer Tuch) gefiltert. Es folgten zwei Zentrifugationen für 15 Minuten bei 48000 g und für 30 Minuten bei 150000 g. Der Überstand wurde für die chromatographische Anreicherung verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C oder auf Eis durchgeführt.

#### **3.3.1 Chromatographische Methoden**

Für die chromatographische Anreicherung der Vorstufen-Protein-Kinase wurde eine ÄKTA-FPLC (Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet. Für die Reinigung heterolog exprimierter Proteine wurde eine nicht automatisierte Ni-NTA<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie eingesetzt. Alle Chromatographien wurden bei 4°C durchgeführt. Die verwendeten Puffer wurden durch Nitrocellulose (Amersham Biosciences, Freiburg) filtriert und entgast. Die angegebenen pH-Werte der Puffer wurden bei 4°C eingestellt.

##### **3.3.1.1 Hydrophobe Interaktionschromatographie**

Für die hydrophobe Interaktionschromatographie wurde Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow low sub (Pharmacia, Uppsala Schweden) eingesetzt. Als Säule diente eine HR 10/10 (Amersham Biosciences AB, Uppsala Schweden). Das aus *Arabidopsis thaliana* gewonnene Ausgangsmaterial wurde auf 1 M NaCl eingestellt und auf die Säulenmatrix geladen, die zuvor in Puffer PS-B (20 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 M NaCl, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) equilibriert wurde. Die Flussrate betrug 2 ml/min. Nach der Anbindung der Proteine wurde die Säulenmatrix mit 2 Säulenvolumen PS-B gewaschen. Gebundene Proteine wurden durch einen Gradienten von 100% PS-B gegen 100% PS-A eluiert. Die Länge des Gradienten betrug

5 Säulenvolumen. Die Fraktionsgröße betrug 5 ml. Alle Fraktionen, in denen Kinaseaktivität nachzuweisen war wurden vereinigt

### **3.3.1.2 Anionenaustauschchromatographie**

Die vereinigten Fraktionen der Phenyl-Sepharose Chromatographie wurden mit Puffer MQ-A (20 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) 1:3 verdünnt um die Salzkonzentration zu erniedrigen. Für die Anionenaustauschchromatographie wurde das Säulenmaterial Mono Q (Amersham Biosciences AB, Uppsala Schweden) verwendet, welche zuvor in Puffer MQA equilibriert wurde. Als Säule diente eine HR 5/5 (Amersham Biosciences AB, Uppsala Schweden).

Die Säulenmatrix wurde bei einer Flußrate von 1 ml/min mit den verdünnten Phenyl-Sepharose Fraktionen beladen. Nach dem Waschen der Säule mit 4 Säulenvolumen Puffer A wurden gebundene Proteine durch einen steigenden Gradienten von 0 mM NaCl bis 500 mM NaCl über 2 Säulenvolumen eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen von 0,5 ml gesammelt.

### **3.3.1.3 Gelfiltrationschromatographie**

Die aus der Anionenaustauschchromatographie gewonnenen Fraktionen wurden nicht vereinigt, sondern jeweils einzeln auf die Gelfiltrationschromatographiematrix geladen. Für die Gelfiltrationschromatographie wurde Superose 6 mit einer 10/300 GL Säule (Amersham Biosciences AB, Uppsala Schweden) verwendet. Die Matrix wurde mit Puffer SR6 (50 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) equilibriert. Die Säule wurde mit einer Flußrate von 0,4 ml/min betrieben. Eluiert wurde mit 1,2 Säulenvolumen mit Puffer SR6, die Fraktionsgröße betrug 0,25 ml.

### **3.4 Proteinsequenzierung**

Die aus der Gelfiltrationschromatographie gewonnenen Proben wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mit Colloidal Coomassie über Nacht gefärbt. Banden im Bereich von 45 kDa - 65 kDa wurden ausgeschnitten und mit Trypsin verdaut. Die daraus resultierenden Peptide wurden mit einem MALDI Massenspektrometer aufgetrennt. Die Analyse der Peptidmassen wurde mit dem Programm Matrixscience vorgenommen.

### **3.5 *In vitro* Phosphorylierung**

Die *in vitro* Phosphorylierung von Proteinen erfolgte in einem 50 µl Reaktionsvolumen in 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM MnCl<sub>2</sub>, 2,5 µM ATP in Anwesenheit von 3 µCi <sup>32</sup>P-ATP.

Als Substrate wurden heterolog überexprimierte Proteine zuvor in 8 M Harnstoff denaturiert und dem Ansatz hinzugefügt. Die Endkonzentration an Harnstoff überstieg in keinem Falle 160 mM. Es wurden 30 µl von der angereicherten Vorstufenprotein-Kinase, bzw. von der rekombinant exprimierten Kinase, hinzugegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde mit 12 µl Laemmli-Puffer versetzt. 10 µl wurden über eine SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Das getrocknete Acrylamid-Gel wurde für 1-15 Stunden auf einen Phosphor-Imager-Screen gelegt und anschließend mit einem Phosphor-Imager (FujiFilm) analysiert. Die mit dem Phosphor-Imager gemessene Intensität der phosphorylierten Substrate (Intensity) diente als Basis zur Bestimmung der Enzymaktivität.

### **3.6 Expression und Reinigung heterolog exprimierter Proteine**

#### **3.6.1 Proteinexpression im pET-System und Aufreinigung von „Inclusionbodies“**

Die heterologe Expression von rekombinanten Protein erfolgte im pET-System und wurde im *E.coli*-Expressionsstamm BL21(DE3) nach Angaben des Herstellers (Novagen, Madison,

USA) durchgeführt. Das Selektionsantibiotikum Ampicillin wurde in einer Konzentration von 100 µg/ml eingesetzt. Zur Aufreinigung überexprimierter Proteine wurden die sedimentierten Bakterien einer 100ml Kultur in einem Volumen von 5 ml Lysispuffer (50mM Tris/HCl pH 8, 25% Sucrose, 1mM EDTA) resuspendiert und bei 1200 psi in der „French Pressure Cell“ aufgeschlossen. Die DNA wurde durch nachfolgende Ultraschallbehandlung auf Eis zerstört. Die Suspension wurde durch Zentrifugation für 30 min, 4°C bei 30000g geklärt. Das Pellet wurde daraufhin in 10ml Detergenzpuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,5, 1% Desoxycholsäure, 1% Nonidet P40, 200mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM β-Mercaptoethanol) resuspendiert und für 10 Minuten bei 12000g erneut sedimentiert. Die Inclusionbodies (Sediment) wurden durch zweimaliges Waschen in Triton-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7,5, 2 mM EDTA, 0,5 % Triton X-100, 1 mM β-Mercaptoethanol) und anschließendes zweimaliges Waschen in Tris-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 10 mM β-Mercaptoethanol) weiter gereinigt. Die Lagerung erfolgte in Tris-Puffer bei -80°C.

### **3.6.2 Lösliche Expression und Reinigung von AT2g17700, At4g35780 und At4g38470**

Die *Arabidopsis thaliana* Gene AT2g17700, At4g35780 und At4g38470 wurden in pTRCHis2 TOPO (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert. Heterologe Expression erfolgte in BL21 (DE3) mit 1mM IPTG für 2,5 Stunden bei 37°C. Die Bakterien wurden bei 4000g sedimentiert und in 20 mM Tris/HCl pH 7,5 resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte bei 1200 psi in der French Pressure Cell. Die DNA wurde durch nachfolgende Ultraschallbehandlung auf Eis zerstört. Es folgte eine erneute Sedimentation der unlöslichen Zellfragmente bei 12000g für 10 Minuten bei 4°C. Der gewonnene Überstand wurde mittels einer Ni-NTA Affinitätschromatographie von Qiagen (Hilden) aufgereinigt. Nach der Anbindung der Kinasen für 15 Minuten bei 4°C im Überkopfschüttler folgten zwei Waschschritte mit Waschpuffer (40 mM Imidazol, 200 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 7,5). Eluiert wurde in drei Fraktionen mit Elutionspuffer (500 mM Imidazol, 200 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 7,5). Die Proteinbestimmung der Eluate erfolgte nach Bradford.

## **3.7 Arbeiten mit Nukleinsäuren**

### **3.7.1 Klonierung der *A. thaliana* Gene At2g17700, At4g35780 und At4g38470**

Die *Arabidopsis thaliana* Gene At2g17700, At4g35780 und At4g38470 wurden in den Vektor pTRCHis2/TOPO nach den Angaben des Herstellers (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert. Als Template für At2g17700 und At4g38470 diente c-DNA welche mit Hilfe des RNeasy-Kit von Qiagen (Hilden) und des SuperScript™ III Reverse Transcriptase Kit von Invitrogen aus Rosettenblättern von *A. thaliana* (wildtype; Ecotyp Columbia) gewonnen wurde. At4g35780 wurde aus dem EST-Klon RAFL11-12-O20 (Riken Bioresource Center, Japan) amplifiziert.

### **3.7.2 Isolierung genomischer DNA aus *A. thaliana* Blättern**

Für die Bestimmung des Genotyp der verwendeten *A. thaliana* Mutanten-Linien mittels PCR wurde DNA aus Blättern isoliert. Das Blattmaterial wurde mit Hilfe eines Elektropistills zerkleinert und in 400µl Extraktionpuffer ( 0,2 M Tris/Cl pH 7,5; 0,25 M NaCl; 0,025 M EDTA; 0,5% (m/v) SDS) für 3 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte eine Sedimentation bei 10.000 x g für 5 Minuten. 200 µl des Überstandes wurde mit 200 µl Isopropanol versetzt und die DNA für 15 Minuten bei 15.000 x g gefällt. Das Pellet wurde für 2 Minuten bei 50°C getrocknet und in 50 µl Wasser resuspendiert.

## 3.8 Arbeiten mit Immunglobulinen

### 3.8.1 Nachweis von Antigenen auf Nitrozellulose-Membranen

Proteine, die mit Hilfe der Westernblot-Methode auf Nitrozellulose-Membranen transferiert worden sind, wurden mit Antikörpern gegen At2g17700 analysiert.

Die Membran wurde bis zu dreimal für 10-15 Minuten in Puffer 1 (100 mM Tris/HCl pH 7.4; 160 mM NaCl; bis 0,1% Tween20; 1% Magermilchpulver (w/v)) gewaschen. Das Antiserum wurde mit Puffer 1 1:1000 verdünnt und über Nacht bei 4°C bei leichtem Schütteln inkubiert. Das primäre Antiserum wurde durch drei Waschschriffe in Puffer 1 entfernt. Danach folgte die Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper in einer Verdünnung von 1:10000 in Puffer 1 für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Vor dem Färben erfolgten drei Waschschriffe in Puffer 1. Auf die Membran wurde nun 10ml Färbelösung (100mM Tris/HCl pH 9,5; 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) gegeben, der noch 66 µl NBT (50mg/ml) und 132 µl BCIP (12.5 mg/ml) zugefügt wurden. Von dem Antikörper detektierte Proteine wurden als violette Banden sichtbar.

### 3.8.2 Depletion von *A. thaliana* Blattextrakt durch $\alpha$ -At2g17700

Für die Antikörper-Depletion wurde *A. thaliana* Blattextrakt verwendet. Der Blattextrakt bestand aus 3,68 g Rosettenblättern von *A. thaliana*, welche in 40 ml PSA zerkleinert, durch Mull und Schweizer-Tuch gefiltert und für 30 Minuten bei 4°C bei 30.000 g sedimentiert wurde. Der Überstand wurde zu 50%, 25%, 5% mit PSA verdünnt. jeweils 27,5 µl wurden mit dem Antiserum bzw. dem Präimmunserum versetzt (2,5 µl). Es folgte eine Inkubation im Überkopfschüttler für 2 Stunden bei 4°C. Der Ansatz von 30 µl wurde für die Phosphorylierungsreaktion verwendet deren Gesamtvolumen 50 µl betrug. Die finale Verdünnung des Antiserums/ Präimmunserum betrug somit 1:20 (2,5 µl Antiserum in 47,5 µl)

## 4 Ergebnisse

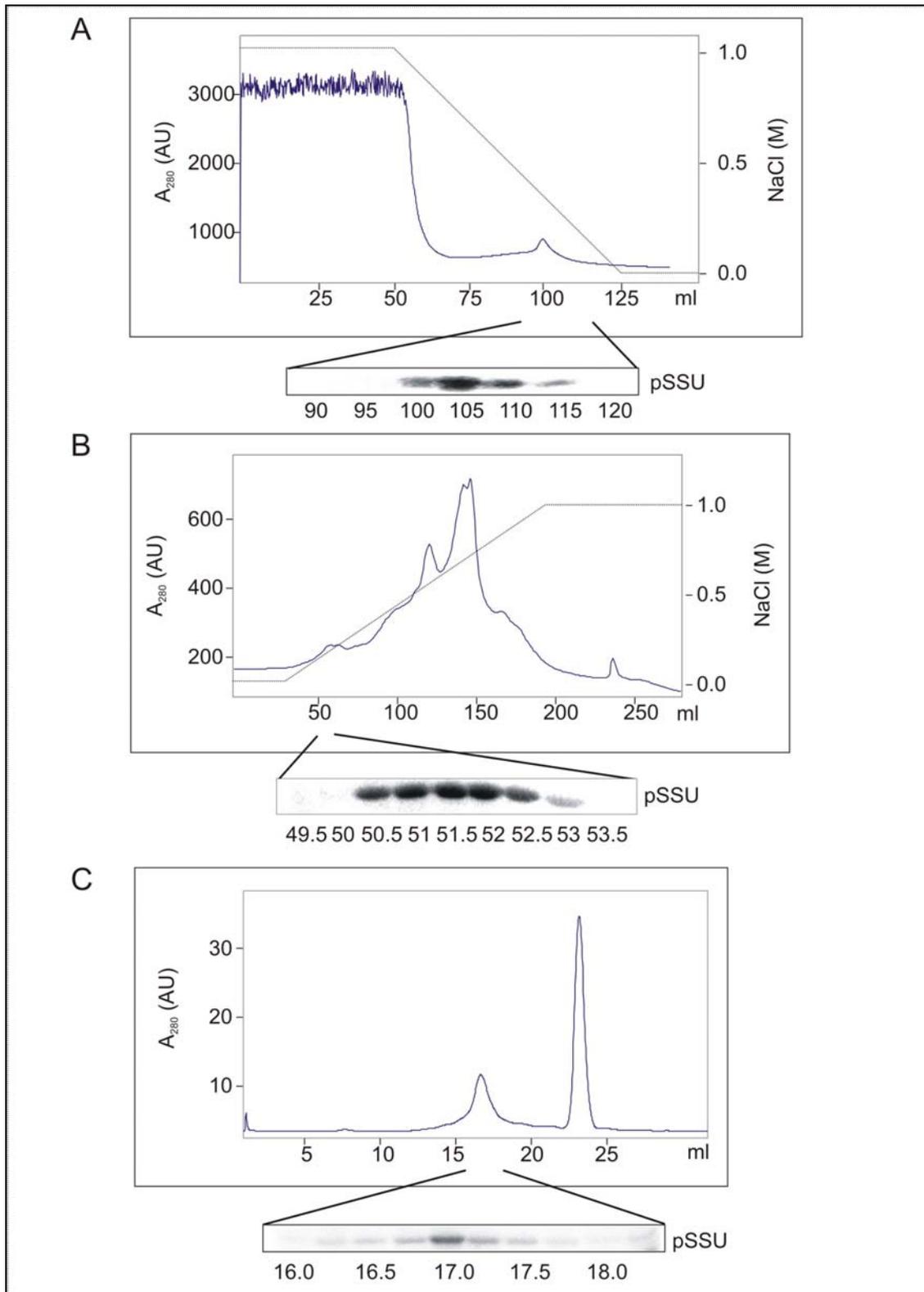
Chloroplasten importieren mehr als 95% ihrer Proteine posttranslational aus dem Zytosol (Soll und Schleiff, 2004). Die überwiegende Mehrheit dieser Proteine besitzt eine N-terminale Transitsequenz, welche für die korrekte Zielsteuerung der Proteine zu den Chloroplasten sorgt. Einige dieser Proteine können von einer im Zytosol lokalisierten Protein-Kinase spezifisch in ihrer Transitsequenz phosphoryliert werden (Waegemann und Soll, 1996). Ziel dieser Arbeit war es, die Vorstufenprotein phosphorylierende Proteinkinase aus *Arabidopsis thaliana* Blättern zu isolieren, sie zu identifizieren und zu charakterisieren.

### 4.1 Isolierung und Identifikation der Vorstufenprotein-Kinase

Um Proteine mittels eines massenspektroskopischen Peptid-Fingerabdruck zu identifizieren, müssen sie möglichst rein vorliegen. Die Anreicherung des gesuchten Proteins wurde durch chromatographische Methoden erreicht. Die Detektion des Enzyms in den entsprechenden Fraktionen des Eluats erfolgte dabei durch Phosphorylierung von pSSU.

Die Vorstufenprotein phosphorylierende Proteinkinase wurde im Verlauf der Arbeit aus diversen Pflanzenspezies chromatographisch aufgereinigt und die Aufreinigung zum Teil massenspektroskopisch analysiert. Zu den untersuchten Pflanzenspezies gehörten *Pisum sativum*, *Brassica napus* und *Arabidopsis thaliana*. Die Extrakte von allen verwendeten Pflanzenarten waren in der Lage pSSU zu phosphorylieren. Die letztendlich erfolgreiche Identifizierung, die in den folgenden Kapiteln beschreiben ist, wurde mit *Arabidopsis thaliana* durchgeführt.

Die Anreicherung der Vorstufenprotein phosphorylierenden Protein-Kinase umfasste drei unterschiedliche Flüssigchromatographien. Nach Aufschluss der Rosettenblätter von *A. thaliana* wurde der gewonnene Blattextrakt auf 1 M NaCl gebracht und auf eine HIC-Säule (Hydrophobe Interaktions Chromatographie), bestehend aus einer Phenyl-Sepharose-Matrix gebracht und durch einen abnehmenden Salzgradienten eluiert. Das Eluat wurde auf seine enzymatische Aktivität hin analysiert. Bei einer NaCl-Konzentration von 150 mM wurde die höchste enzymatische Aktivität bestimmt (Abb. 2A). Die Kinase wurde in diesem chromatographischen Schritt ca. 50fach angereichert (Tab. 1).



**Abbildung 2: Chromatographische Reinigung der Vorstufenprotein phosphorylierenden Proteinkinase aus *Arabidopsis thaliana* Blättern**

Der Blattextrakt wurde vor der Chromatographie durch Filtration und Ultrazentrifugation vorgereinigt. Dann folgte die Anreicherung der Vorstufenprotein phosphorylierenden Proteinkinase aus *Arabidopsis thaliana* durch verschiedene chromatographische Schritte. Dargestellt ist das Absorptionsspektrum von 280 nm.

A: Der *A. thaliana* Blattextrakt wurde durch Zugabe einer 5 M NaCl-Lösung auf die finale Salzkonzentration von 1 M NaCl eingestellt. Danach wurde der Blattextrakt auf eine Phenyl-Spharose-Matrix gegeben. Das Eluieren der Proteine erfolgte durch einen abfallenden linearen Salz-Gradienten. Die höchste enzymatische Aktivität befand sich bei 150 mM NaCl. Die Fraktionsgröße betrug 5 ml.

B: Die entsprechenden Fraktion der Phenylsepharose Chromatographie, die enzymatische Aktivität aufwiesen, wurden vereinigt und auf eine MonoQ-Matrix gegeben. Das Eluieren der Proteine erfolgte durch einen ansteigenden NaCl-Gradienten. Die höchste enzymatische Aktivität befand sich bei 200 mM NaCl. Die Fraktionsgröße betrug 0,5 ml

C: Die enzymatisch aktiven Fraktionen der MonoQ-Chromatographie wurden einzeln auf eine Gelfiltrations-Säule gegeben. Die höchste enzymatische Aktivität befand sich bei 17 ml Durchflussvolumen.

Zur Analyse der aktiven Fraktionen diente als Substrat pSSU für die Phosphorylierung.

Die entsprechenden Fraktionen aus der HIC-Chromatographie wurden vereinigt und auf eine MonoQ-Matrix gegeben. Gebundene Proteine wurden durch einem ansteigenden Salzgradienten eluiert. Abbildung 2B gibt das Absorbtionspektrum der Ionen-Austausch-Chromatographie bei 280 nm wieder. Die höchste enzymatische Aktivität befand bei 200 mM Natriumchlorid. Der Anreicherungsfaktor beträgt 460. Die Fraktionen, die enzymatische Aktivität aufwiesen wurden einzeln auf eine Gelfiltrations-Chromatographie, bestehend aus einer Superose-6 Matrix, gegeben (Abb. 2C). Die Fraktionen der Gelfiltrationschromatographie wurden auf enzymatische Aktivität hin untersucht. Die höchste enzymatische Aktivität befand sich in Fraktion E1, welche dem Elutionsvolumen von 17 ml entsprach. In dieser Fraktion, mit einem Volumen von 0,25 ml, wurde die Vorstufenprotein phosphorylierende Proteinkinase um den Faktor 2858 angereichert (Tab. 1).

Von dem letzten chromatographischen Schritt, der Gelfiltration, wurde die Proteine der Fraktion E1 einer SDS-PAGE unterzogen. Dadurch wurde eine weitere Auftrennung der Proteine anhand ihres Laufverhaltens im Acrylamidgels erreicht (Abb. 3). Aus vorangegangenen Arbeiten ist bekannt, dass die Vorstufenprotein phosphorylierende Proteinkinase aus Weizenkeimlysat und Erbse, die Größe von ungefähr 51 kDa besitzen (May, 2000; Waegemann und Soll, 1996). Es wurde daher vermutet, dass die Proteinkinase in *A. thaliana* eine ähnliche Größe aufweist. Daher wurden fünf Fraktionen zwischen 45-60 kDa analysiert. Die Fraktionen sind in Abbildung 3 dargestellt.

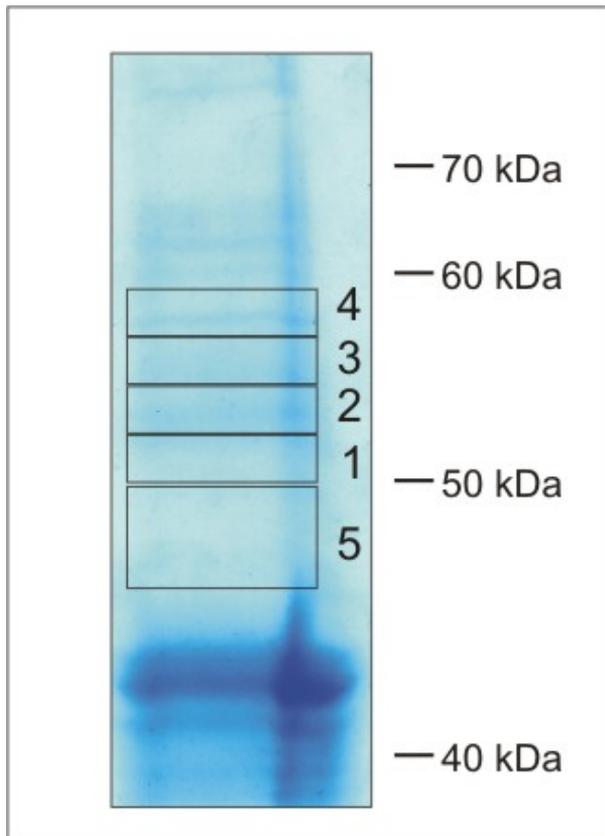
**Tabelle 1: Chromatographische Anreicherung der Vorstufen-Protein-Kinase aus *A. thaliana*.**

Angegeben ist das Volumen der vereinigten Fraktionen, die entsprechende Proteinkonzentration und die enzymatische Aktivität der Fraktion. Die Proteinbestimmung wurde nach dem Bradford-Assay durchgeführt, die enzymatische Aktivität der Proben wurde durch eines Phosphor-Imagers bestimmt. Nach drei unterschiedlichen Chromatographien wurde die Vorstufenprotein phosphorylierende Protein-Kinase um den Faktor 2858 angereichert.

Als Substrat zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität diente pSSU.

	Blattextrakt	Phenyl-Sepharose	MonoQ	Superose-6
Volumen (ml)	320	15	2	0,25
Proteinkonzentration (mg/ml)	1,8	0,6233	0,52	0,4
Proteinmenge (mg)	576	9,3495	1,04	0,1
Enzymatische Aktivität (Intensity)	89183	68750	74117,2	44242,1
spezifische enzymatische Aktivität (Intensity/mg)	154,8	7353,3	71266,5	442421
Anreicherungsfaktor	1	47	460	2858

Um Proteine mit einem Massenspektrometer identifizieren zu können, müssen sie zunächst in ihre Peptide aufgespaltet werden. Dies wird mit Hilfe einer Endopeptidase, in diesem Fall Trypsin, umgesetzt. Die aus dem Verdau resultierenden Peptide werden durch das Massenspektrometer einer Masse zugeordnet. Die Massen werden mit den in der Datenbank befindlichen Massen abgeglichen und die korrespondieren Aminosäuresequenzen zugeordnet.



**Abbildung 3: Elektrophoretische Auftrennung der gepoolten Gelfiltrations-Fractionen.**

Durch die chromatographische Anreicherung der gesuchten Proteinkinase wurde das Enzym stark aufgereinigt. Um eine weitere Auftrennung der finalen chromatographischen Fraktion zu erreichen wurde diese Fraktion einer elektrophoretischen Auftrennung unterzogen. Die SDS-PAGE hatte einen Acrylamid-Anteil von 10% und wurde mit Colloidal-Coomassie angefärbt. Die Fraktion E1 aus der Gelfiltrations-Chromatographie wurde aufgetragen (Abb. 2C). Es wurden Protein-Banden im Bereich von ca. 45-60 kDa analysiert. Die gekennzeichneten Bereiche wurden ausgeschnitten und einem Trypsin-Verdau unterzogen. Die gewonnenen Peptide-Fragmente wurden mit einem Maldi-Massenspektrometer analysiert.

In Probe 3 (Abb. 3) wurden nach diesem Verfahren acht Peptide gefunden, welche mit dem Genprodukt von At2g17700 übereinstimmen (Abb. 4). Die Proteinkinase At2g17700 ist die einzige Serin/Threonin-Kinase oder Tyrosin-Kinase, die in der Probe gefunden wurde.

		Peptid-1 100.0%			
1	MTIKDESESCGSRAVVASPS	QENPRHYRMKLDVYSEVLQR	LQESNYEEATLPDFEDQLWL	HFNRLPARYALDVKVERAED	
81	VLTHQRLKLAADPATRPVF	EVRVSVQVSPRISADSDPAVE	EDAQSSHQPSGPGVLAPPTF	GSSPNFEAITQGSKIVEDVD	
161	SVVNATLSTRPMHEITFSTI	DKPKLLSQTSLGELGLNI	QEAHAFSTVDGFSLDVVFVD	GWSQEETDGLRDALSKEILK	
		Peptid-3 100.0%			
		Peptid-2 100.0%			
241	LKDQPGSKQKSISFFEHDKS	SNELIPACIEIPTDGTDEWE	IDVTQLKIEKKVASGSYDGL	HRGTYCSQEVAIKFLKPDRV	
		Peptid-4 100.0%			Peptid-5 100.0
321	NNEMLREFSQEVFIMRKVRH	KNVVQFLGACTRSPTLCIVT	EFMARGSIYDFLHKQKCAFK	LQTLLKVALDVAKGMSYLHQ	
		Peptid-6 100.0%			
		Peptid-7 100.0%			
	Peptid-5 100.0%			Peptid-8 100.0%	
401	NNIIHRDLKTANLLMDEHGL	VKVADFGVARVQIESGVMTA	ETGTYRWMAPEVIEHKPYNH	KADVFSYAIVLWELLTGDIP	
481	YAFLTPLQAAVGVVQGLRP	KIPKTHPKVKGLLERCWHQ	DPEQRPLFEEIIEMLQQIMK	EVNVVV	

**Abbildung 4: Aminosäuresequenz der Proteinkinase At2g17700**

Probe Nr. 3 aus der gelelektrophoretischen Auftrennung der chromatographischen Anreicherung wurde mittels eines Peptid-Fingerprints analysiert. Die Masse von acht Peptiden und der entsprechenden korrespondierenden Aminosäuresequenz aus dieser Probe stimmen mit At2g17700 zu 100% überein. Die Position der Peptide ist in der Aminosäuresequenz von At2g17700 rot markiert.

## 4.2 At2g17700 gehört zu einer kleinen Proteinkinase-Familie

Anhand der chromatographischen Anreicherung und der massenspektroskopischen Analyse, konnte die Proteinkinase At2g17700 identifiziert werden. Durch Abgleich der Proteinsequenz von At2g17700 gegen das Arabidopsis Proteom wurden zwei weitere Polypeptide identifiziert, die eine sehr hohe Übereinstimmung mit At2g17700 aufweisen. Es handelt sich um die Proteine der Gene At4g35780 und At4g38470. Die Übereinstimmung mit identischen Aminosäuren beträgt zwischen At2g17700 und At4g35780 80,2%. Die Übereinstimmung mit identischen Aminosäure beträgt zwischen At2g17700 und At4g38470 59,5%. Diese sehr hohe Identität zwischen den Proteinen spiegelt sich auch in den berechneten Größen und den isoelektrischen Punkten der Moleküle wider.

Die Proteine At2g17700, At4g35470 und At4g3870 gehören zu den eukaryotischen Proteinkinasen (<http://www.expasy.org/prosite>). At2g17700 besteht aus 546 Aminosäuren und hat eine berechnete Größe von 61509,6 Da. Der isoelektrische Punkt befindet sich bei pH

5,65. Das Protein besitzt keine Transmembran-Domänen ([http://mips.gsf.de/cgi-bin/proj/thal/search\\_gene?code=at2g17700](http://mips.gsf.de/cgi-bin/proj/thal/search_gene?code=at2g17700)).

Das Genprodukt von At4g35470 besteht aus 570 Aminosäuren und hat eine berechnete Größe von 64696,7 Da. Der isoelektrische Punkt befindet sich bei pH : 5.69. Das Polypeptid enthält nach der bioinformatischen Analyse keine Transmembran-Domänen ([http://mips.gsf.de/cgi-bin/proj/thal/search\\_gene?code=at4g35780](http://mips.gsf.de/cgi-bin/proj/thal/search_gene?code=at4g35780)).

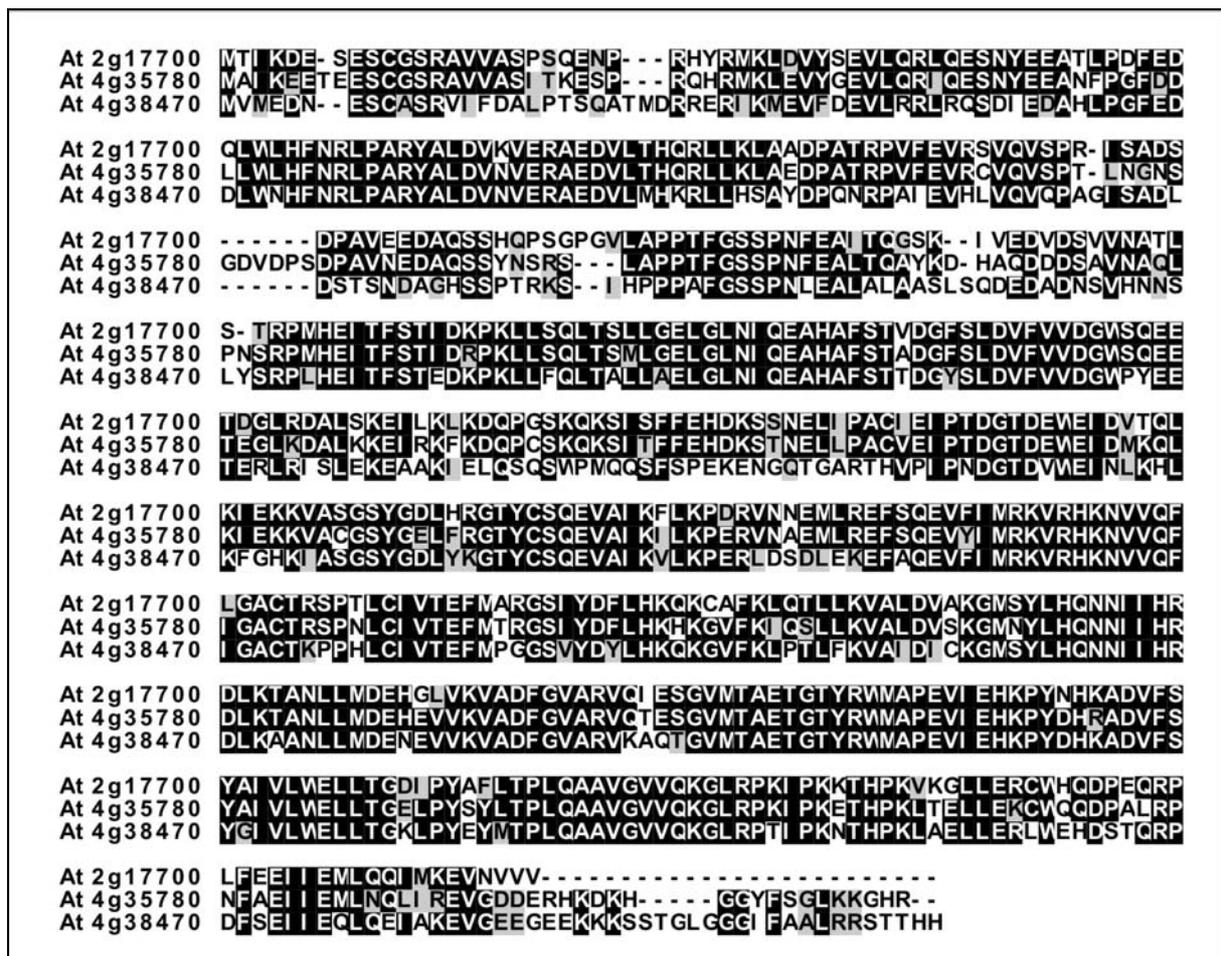


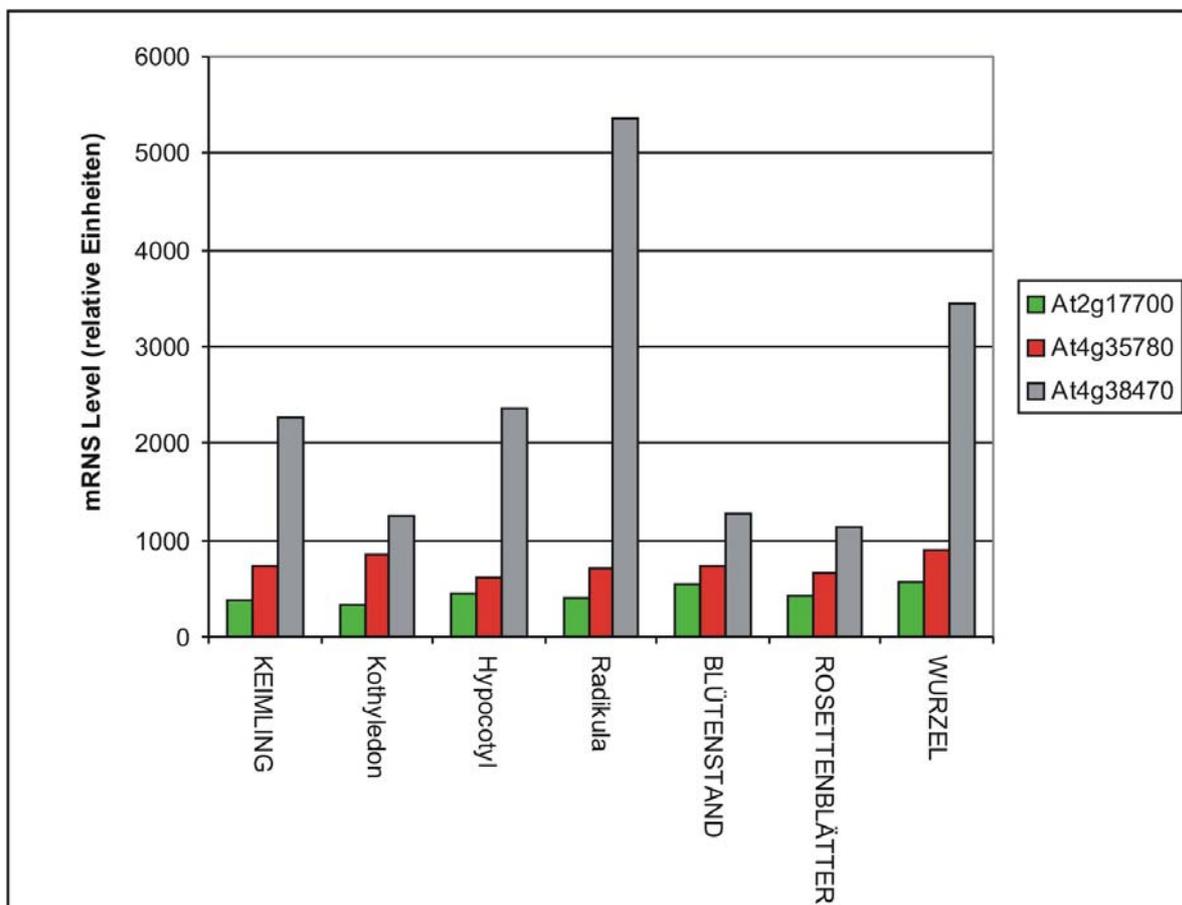
Abbildung 5: Alignment der *A. thaliana* Kinasen At2g17700, At4g35780 und At4g38470

Die Proteinkinase-Familie besteht aus den Genen At2g17700, At4g35780 und At4g38470. Die Mitglieder dieser Familie weisen eine sehr hohe Übereinstimmung in ihrer Proteinsequenz auf. Schwarze Boxen zeigen identische Aminosäuren an, graue Boxen weisen auf konservierte Bereiche hin.

Das Protein At4g38780 hat die Länge von 545 Aminosäuren und die berechnete Größe beträgt 61982,9 Da. Der isoelektrische Punkt befindet sich bei pH 5,76. Auch in diesem Protein sind

laut Datenbank keine Transmembrandomänen vorhanden ([http://mips.gsf.de/cgi-bin/proj/thal/search\\_gene?code=at4g38780](http://mips.gsf.de/cgi-bin/proj/thal/search_gene?code=at4g38780)).

Die beiden Proteinkinasen At2g17700 und At4g35780 weisen in ihren mRNS-Level eine sehr hohe Übereinstimmung auf (Abb. 6). Die dritte Proteinkinase At4g38470 zeigt ein etwas anderes Expressionsmuster als die Proteinkinasen At2g17700 und At4g35780. Sie weist durchschnittlich ein höheres Expressions-Niveau auf. Insbesondere weisen die Daten auf ein erhöhtes Vorhandensein in der Wurzel und den Wurzelanlagen hin. Das unterschiedliche Expressionsmuster der drei Proteinkinasen könnte ein Hinweis auf unterschiedliche Funktionen in der Zelle sein.



**Abbildung 6: Genexpression von At2g17700, At4g35780 und At4g38470 in unterschiedlichen Organen.**

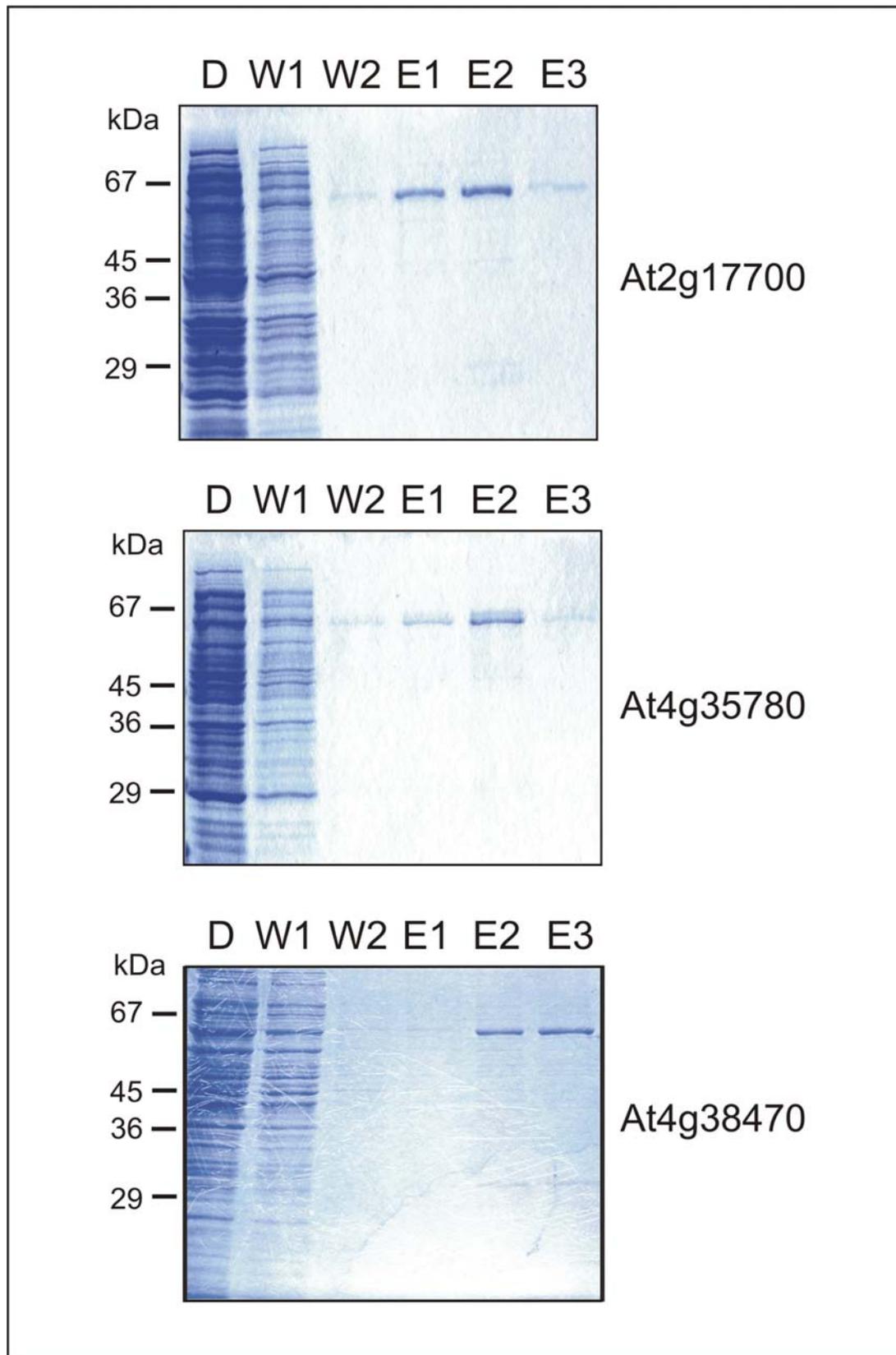
Die Protein-Kinasen At2g17700 und At4g35780 sind in ihrem Expressionsmuster sehr ähnlich. At4g38470 weist durchschnittlich ein höheres mRNA-Level auf und scheint vornehmlich in der den Wurzeln und den Wurzelanlagen exprimiert zu werden. Quelle: <https://genevestigator-1.ethz.ch>

#### 4.2.1 Rekombinante Expression und Reinigung der Proteinkinasen

Um die Substratspezifität der Proteinkinasen *in vitro* zu bestimmen wurden die Gene der entsprechenden Proteine kloniert. Die Proteine wurden dann in *E. coli* rekombinant exprimiert. Dabei wurden N-terminal sechs Histidinmoleküle (6xHis) an das Protein gehängt. Dies ermöglichte die Reinigung des heterolog exprimierten Enzyms über eine Affinitäts-Chromatographie.

Die heterologe Expression der Polypeptide erfolgte bei 37°C. Die Lyse der Zellen und die anschließende Reinigung der Enzyme fand bei 4°C statt. Nach der Lyse der Zellen befanden sich die exprimierten Kinasen im löslichen Überstand. Dieser lösliche Überstand wurde auf die Matrix der Affinitätssäule gegeben. Das Eluieren der Enzyme erfolgte ebenfalls bei 4°C durch Imidazol. Das gewonnene Eluat wurde stark verdünnt für die Phosphorylierungs-Assays verwendet. Die Kinasen waren nach der affinitätschromatographischen Reinigung bei 4°C für drei bis vier Tage enzymatisch aktiv. Für die biochemische Charakterisierung wurde jedoch ausschließlich frisch exprimiertes, gereinigtes Enzym verwendet.

Die Reinheit der Proteine wurde über eine SDS-PAGE kontrolliert (Abb. 7). Die rekombinanten Proteinkinasen enthalten sechs zusätzliche Histidin-Moleküle. Dieser, für die Reinigung notwendige Anhang, ist mit einem Linker von 23 Aminosäuren (KGEFEAYVEQKLISEEDLNSAVD) an das Enzym gekoppelt. Durch die zusätzlichen 29 Aminosäuren erhöht sich das Molekulargewicht der Proteine. Sie laufen in der SDS-PAGE bei ca. 66 kDA (Abb. 7)



**Abbildung 7: Affinitätschromatographische Reinigung der heterolog exprimierten *A.thaliana* Proteinkinasen At2g17700, At4g35780 und At4g38470**

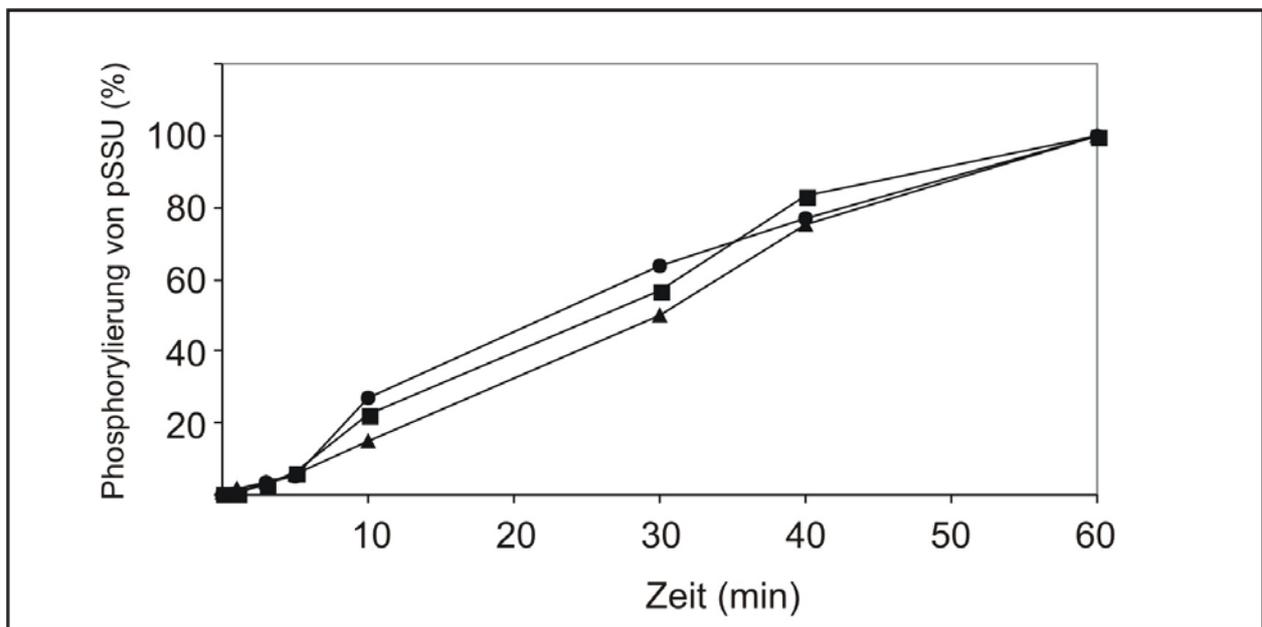
Die Proteinkinasen At2g17700, At4g35780 und At4g38470 wurden bei 37°C heterolog exprimiert und bei 4°C lysiert und gereinigt. Die Analyse erfolgte durch eine Coomassie gefärbte SDS-PAGE. Die Proteine mit dem N-

terminalen His-Tag laufen im Acrylamidgel bei ungefähr 66 kDa Für die biochemische Charakterisierung wurde für die Kinasen At2g17700 und At4g38470 die Fraktion E2, für die Kinase At4g35780 die Fraktion E3 verwendet.

D, Durchlauf; W1-2, Waschschrift; E1-3, Eluat

### 4.3 Biochemische Charakterisierung der Proteinkinasen At2g17700, At4g35780 und At4g38470

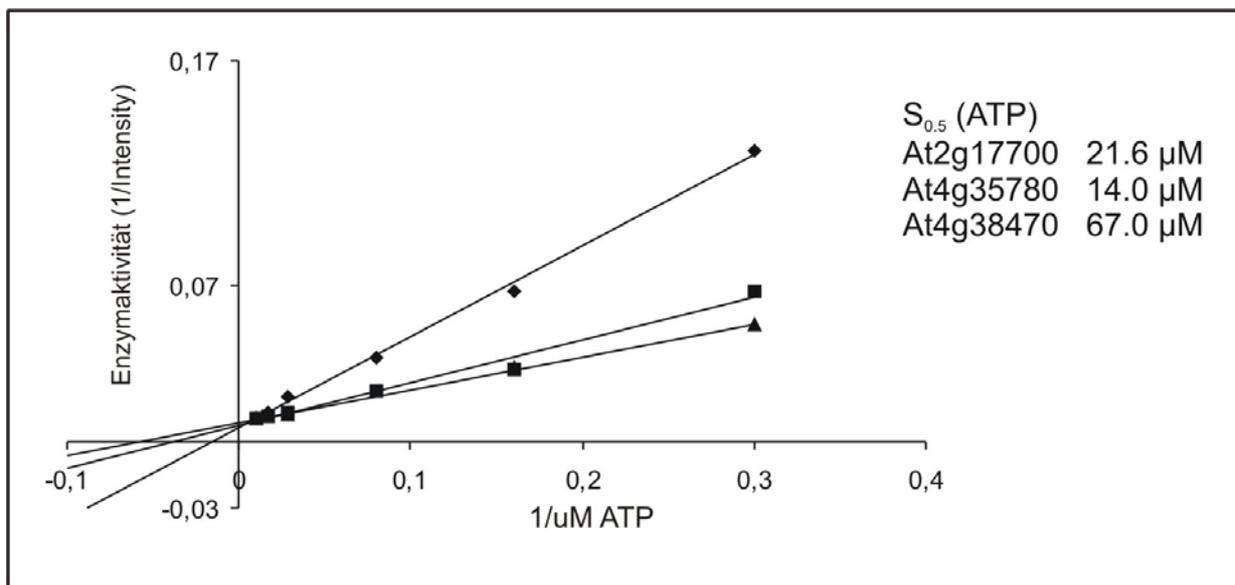
Um die enzymatischen Eigenschaften der drei Kinasen näher zu untersuchen, wurden sie aufgereinigt und auf eine Konzentration von 0,025 µg/µl Protein eingestellt. Alle drei Kinasen sind in der Lage unspezifische Substrate wie Casein, Histon und MBP (myelic basic protein) zu phosphorylieren (Daten nicht gezeigt). Für die biochemische Charakterisierung wurde jedoch das spezifische Substrat pSSU verwendet.



**Abbildung 8: Zeitabhängige Phosphorylierung von pSSU**

Die Phosphorylierung von pSSU erfolgte zeitabhängig. Die enzymatische Aktivität ist auf der Ordinate dargestellt und in Prozent der maximalen Phosphorylierung von pSSU angegeben. Die drei Proteinkinasen erreichen ihr Maximum bei ca. 60 Minuten Reaktionszeit.

Die meisten Enzyme katalysieren ihre Reaktion zeitabhängig. Die entstandene Produktmenge nimmt mit der Zeit zu und man kann einen linearen Verlauf der Funktion in Abhängigkeit der Zeit feststellen. Nach der linearen Zunahme der Produktmenge strebt die Funktion einem Maximum entgegen. Das Maximum war bei den Proteinkinase At2g17700 nach 60 Minuten Reaktionszeit erreicht (Abb. 8).



**Abbildung 9: Bestimmung der  $S_{0,5}$ -Werte für ATP**

Für die Bestimmung  $S_{0,5}$ -Werte wurde eine doppelt-reziproke Darstellung nach Lineweaver-Burk gewählt. Die Ordinate gibt die gemessene Enzymaktivität an. Die Abszisse beschreibt die bei der *in vitro* Phosphorylierung eingesetzte ATP-Konzentration. Anhand der Schnittpunkte der Geraden mit der Abszisse lässt sich die ATP-Konzentration für die halb-maximale Aktivität berechnen. Die Kinase At2g17700 hat die höchste Affinität zu ATP, gefolgt von der Proteinkinase At4g35780. Die geringste Affinität zu ATP besitzt das Enzym At4g38470.

Als Substrat für die Phosphorylierungsreaktion diente pSSU.

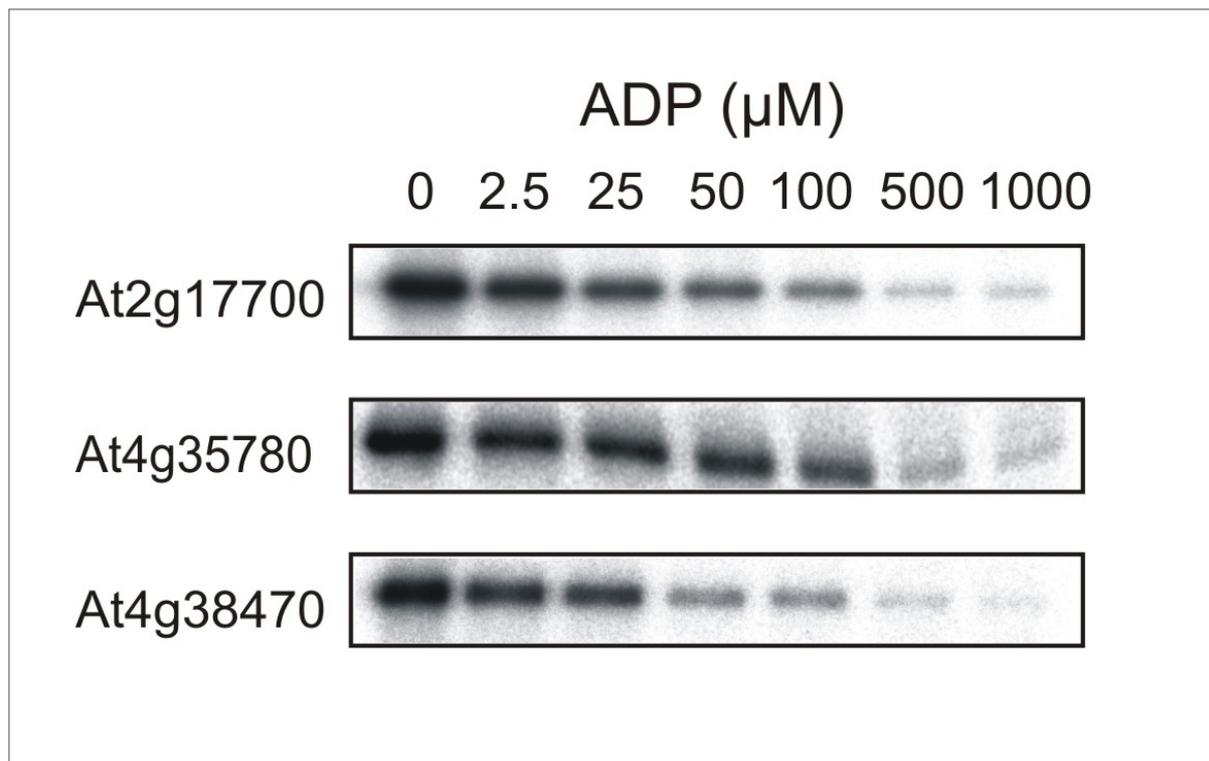
Die Phosphorylierung der Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin durch Proteinkinasen erfolgt in den allermeisten Fällen über ATP als Donor der Phosphatgruppe. Einige Kinasen sind jedoch in der Lage auch GTP als Phosphatdonor zu verwenden (Martinez-Barajas und Randall, 1998; Struglics und Hakansson, 1999). Die Proteinkinasen At2g17700, At4g35780 und At4g38470 waren nicht in der Lage GTP als Phosphatdonor zu verwenden. Gehemmt wurden die Kinasen durch ADP, jedoch nicht durch GTP, CTP oder UTP (Tab. 2, Abb.10).

Starke Unterschiede zeigten sich in den  $S_{0,5}$ -Werten für ATP. Die  $S_{0,5}$ -Werte geben die Liganden-Konzentration an, welche für die halb-maximale Aktivität benötigt wird. In dem Fall ist der Ligand ATP. Die Kinase At2g17700 hatte die höchste Affinität zu ATP, gefolgt von At4g35780. Bei Kinase At4g38470 muss die ATP-Konzentration 67  $\mu$ M betragen damit sie ihre halb-maximale Aktivität erreichen konnte (Abb. 9; Tab. 2)

**Tabelle 2: Nukleotid-Spezifität der drei Kinasen At2g1770, At4g35780 und At4g38470**

	$S_{0,5}$ ATP	Hemmung durch ADP	Hemmung durch GTP	Hemmung durch CTP	Hemmung durch UTP
At2g17700	21,6 $\mu$ M	+	-	-	-
At4g35780	14,0 $\mu$ M	+	-	-	-
At4g38470	67,0 $\mu$ M	+	-	-	-

In vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass Extrakte aus Pflanzen in der Lage sind chloroplastidäre Vorstufenproteine in ihrem Transitpeptid zu phosphorylieren (May und Soll, 2000; Waegemann und Soll, 1996). Um die Substratspezifität der drei Kinasen zu untersuchen, wurden diverse Vorstufenproteine für die Phosphorylierungsreaktion verwendet. Diese Proteine wurden in *E. coli* exprimiert und als sogenannte „inclusion bodies“ aufgereinigt (Abb. 11, Reihe 1). Zu ihnen gehören chloroplastidäre Vorstufenproteine (pSSU, pLHCP2, pCAO, pNDPK, pAPC, pCPHSP70, pHCF136, pOE23), matures bzw. intermediäres chloroplastidäres Protein (mSSU, iOE23) und mutierte Vorstufenproteine, welche spezifische Aminosäureaustausche in ihrem Transitpeptid haben (pSSU M31/34-S/A, pHCF136-M52/54-S/T, pOE23-M22-S/A). Zudem wurde das Vorstufenprotein der  $\beta$ -Untereinheit der ATP-Synthase aus Mitochondrien (pF1 $\beta$ ) auf seine Eigenschaft von den Kinasen phosphoryliert zu werden hin untersucht.



**Abbildung 10: Hemmung der pSSU Phosphorylierung durch ADP**

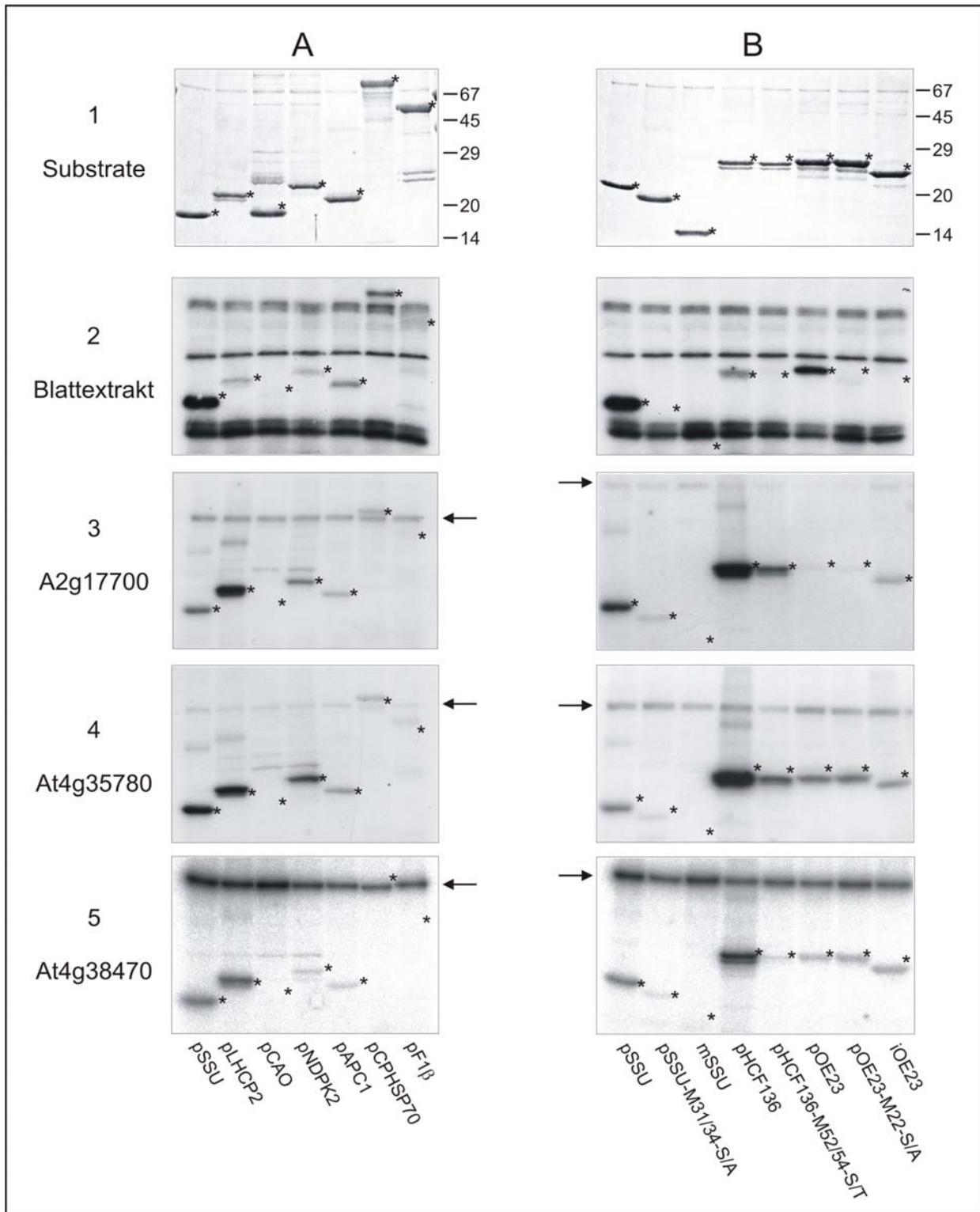
Die Proteinkinasen At2g17700 und At4g38470 werden bei ADP-Konzentrationen zwischen 25 - 50  $\mu\text{M}$  gehemmt. Bei der Proteinkinase At4g35780 setzt eine Hemmung der enzymatischen Aktivität bei ADP Konzentrationen zwischen 50 – 100  $\mu\text{M}$  ADP ein.

Alle Substrate wurden zunächst von löslichen Blattextrakt, gewonnen aus *A. thaliana* Blättern, phosphoryliert (Abb. 11, Reihe 2). Die Position der jeweiligen Substrate ist durch einen Stern markiert. Die Phosphorylierung durch heterolog exprimierten und gereinigten Kinasen At2g17700, At4g35780 und At4g38470 ist in Reihe 3-5 der Abbildung 11 dargestellt. Der Blattextrakt ist in der Lage die Substrate pSSU, pHCF136, pOE23, pLHCP2, pNDPK und pCPHSP70 zu phosphorylieren. pCAO und das mitochondrielle Vorstufenprotein pF1 $\beta$  werden vom löslichen Blattextrakt nicht phosphoryliert. Die enzymatische Aktivität der Kinasen ist durch ihre Autophosphorylierung gezeigt (schwarzer Pfeil Abb. 11, Reihe 3-5). Die Phosphorylierung findet spezifisch innerhalb der Transitsequenz statt. Dies zeigt sich durch die Tatsache, dass weder das Substrat mSSU, welches keine Transitsequenz mehr besitzt noch das Substrat iOE23, welches nur noch das Signal für die Zielsteuerung in die Thylakoide enthält nicht mehr vom Blattextrakt phosphoryliert werden. Wenn die Aminosäure Serin, welche als Akzeptor für die Phosphatgruppe dient, durch Alanin (pSSU

M31/34-S/A, pOE23-M22-S/A) oder Threonin (pHCF136-M52/54-S/T) ersetzt wird, können die entsprechenden Proteine ebenfalls nicht mehr vom Blattextrakt phosphoryliert werden.

Hinsichtlich der untersuchten Substrate zeigte die Proteinkinase At2g17700 eine ähnliche Spezifität in der Phosphorylierungsreaktion wie der lösliche Blattextrakt. Eine Ausnahme stellt das Substrat pOE23 (Vorstufenprotein des Sauerstoff produzierenden, oxygen-evolving, Komplexes von 23 kDa) dar, welches von At2g17700 nur sehr schwach phosphoryliert wird. Die Substrate pHCF136 und pLHCP2 wurden von At2g17700 stärker phosphoryliert als das Substrat pSSU. Dies unterscheidet sich im Vergleich zur Phosphorylierungsreaktion des Blattextrakts, bei dem pSSU das bessere Substrat darstellt. Ebenfalls unterschied sich die Phosphorylierung von pHCF136-M52/54-S/T durch At2g17700. Das Substrat wird von dem Enzym phosphoryliert (<10%). Dies lässt sich durch die Art des Aminosäureaustausches (Serin durch Threonin) als auch durch die Tatsache erklären, dass pHCF136 für At2g17700 ein sehr gutes Substrat darstellt.

Die Kinasen At4g35780 und At4g38470 zeigten ähnliche Substratspezifitäten wie At2g17700. Einzig das Protein pOE23 wird von den beiden Enzymen phosphoryliert. Da auch die Substrate pOE23-M22-S/A und iOE23 von At4g35780 und At4g38470 phosphoryliert werden, lässt sich vermuten, dass diese Phosphorylierungsreaktion nicht spezifisch in der Transitsequenz des Substrates, sondern im maturen Bereich des Polypeptides erfolgt. Der Verlust der Substratspezifität der Enzyme At4g35780 und At4g38470 lässt sich jedoch nur für das Substrat OE23 beobachten (Abb. 11 B).



**Abbildung 11: Substratspezifität der *A. thaliana* Proteinkinasen At2g17700, At4g35780 und At4g38470**

In der obersten Reihe ist eine mit Coomassie gefärbte SDS-PAGE mit den jeweiligen Substraten dargestellt. Die Position der Substrate wird durch einen Stern gekennzeichnet. Reihe 2-5 zeigt die Phosphorylierung der Substrate durch Blattextrakt aus *A. thaliana* bzw. durch die jeweiligen heterolog exprimierte Kinasen At2g17700, At4g35780 und At4g38470. Die folgenden Substrate wurden verwendet: pSSU, Vorstufenprotein von SSU; pLHCP2, Vorstufenprotein des „light harvesting protein 2“; pCAO, Vorstufenprotein der chlorophyllide a

Oxido-Reduktase; pNDPK, Vorstufenprotein der Nukleosid-Diphosphat-Kinase; pAPC, Vorstufenprotein der gamma Untereinheit der chloroplastidären ATP Synthase; pCPHSP70B, Vorstufenprotein des chloroplastidären HSP70B; pF1 $\beta$  Vorstufenprotein der beta Untereinheit der mitochondriellen ATP Synthase; mSSU, SSU ohne N-terminale Presequenz; pHcf136, Vorstufenprotein des „high chlorophyll fluorescence protein 136“; pOE23, Vorstufenprotein des „oxygen evolving protein“ von 23 kDa; iOE23, OE23 ohne chloroplastidären Zielsteuerungspeptid jedoch mit thylakoidärem Transitpeptid. Die Autophosphorylierung der jeweiligen Kinasen ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Die Substrate SSU und HCF136 hingegen zeigen eine spezifische Phosphorylierung in der Transitsequenz. Möglicherweise benötigen die Kinasen At4g35780 und At4g38470 weitere Komponenten um die entsprechende Substratspezifität zu etablieren. Diese Faktoren wären im komplexen löslichen Blattextrakt vorhanden, jedoch nicht im *in vitro* Ansatz, der aus heterolog exprimierten Substrat und heterolog exprimierten Enzym besteht. Die Kinase At4g38470 zeigt die gleichen selektiven Eigenschaften in der Phosphorylierung, jedoch ist die Intensität die Phosphorylierung schwächer im Vergleich zu den anderen beiden Kinasen. Vermutlich lässt sich dies auf die geringe ATP-Affinität ( $S_{0,5}=67 \mu\text{M ATP}$ ) von At4g38470 zurück führen. Die Reaktionen wurden mit einer ATP-Konzentration von  $2,5 \mu\text{M}$  durchgeführt. Unter diese Bedingungen wiesen At2g17700 und At4g35780 noch gute Werte in der Substratphosphorylierung auf, während At4g38470 deutlich schwächer in der Substratphosphorylierung wird.

### 4.3.1 Mutiertes At4g38470 phosphoryliert ausschließlich pSSU in seinem Transitpeptid als einziges chloroplastidäres Vorstufenprotein

In den vorangegangenen Kapiteln konnte gezeigt werden, dass die *A. thaliana* Proteinkinasen At2g17700, At4g35780 und At4g38470 *in vitro* mehrere chloroplastidäre Vorstufenproteine als Substrate für ihre enzymatische Reaktion akzeptieren. Die Phosphorylierung findet spezifisch in der Transitsequenz statt. Bei der Klonierung von At4g38470 konnte ein Produkt aus cDNA amplifiziert werden, welches an Position 368 die Aminosäure Leucin gegen die Aminosäure Prolin getauscht hat (Abb. 12). Diese Mutation trat bei mehreren Klonierungsversuchen mit unterschiedlichen cDNA-Banken auf.

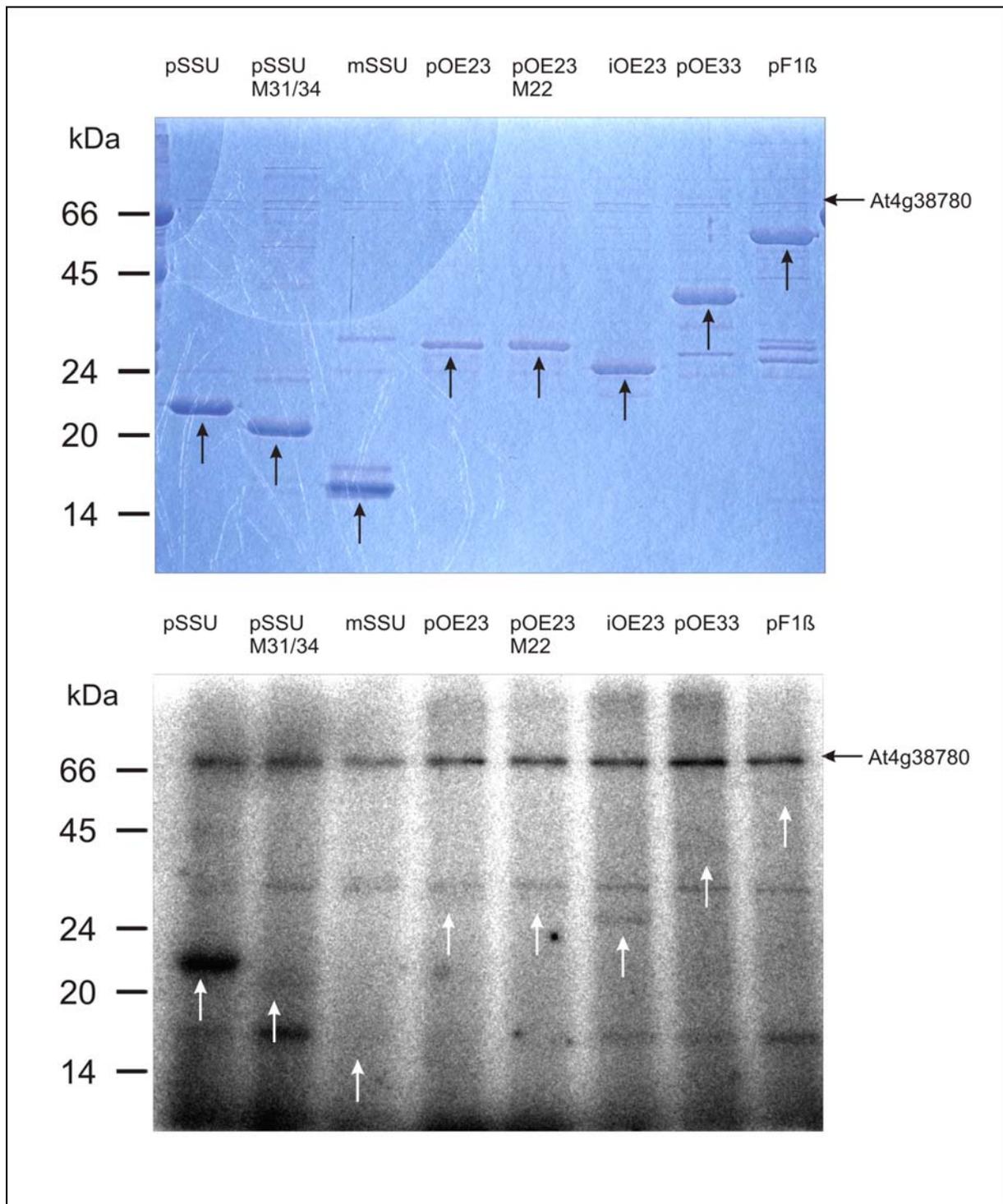
```

1  MVMEDNESCASRVIFDALPTSQATMDRRERIKMEVFDEVLRRRLRQSDIEDAHLPGFEDDLWNHFNRLPARYALDVNVERA
81  EDVLMHKRLLHSAYDPQNRPAIEVHLVQVPAGISADLDSTSNAGHSSPTRKSIHPPPAFGSSPNLEALALAASLSQDE
161 DADNSVHNNSLYSRPLHEITFSTEDKPKLLFQITFSTEDKPKLLFQELGLNIQEAAHAFSTTDGYSLDVVFVVDGWPYEETE
241 RLRISLEKEAAKIELQSQSWPMQSFSPKENGQTGARTHVPIPNDDTDVWEINLKHLLKFGHKIASGSYGDLYKGTYSQ
321 EVAIKVLKPERLSDLEKEFAQEVFIMRKVRHKNVVQFIGACTKPPHL/PCIVTEFMPGGSVYDYLHKQKGVFKLPTLFKVA
401 IDICKGMSYLHQNNIIHRDLKAANLLMDENEVVKVADFGVARVKAQTGVMTAETGTYRWMAPEVI EHKPYDHKADVFSYG
481 IVLWELLTGKLPYEYMTPLQAAVGVVQKGLRPTIPKNTHPKLAELLERLWEHDSTQRPDFSEIIEQLQETAKEVGEEGEE
561 KKSSTGLGGGIFAALRRSTTHH
    
```

**Abbildung 12: Aminosäuresequenz der Proteinkinase At4g38470-M368**

Die Proteinkinase At4g38470-M368 wurde aus *A. thaliana* (wt) cDNA-Banken kloniert. Das Enzym hat eine Mutation an Position 368. Die Aminosäure Leucin wurde gegen die Aminosäure Prolin getauscht. Dies führt zu einer Änderung der Spezifität der Substratphosphorylierung.

Das Enzym mit der Mutation an Position 368 (At4g38470-M368) wurde heterolog exprimiert. Über einen N-terminalen His-Tag wurde die Proteinkinase gereinigt. Im Phosphorylierungsansatz (Kapitel 3.5) zeigte sich eine deutliche Autophosphorylierung des Proteins mit allen getesteten Substraten (Abbildung 13). Die mutierte Proteinkinase At4g38470 phosphoryliert pSSU ebenfalls spezifisch in seinem Transitpeptid. Ebenso wie bei den Kinasen At2g17700, At4g35780 und At4g38470 wird der mature Bereich des Substrates nicht phosphoryliert. Dies zeigt sich dadurch, dass mSSU sowie die Mutante pSSU (M31/34) von At4g38470-M368 nicht phosphoryliert werden (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Substratspezifität der *A. thaliana* Proteinkinase At4g38470-M368**

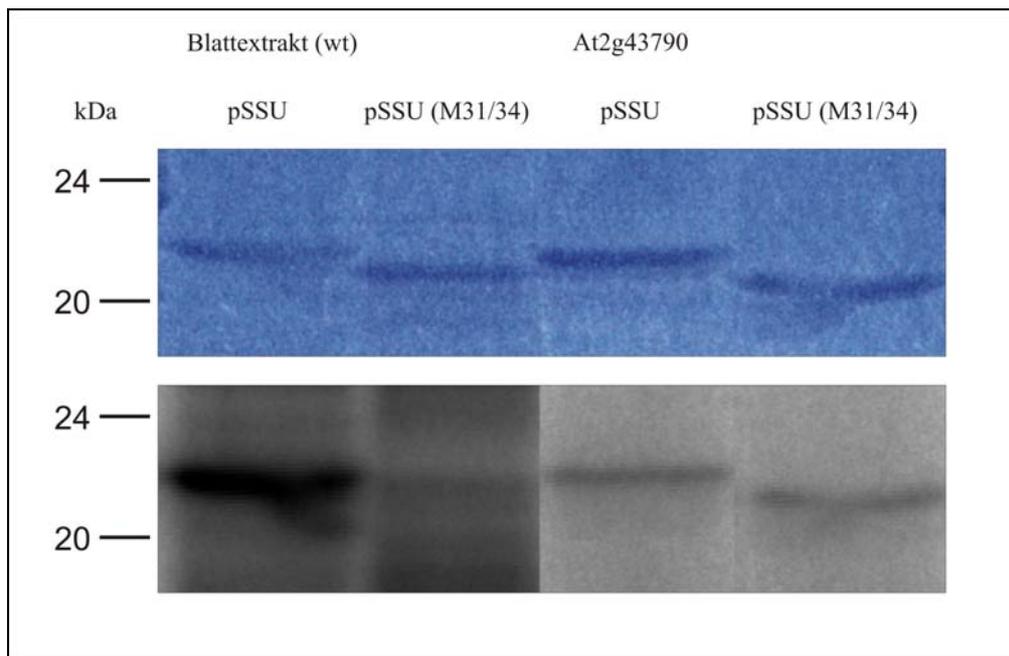
Die *A. thaliana* Proteinkinase At4g38470-M368 hat eine weitestgehend veränderte Substratspezifität auf Proteine, die von den Proteinkinasen At2g17700, At4g35780 und At4g38470 phosphoryliert werden können von At4g38470-M368 nicht als Substrat genutzt werden. Die Aktivität der Proteinkinase wird durch ihre Autophosphorylierung (schwarzer Pfeil im Autoradiogramm) angezeigt.

Die Substrate pOE23, pOE23-M22 und iOE23 werden von At4g38470 gut phosphoryliert. Die rekombinante Proteinkinase At4g38470-M368 zeigt keine Phosphorylierung dieser Proteine. Ebenso wird pOE33, welches von At2g17700, At4g35780 und At4g38470 phosphoryliert wird von At4g38470-M368 als Substrat nicht angenommen. Die  $\beta$ -Untereinheit der ATP-Synthase aus Mitochondrien wird von keiner der vier Kinasen phosphoryliert (Abb. 11, Abb 13).

Es scheint, dass der Bereich um die Aminosäure 368 essentiell für die Substraterkennung des Enzyms ist. Grund dafür könnte eine fehlerhafte tertiäre Struktur, hervorgerufen durch den Aminosäuretausch des Proteins, sein.

#### **4.3.2 AtMPK6 phosphoryliert sowohl pSSU als auch pSSU (M31/34)**

Die *A. thaliana* Kinasen At2g17700, At4g35780 und At4g38470 phosphorylieren das Substrat pSSU jedoch nicht das Substrat pSSU (M31/34). Um zu überprüfen ob diese Substratspezifität auch bei anderen *A. thaliana* Kinasen vorliegt, wurde eine weitere *A. thaliana* Kinase untersucht. Die Proteinkinase wurde massenspektrometrisch aus einer chromatographisch aufgereinigten Fraktion von *A. thaliana* Blätter identifiziert. Das Enzym gehört zur Familie der MAP-Kinasen und ist als At-MPK-6 (At2g43790) klassifiziert (Ichimura et al., 2000). Um die Substratspezifität *in vitro* zu untersuchen wurde die MAP-Kinase in einen bakteriellen Vektor kloniert und rekombinant exprimiert. Über einen N-terminalen His-Tag wurde das Protein nach dem gleichen Protokoll wie die Proteine At2g17700, At4g35780 und At4g38470 aufgereinigt.



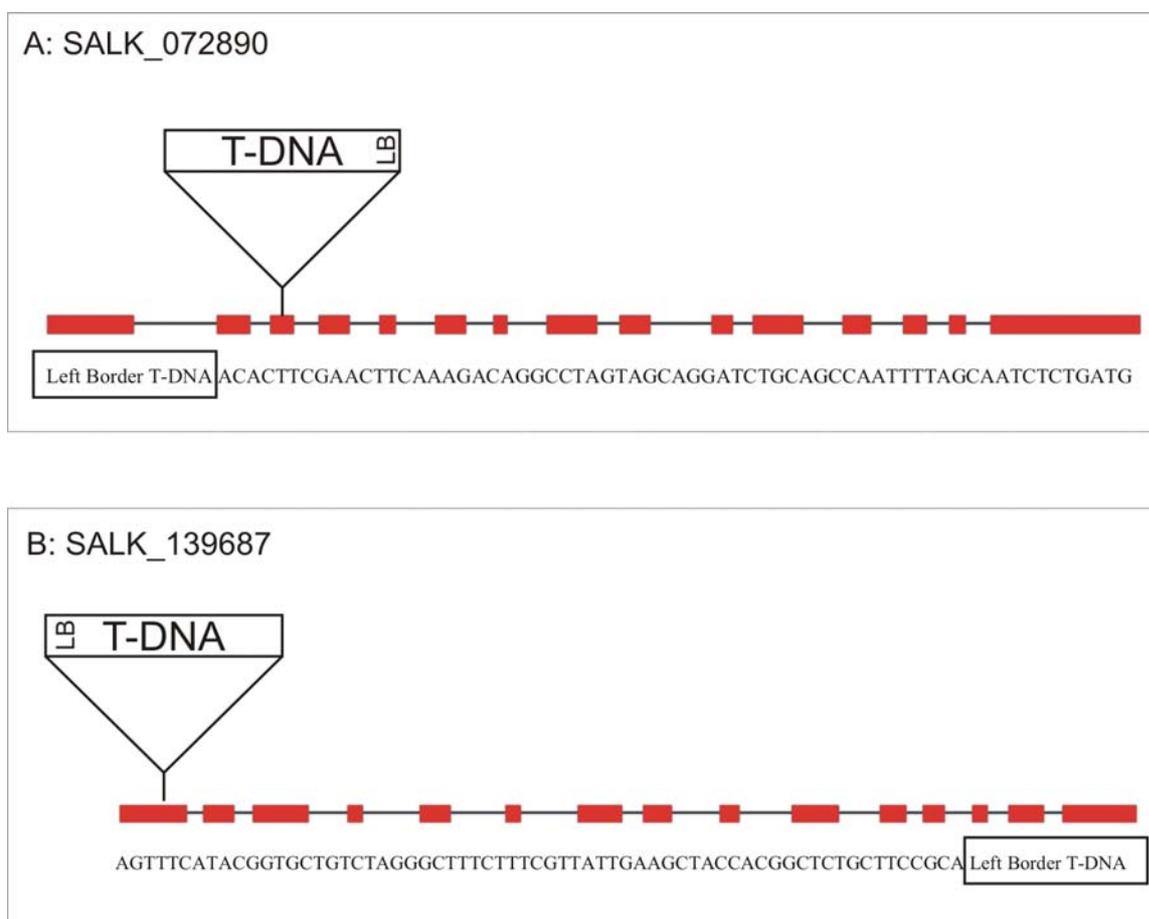
**Abbildung 14: Phosphorylierung von pSSU und pSSU (M31/34) durch At2g43790**

Blattextrakt von *A. thaliana* Blättern phosphoryliert pSSU. Ein in der Transitsequenz mutiertes pSSU (pSSU (M31/34)) wird vom Blattextrakt nicht phosphoryliert. Die rekombinant exprimierte *A. thaliana* Proteinkinase At2g43790 phosphoryliert pSSU und pSSU (M31/34).

Das gereinigte Protein wies enzymatische Aktivität auf. Für die Proteinkinase At2g43790 stellt pSSU ein gutes Substrat dar. Die mutierte Variante von pSSU (pSSU (M31/34)) wurde jedoch ebenfalls phosphoryliert (Abbildung 16). Die Phosphorylierung von pSSU (M31/34) erfolgte mit der gleichen Intensität als die Phosphorylierung von pSSU. Die Austausch der Aminosäure Serin zu Alanin an Position 31 und 34 in der Transitsequenz von pSSU haben keinen Einfluss auf die Spezifität der Phosphorylierung durch At-MPK-6. Im Gegensatz zu den Proteinkinasen At2g17700, At4g35780 und At4g38470 phosphoryliert die MAP-Kinase alternative Serine in dem Substrat. Die hohe Substratspezifität von den *A. thaliana* Kinasen At2g17700, At4g35780 und At4g38470 wird durch dieses Experiment unterstrichen.

#### 4.4 *In-vivo*-Analyse der Vorstufenprotein phosphorylierenden Proteinkinasen

Die *A. thaliana* Proteinkinasen At2g17700 und At4g35780 sind in der Lage eine Reihe von chloroplastidären Vorstufenproteinen zu phosphorylieren. Um zu überprüfen ob diese Eigenschaft der Kinasen auch *in vivo* nachzuweisen ist, wurden T-DNA-Insertionslinien der jeweiligen Gene untersucht.

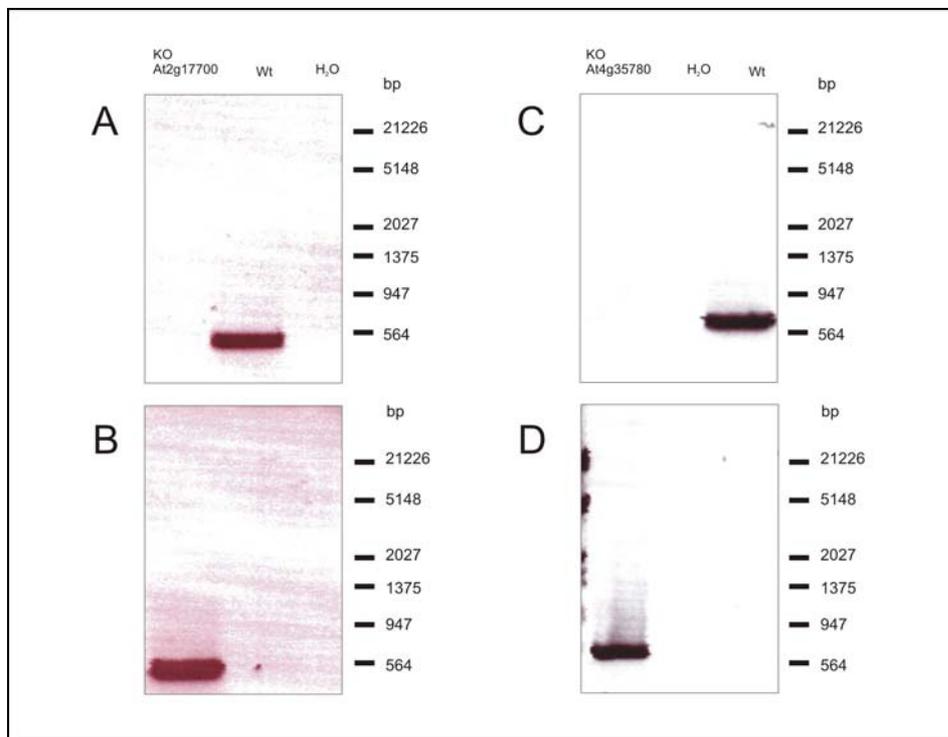


**Abbildung 15: T-DNA Insertionslinien SALK\_072890 und SALK\_139687**

A: Schematische Darstellung der T-DNA-Insertion bei *A. thaliana* im Gen At2g17700. Die Insertion der T-DNA ist im 3. Exon des Gens At2g17700 lokalisiert. Der linke Bereich der T-DNA (left border, LB) befindet sich in 3'-Orientierung zum Gen.

B: Schematische Darstellung der T-DNA-Insertion bei *A. thaliana* im Gen At4g35780. Die Insertion der T-DNA ist im 1. Exon des Gens At4g35780 lokalisiert. Der linke Bereich der T-DNA (left border, LB) befindet sich in 5'-Orientierung zum Gen.

Durch die Insertion der ca. 200 kb großen T-DNA im Gen wird der offene Leserahmen zerstört, so dass kein funktionelles Genprodukt mehr erzeugt werden kann. Die T-DNA aus *A. tumefaciens* inseriert stabil an einer zufälligen Stelle der *Arabidopsis*-DNA. Die Insertionslinien wurden über das Salk Institut Genomic Analysis Laboratory (<http://signal.salk.edu/>) bezogen. Die Insertion der T-DNA lag nach dem Kreuzen der heterozygoten Samen homozygot vor. Für die Proteinkinase At2g17700 ist die T-DNA im 3. Exon des Gens lokalisiert (Abb. 15). Für die Proteinkinase At4g35780 liegt die T-DNA Insertion im 1. Exon des Gens (Abb. 15).



**Abbildung 16: PCR an genomischer DNA zur Überprüfung der T-DNA Insertion**

Zur Verifizierung der T-DNA-Insertion wurde DNA aus Wildtyp Pflanzen und aus Pflanzen, die homozygot eine T-DNA Insertion in dem Gen At2g17700 bzw. At4g35780 besitzen gewonnen.

In der Knock-Out-Pflanze 1 ist keine Amplifikation mit genspezifischen Primer für das At2g17700-Gen mehr zur erhalten (A). Mit Primer, welche am LeftBorder (Lba1) der T-DNA Insertion hybridisieren, und einem genspezifischen Primer lässt sich die Insertion nachweisen (B)

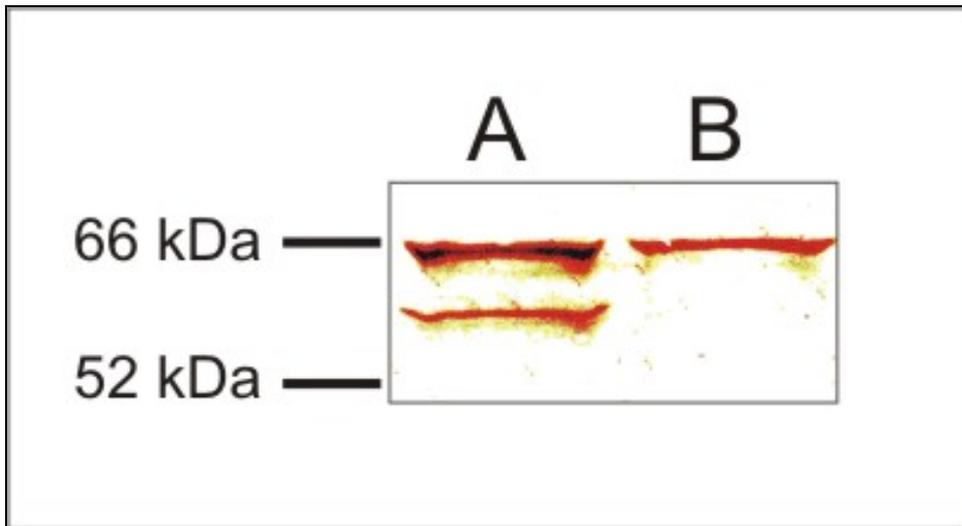
A: Verwendete Primer 1334 und 1178 ; B: Verwendete Primer 1178 und Lba1.

In der Knock-Out-Pflanze 2 ist keine Amplifikation mit genspezifischen Primer für das At4g35780-Gen mehr zur erhalten (C). Mit Primer, die am LeftBorder (Lba1) der T-DNA Insertion hybridisieren, und einem genspezifischen Primer lässt sich die Insertion der T-DNA nachweisen (D)

C: Verwendete Primer 1334 und 1178 ; D: Verwendete Primer 1178 und Lba1

Die Insertion wurde mittels PCR an genomischer DNA überprüft (Abb. 16). Dazu wurden Left-Border-Primer und genspezifische Primer verwendet. Die T-DNA-Insertion lies sich mit dem Primerpaar LB-Primer/genspezifischer-Primer nachweisen. Mit zwei genspezifischen Primer, die nur auf den entsprechenden Exons der Gene At2g17700 und At4g35780 hybridisieren, ließ sich keine DNA amplifizieren. Dies wurde als Nachweis für eine homozygote Insertion gewertet. Für die Analyse der Knock-Out-Linien wurden Pflanzen verwendet, welche homozygot für die jeweilige T-DNA Insertion waren.

Die Insertion der T-DNA zerstört den offenen Leserahmen des Gens. Dies hat zur Folge, dass die Zelle nicht mehr in der Lage ist das entsprechende Genprodukt zu synthetisieren. Um zu überprüfen ob die homozygote T-DNA Insertion auch auf Proteinebene nachzuweisen ist, wurde ein Westernblot mit Extrakt aus Wildtyp-Pflanzen und der Knock-Out-Linie SALK\_072890 (Knock-Out für At2g17700) durchgeführt. Als Antikörper diente Antiserum, welches gegen rekombinantes At2g17700 in Kaninchen hergestellt wurde. In der Pflanze mit der homozygoten T-DNA Insertion lässt sich eine Bande in Höhe von ca. 60 kDa, im Gegensatz zum Wildtyp, nicht mehr nachweisen (Abb. 17). Es ist davon auszugehen, dass die T-DNA-Insertion im Exon 3 des Gens At2g17700 einen kompletten Knock-Out für das Protein At2g17700 bewirkt. Dieser Versuch dient außerdem zur Bestimmung des *in vivo* Molekulargewicht. Das Molekulargewicht von 60 kDa für At2g17700 stimmt sehr gut mit dem berechneten Molekulargewicht überein.



**Abbildung 17: Bestimmung des Molekulargewichtes von At2g1770 *in vivo***

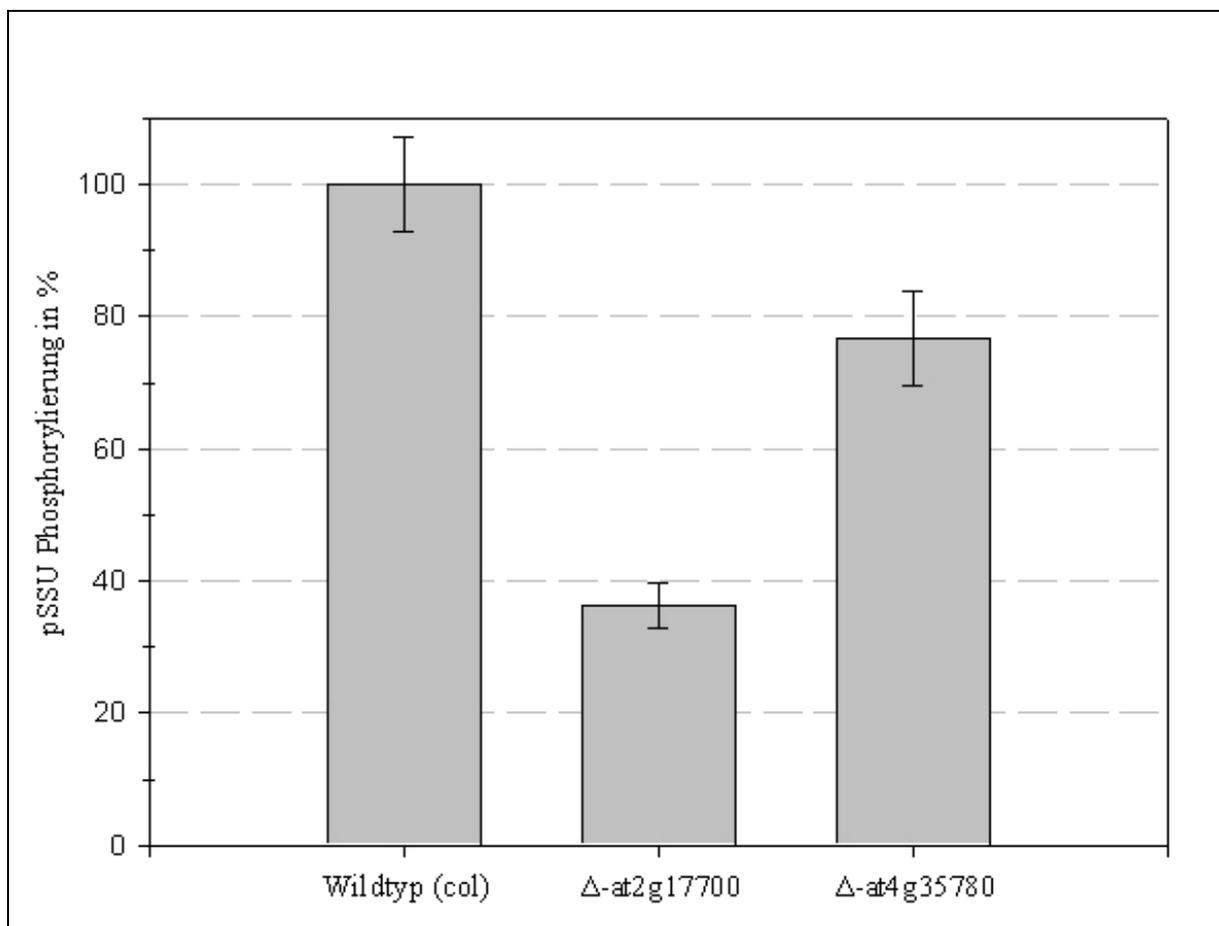
Zur Bestimmung des Molekulargewichtes von At2g1770 *in vivo* wurden die Proteine des Blattextraktes von Wildtyp-Pflanzen und der At2g1770-Knock-Out-Linie auf Nitrozellulosemembran transferiert. Der primäre Antikörper ist gegen rekombinantes At2g1770 gerichtet. In den Pflanzen, in denen das Gen At2g1770 durch T-DNA Insertion deletiert wurde, verschwindet eine Bande bei ca. 60 kDa.

A: Extrakt von *A. thaliana* Wildtype-Pflanzen B: Extrakt aus *A. thaliana* KnockOut-Pflanzen At2g1770

Der Nachweis für den Knock-Out von der Salk-Linie 139687 (Insertion im Gen At4g35780) lässt sich nicht auf Proteinebene bestätigen. Vermutlich erkennt der Antikörper gegen At2g1770 das Protein At4g35780 nicht gut genug. Rekombinantes At4g35780 wird von dem Antikörper  $\alpha$ -At2g1770 deutlich schlechter erkannt (Abb. 19).

#### 4.4.1 Knock-out-Pflanzen von At2g17700 und At4g35780 zeigen eine reduzierte Phosphorylierung von pSSU

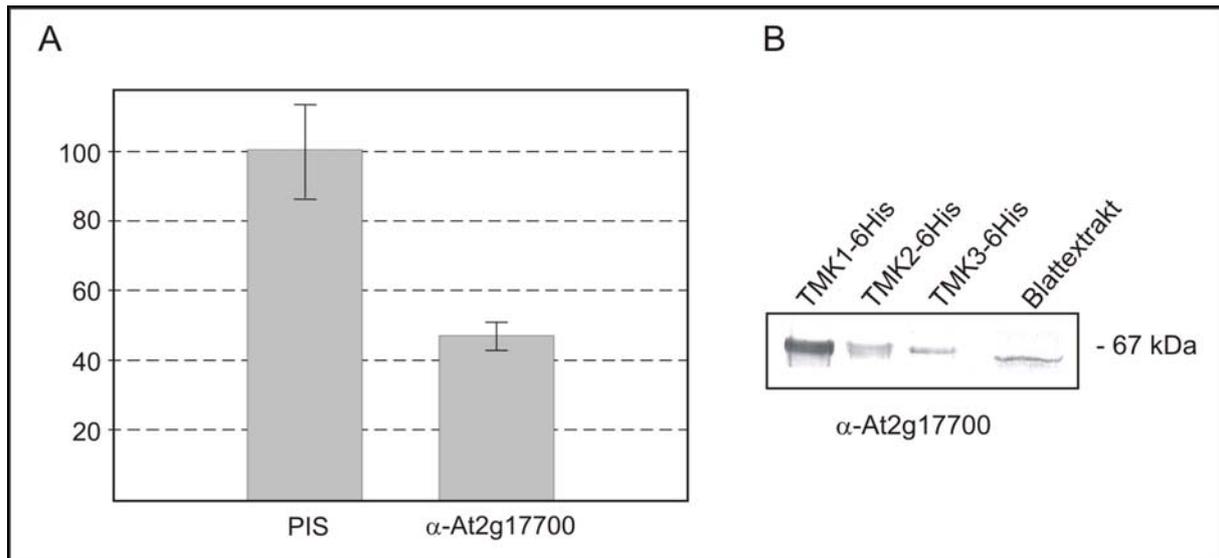
Die rekombinanten Proteinkinasen aus *A. thaliana* At2g17700 und At4g35780 zeigen im *in-vitro*-Assay die spezifische Phosphorylierung von pSSU. Durch T-DNA-Insertionen wurden die beiden Gene in unterschiedlichen Insertionslinien inaktiviert. Wenn die inaktivierten Proteinkinasen für die Phosphorylierung der Vorstufenproteine verantwortlich sind, so sollte sich eine reduzierte Phosphorylierung von pSSU im Blattextrakt der Knock-Out-Linien nachweisen lassen.



**Abbildung 18: Phosphorylierung von pSSU durch Blattextrakt von *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen und Blattextrakt gewonnen aus homozygoten T-DNA Insertionslinien SALK\_072890 und SALK\_139687**

Durch Phenylsepharose gereinigter Blattextrakt von *A. thaliana* Knock-Out-Pflanzen zeigt eine Abnahme der pSSU Phosphorylierung um 64 % bei homozygoten „knock out“ von At2g17700 und um 24 % bei homozygoten „knock out“ von At4g35780 im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde äquivalente Mengen Blattextrakt aus Wildtyp-Pflanzen und den jeweiligen Knock-Out-Pflanzen gleichen Alters hergestellt. Der Blattextrakt wurde über eine Phenylsepharose-Matrix gereinigt (Abb. 2A). Die homozygote T-DNA-Insertion resultiert in beiden Linien in einer Reduktion der pSSU-Phosphorylierung (Abb. 19).



**Abbildung 19: Inhibierung der Enzymaktivität der Vorstufenprotein phosphorylierenden Proteinkinasen im Blattextrakt von *A. thaliana* Wildtype-Pflanzen durch  $\alpha$ -At2g17700**

A: Dargestellt ist die Phosphorylierung von pSSU durch Blattextrakt, gewonnen aus *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen. Als Kontrolle wurde dem Assay Pre-Immune-Serum (PIS) des Tieres aus dem die Antikörper gewonnen wurden, hinzu gegeben. Polyklonale Antikörper, welche gegen rekombinantes At2g17700 hergestellt wurden, inhibieren die Protein-Kinase-Enzymaktivität im Mesophyllzellen-Extrakt von *A. thaliana* um ca. 50%

B: Die polyklonalen Antikörper gegen rekombinantes At2g17700 erkennen nicht alle drei Kinasen gleich gut. Analog zu ihrer Übereinstimmung auf Proteinebene erkennen die Antikörper At2g17700 am besten, während At4g38470 am schlechtesten erkannt wird. Der Blattextrakt aus *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen wird ebenfalls mittelmäßig erkannt

Der Knock-Out der ersten Kinase (At2g17700) zeigt eine Reduktion der enzymatischen Aktivität des Blattextraktes um 64%. Der Knock-Out des Gens At4g35780 jedoch nur um 24%. Die Proteinkinase At2g17700 scheint einen höheren Anteil an der Vorstufenprotein-Phosphorylierung *in vivo* zu besitzen als die Proteinkinase At4g35780.

Durch Aufreinigung von *A. thaliana* Blattextrakt wurde die Proteinkinase At2g17700 identifiziert. Rekombinant exprimiert zeigt dieses Enzym spezifische Phosphorylierung von diversen chloroplastidären Vorstufenproteinen. Wenn diese Proteinkinase für die Vorstufenprotein-Phosphorylierung durch Blattextrakt verantwortlich ist, so sollte sich die Enzymaktivität im Blattextrakt von Wildtyp-Pflanzen durch Antikörper gegen At2g17700 inhibieren lassen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde Antiserum, welches gegen rekombinantes At2g17700 in Kaninchen hergestellt wurde, mit Blattextrakt aus Wildtyp-Pflanzen inkubiert. Abbildung 19A zeigt, dass Antikörper gegen At2g17700 die Enzymaktivität der Vorstufenprotein phosphorylierenden Proteinkinasen im Blattextrakt aus *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen um 50% inhibieren. Eine vollständige Inaktivierung der Phosphorylierung ist auch durch Erhöhung der Antiserumkonzentration oder durch längere Inkubationszeiten nicht möglich. Der Grund dafür ist vermutlich, dass der Antikörper gegen At2g17700 nicht alle drei Kinasen gleich gut erkennt. Äquivalente Mengen der jeweiligen rekombinanten Proteinkinasen At2g17700, At4g35780 und At4g38470 werden vom  $\alpha$ -At2g17700 Antikörper nicht gleich stark angefärbt (Abb. 19B). Daher ist immer noch eine 50% Enzymaktivität im Blattextrakt messbar, welche vermutlich von den nicht vollständig inhibierten Kinasen At4g35780 und At4g38470 stammt.

## 5 Diskussion

Die Mehrzahl der Gene von Chloroplasten als auch von Mitochondrien werden im Zellkern kodiert. Die korrekte Zielsteuerung dieser Proteine ist absolut notwendig, um die Funktion wie auch die Biogenese der Organellen zu ermöglichen. In den meisten Fällen wird dies durch N-terminale Sequenzen im Protein ermöglicht (Glaser et al., 1998; Jarvis und Soll, 2001; Zhang und Glaser, 2002). Der Bedarf an kernkodierten Polypeptiden ist im Laufe eines Organellenlebens nicht immer konstant. Während der Biogenese von Chloroplasten werden eine große Anzahl von Proteinen benötigt, um unter anderem die Thylakoidmembranen zu synthetisieren. Bei voll ausdifferenzierten Organellen schwankt der Bedarf an kernkodierten Polypeptiden ebenfalls (Dessi und Whelan, 1997; Vothknecht und Westhoff, 2001). Zwischen Organell und Kern existieren daher regulatorische Netzwerke, welche den Proteinimport an die jeweiligen Bedürfnisse anpassen. Auf posttranslationaler Ebene könnte die spezifische Phosphorylierung von Vorstufenproteinen in die Regulation des Proteinimports involviert sein. Die Phosphorylierung von chloroplastidären Vorstufenproteinen ist weder für die Zielsteuerung der Proteinen noch für die Importspezifität in das korrekte Organell erforderlich (Nakrieko et al., 2004; Waegemann und Soll, 1996). Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung der Transitsequenz zu einer erhöhten Importrate in die Chloroplasten führt (May und Soll, 2000). Ebenso bindet phosphoryliertes Vorstufenprotein an den primären Rezeptor des TOC-Komplexes (TOC34) mit einer erhöhten Affinität als nicht phosphoryliertes Vorstufenprotein (Schleiff et al., 2002). Das Phosphorylierungssignal könnte dazu führen, dass die entsprechenden Proteine bevorzugt in das Organell importiert werden.

Durch chromatographische Anreicherung und massenspektroskopische Analyse konnte in der vorliegenden Arbeit ein Protein aus *A. thaliana* identifiziert werden, welches spezifisch chloroplastidäre Vorstufenproteine in Pflanzen phosphoryliert. Das Protein wurde in einer Fraktion detektiert, in welcher die enzymatische Aktivität für die Phosphorylierung der kleinen Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat carboxylase/oxygenase (pSSU) 2858fach angereichert war. Durch den Abgleich mit dem *A.-thaliana*-Proteom konnten zwei weitere Proteinkinasen identifiziert werden, At4g35780 und At4g38470. Die Polypeptide zeigen eine sehr hohe Übereinstimmung mit At2g17700 in ihrer Aminosäuresequenz. Ebenso ist die Substratspezifität der drei Kinase weitestgehend identisch. Trotz der sehr hohen Übereinstimmung der drei Proteinkinasen ist in der mittels massenspektrometrischen Peptid-Fingerprint analysierten Fraktion das Protein At2g17700 die einzige Proteinkinase gewesen. Das heterolog exprimierte Enzym At2g17700 ist in der Lage pSSU zu phosphorylieren. Die

Phosphorylierung ist spezifisch für pSSU, da mSSU von dem Enzym nicht phosphoryliert wird. Eine mutierte Form von pSSU, welche durch Mutationen in der Transitsequenz von Blattextrakt nicht mehr phosphoryliert werden kann, wird ebenfalls von dem heterolog exprimierten Enzym nicht mehr phosphoryliert. Die Phosphorylierung findet demnach spezifisch in der Transitsequenz statt. Die Spezifität der Substratphosphorylierung stimmt mit Extrakten, gewonnen aus Erbse, Weizenkeimen, *A. thaliana* und Raps überein (May, 2000; May und Soll, 2000; Waegemann und Soll, 1996). Die heterolog exprimierten Enzyme At4g35780 und At4g38470 weisen exakt das gleiche Phosphorylierungsmuster von pSSU, mSSU und pSSU (M31/34) wie die Kinase At2g17700 auf.

Durch die hohe Übereinstimmung sowohl in der Aminosäuresequenz als auch in der Substratphosphorylierung werden die Proteinkinasen At2g17700, At4g35780 und At4g38470 in der vorliegenden Arbeit als Proteinkinase-Familie charakterisiert, welche für die Phosphorylierung von Vorstufenproteinen verantwortlich ist. Diese Einschätzung deckt sich weitestgehend auch mit jüngsten bioinformatischen Untersuchungen von Rudrabhatla und Mitarbeitern. Sie klassifizieren die drei Kinasen als STY Proteinkinasen (Rudrabhatla et al., 2006). STY-Kinasen sind Kinasen, die in der Lage sind sowohl die Aminosäure Serin und Threonin als auch die Aminosäure Tyrosin zu phosphorylieren. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die heterolog exprimierten Proteinkinasen At2g17700, At4g35780 und At4g38470 chloroplastidäre Vorstufenproteine spezifisch in ihrem Transitpeptid an einen Serin phosphorylieren. Ein Austausch von zwei Serinen zu der Aminosäure Alanin in der Transitsequenz von pSSU an Position 31 und 34 führt dazu, dass dieses Substrat nicht mehr phosphoryliert wird. Bislang wurde noch keine Phosphorylierung von Tyrosinen in N-terminalen Transitsequenzen gezeigt. Man kann daher davon ausgehen, dass die Tyrosin-Kinase-Aktivität der drei Enzyme eine untergeordnete Rolle spielt.

Die Phosphorylierung von pSSU durch die drei Proteinkinasen ist spezifisch. Die Mitglieder der Proteinkinase-Familie weisen exakt das gleiche Phosphorylierungsmuster von pSSU, mSSU und pSSU (M31/34) auf. Im Gegensatz dazu zeigt die nicht zur Familie gehörende Proteinkinase At2g43790 zwar eine Phosphorylierung von pSSU, jedoch erfolgt diese Phosphorylierung nicht spezifisch. Das Substrat wird nicht in der Transitsequenz, sondern im maturen Bereich des Proteins phosphoryliert, da auch die in der Transitsequenz mutierte Form von pSSU phosphoryliert wird. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Phosphorylierung von pSSU durch At2g17700, At4g35780 und At4g38470 spezifisch in der Transitsequenz nicht

selbstverständlich ist. Das Substrat pSSU kann an multiplen Positionen außerhalb des Transitpeptids an einem Serin oder Threonin phosphoryliert werden. Diese hohe Spezifität der Phosphorylierungsreaktion durch At2g17700, At4g35780 und At4g38470 ist ein starkes Indiz, das es sich bei den drei Proteinkinasen und die Vorstufenprotein-phosphorylierende Proteinkinasen in Pflanzen handelt.

Außer pSSU werden noch eine Reihe anderer chloroplastidärer Vorstufenproteinen von den drei Proteinkinasen phosphoryliert (Abbildung 10). Bei dem chloroplastidären Vorstufenprotein des „high chlorophyll fluorescence protein 136“ (pHcf136) zeigt sich ebenfalls eine Phosphorylierung in der Transitsequenz. Die im Transitpeptid mutierte und von Blattextrakt nicht phosphorylierbare Variante pHcf136-M52/54 wird von den Kinasen At2g17700 und At4g35780 deutlich schwächer phosphoryliert. Die Proteinkinase At4g38470 zeigt keine Phosphorylierung der Mutante. Eine Ausnahme stellt das Vorstufenprotein des „oxygen evolving protein“ von 23 kDa dar. Das im Transitpeptid mutierte Protein pOE23-M22 wird vom Blattextrakt nicht phosphoryliert. Das Protein wird *in vivo* in die Thylakoidmembran importiert und besitzt daher eine zweigeteilte Transitsequenz. Das Protein iOE23 besitzt nur noch das Zielsteuerungssignal für die Thylakoide. Der Bereich, der für die Zielsteuerung zum Chloroplasten verantwortlich ist, ist nicht mehr vorhanden. Folglich wird dieses Protein nicht mehr von der im Blattextrakt befindlichen Kinase phosphoryliert.

Die heterolog exprimierten Enzyme weisen ein anderes Phosphorylierungsmuster auf. Für At2g17700 scheint pOE23 kein Substrat darzustellen. Die Enzyme At4g35780 und At4g38470 phosphorylieren die Substrate pOE23, pOE23-M22 und iOE23 zwar, jedoch nicht spezifisch in der Transitsequenz. Es ist möglich, dass zusätzliche zytosolische Faktoren notwendig sind, welche die entsprechende Spezifität bei der Phosphorylierung des chloroplastidären Vorstufenproteins vermitteln. Auch könnten fehlende posttranslationale Modifikationen der Grund für die unspezifische Phosphorylierung sein. Das prokaryotische Expressionssystem wäre in diesen Fall nur bedingt geeignet um diesen Umstand zu untersuchen. Es sollte bei zukünftigen Experimenten durch eukaryotische Expressionssysteme wie Weizenkeimlysat ausgetauscht werden um die spezifische Phosphorylierung von pOE23 weiter zu untersuchen.

Erste Hinweise für die Position, die für die Substraterkennung verantwortlich ist, zeigen die Versuche mit der Proteinkinase At4g38470-M368. Durch den Austausch einer Aminosäure an Position 368 des Enzyms ist die Kinase nicht mehr in der Lage eine Reihe von Substraten zu phosphorylieren. Die Kinaseaktivität von At4g38470-M368 ist nicht beeinträchtigt, da

At4g38470-M368 pSSU weiter phosphoryliert. Auch zeigt At4g38470-M368 eine deutliche Autophosphorylierung. Die Tatsache, dass die Substrate nicht mehr phosphoryliert werden, kann durch eine strukturelle Veränderung des Proteins hervorgerufen worden sein.

Die unterschiedliche Phosphorylierung von pOE23 durch die drei Kinasen weist möglicherweise darauf hin, dass die Enzyme unterschiedliche Aufgaben in der Zelle wahrnehmen könnten. Dies wird auch durch die unterschiedliche Phosphorylierung von pNDPK und pAPC deutlich. Die beiden Proteine stellen gute Substrate für die Proteinkinasen At2g17700 und At4g35780 dar. Das Enzym At4g38470 hingegen ist nicht in der Lage pAPC und pNDPK zu phosphorylieren. Auch das Genexpressionsmuster der drei Kinasen weist daraufhin, dass die Enzyme *in vivo* unterschiedliche Aufgabenschwerpunkte haben (Abbildung 6). Vorstellbar wäre, dass die Kinasen zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten oder in unterschiedlichen Geweben in der Zelle aktiv sind. Auch wäre es möglich, dass eine Kinase auf extrazelluläre Signale reagiert, während eine andere intrazelluläre Signale verarbeitet. Bei einer CO<sub>2</sub>-Atmosphäre von 5% ist At2g17700 in seine mRNA-Expressionlevel deutlich erhöht (<https://genevestigator-1.ethz.ch>). Kohlendioxid wäre ein solches extrazelluläres Signal. Die Pflanze würde durch die Phosphorylierung von pSSU mit einer Importrate des Enzyms, das für die CO<sub>2</sub>-Fixierung zuständig ist auf die Umweltbedingung reagieren.

Mitochondrielle Vorstufenproteine besitzen in den meisten Fällen ebenso wie chloroplastidäre Vorstufenproteine ein N-terminales Transitpeptid. Dieses Zielsteuerungssignal kann ebenfalls an Serinresten phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung bewirkt, ebenso wie bei phosphorylierten chloroplastidären Vorstufenproteinen eine erhöhte Affinität zu Chaperone der HSP70-Familie. Es ist bekannt, dass phosphorylierte chloroplastidäre Vorstufenproteine mit größerer Effizienz in den Chloroplasten importiert werden. Untersuchungen von Robin und Mitarbeitern zeigen, dass die Phosphorylierung bei mitochondrialen Proteinen ebenfalls zu einer erhöhten Importrate führen kann (Anandatheerthavarada et al., 1999; May und Soll, 2000; Robin et al., 2002; Robin et al., 2003). Die Phosphorylierung, die durch At2g17700, At4g35780 und At4g38470 vermittelt wird, beschränkt sich nur auf chloroplastidäre Vorstufenproteine. Das mitochondrielle Vorstufenprotein pF1 $\beta$  (Vorstufenprotein der beta-Untereinheit der mitochondrialen ATP-Synthase), welches ebenfalls ein N-terminales Transitpeptid besitzt, wird von keiner der drei Enzyme als Substrat erkannt.

Die Substratphosphorylierung durch Blattextrakte diverser Pflanzen und durch die drei heterolog exprimierten Proteinkinasen stimmt weitestgehend überein. Dies ist ein wichtiger Hinweis darauf, dass es sich bei den drei Enzymen um die Proteinkinasen handelt, die *in vivo* für die spezifische Phosphorylierung von chloroplastidären Vorstufenproteinen verantwortlich sind. Um diesen Umstand weiter zu untersuchen, wurden homozygote Knock-Out-Linien von *A. thaliana* erzeugt. Aus den jeweiligen Knock-Out-Linien gewonnenene Blattextrakte zeigen eine deutliche Reduzierung in der Phosphorylierung von pSSU im Vergleich zum Blattextrakt aus *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen. Die Knock-Out-Linie von At2g17700 weisen dabei eine Reduzierung von 64% auf, während die Knock-Out-Linie von At4g35780 nur eine 24%tige Reduzierung aufweist. Die Genexpressionsprofile der drei Kinasen zeigen, dass sie in allen Geweben exprimiert werden. Die Analyse der Knock-Out-Pflanzen weist darauf hin, dass auf Proteinebene die Proteinkinase At2g17700 die dominante Vorstufenprotein-phosphorylierende-Kinase in photosynthetischen Geweben ist. Diese These wird unterstützt durch die Tatsache, dass der massenspektroskopische Peptid-Fingerprint nur At2g17700 als einzige von den drei Proteinkinasen identifiziert hat, obwohl man davon ausgehen kann, dass aufgrund ihrer hohen Übereinstimmung auf Proteinebene, die drei Enzyme auch ähnliche Bindungseigenschaften an die chromatographischen Matrices besitzen.

Gegen rekombinantes At2g17700 erzeugte Antikörper sind in der Lage die Enzymaktivität von *A.-thaliana*-Blattextrakt um 50% zu reduzieren. Diese Tatsache stützt die Hypothese, dass At2g17700, At4g35780 und At4g38470 für die Phosphorylierung von chloroplastidären Vorstufenproteinen durch Pflanzenextrakte verantwortlich sind. Die verbleibende Restaktivität von 50% ist darauf zurückzuführen, dass der Antikörper primär At2g17700 erkennt (Abbildung 21). At4g35780 und At4g38470 werden deutlich schwächer erkannt. Außerdem führt eine Bindung an Antikörper nicht zwangsläufig zu einer 100%igen Inaktivierung des Enzyms.

Der Antikörper gegen rekombinantes At2g17700 zeigt im Westernblot gegen *A.-thaliana*-Blattextrakt eine deutliche Bande von ca. 61 kDa. Diese Größe stimmt mit der berechneten Größe von At2g17700 überein. Es scheinen Unterschiede im Molekulargewicht der Vorstufenprotein-phosphorylierende-Proteinkinasen in den jeweiligen Pflanzenspezies zu existieren.. Mit Hilfe von FSBA (5'-(4-Fluorosulfonylbenzoyl)-Adenosin), das mit den aktiven Zentren nukleotidbindender Proteine, z.B. Kinasen, interagiert, konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierungsreaktion der Vorstufenprotein-Kinase inhibiert wird. Durch Markierung der Vorstufenprotein-Kinase mit <sup>14</sup>C-FSBA ergaben sich Hinweise auf die

Größe der Vorstufenprotein-phosphorylierende-Proteinkinase in Erbse, welche mit ca. 53 kD angegeben wird (Waegemann und Soll, unpublizierte Ergebnisse). Untersuchung von May mit der gleichen Methode zeigen für Weizen ein Molekulargewicht von 51 kDa an (May, 2000).

Mit der vorliegen Arbeit werden drei Mitglieder einer Proteinkinase-Familie vorgestellt, die für die Phosphorylierung von chloroplastidären Vorstufenproteinen verantwortlich sind. Sowohl die biochemische Charakterisierung als auch die Analyse von zwei unabhängigen Knock-Out-Linien unterstützen diese Hypothese. Die Proteinkinasen At2g17700, At4g35780 und At4g38470 könnten somit Teil eines regulatorischen Netzwerkes sein, welches die Importrate von Protein in den Chloroplasten steuert. Die Unterschiede in der Substratphosphorylierung von Blattextrakt und der heterolog exprimierten Proteinkinasen weist auf das Vorhandensein von weiteren zytosolischen Faktoren hin.

Durch die Erkenntnisse, die über die drei *A.-thaliana*-Proteinkinasen At2g17700, At4g35780 und At4g38470 in der vorliegenden Arbeit gewonnen wurden, ist zukünftig die Möglichkeit gegeben weitere Komponenten des regulatorischen Netzwerkes, welches an dem Proteinimport von Chloroplasten beteiligt ist zu identifizieren.

## 6 Zusammenfassung

Der größte Teil der chloroplastidäre Protein werden an zytosolischen Ribosomen synthetisiert und posttranslational in den Chloroplasten importiert. Einige dieser Proteine können in ihrem N-terminalen Transitpeptid von einer bislang unbekannt Proteinkinase phosphoryliert werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnten drei bislang nur bioinformatisch beschriebene Proteinkinasen identifiziert werden, welche spezifisch chloroplastidäre Vorstufenproteine in ihrem Transitpeptid phosphorylieren. Die Proteinkinase At2g17700 wurde aus *Arabidopsis-thaliana*-Rosettenblätter chromatographisch angereichert und massenspektroskopisch identifiziert. Die Proteinkinasen At4g35780 und At4g38470 wurden durch einen Abgleich mit dem Proteom von *Arabidopsis thaliana* identifiziert. Die Übereinstimmung auf Proteinebene zu At2g17700 beträgt zwischen 58-77%. Die cDNA der Enzyme wurde kloniert und die entsprechenden Proteine heterolog exprimiert. Alle drei rekombinanten Proteinkinasen phosphorylieren eine Reihe von chloroplastidären Vorstufenproteinen. Die Substratspezifität der drei Proteinkinasen zeigt deutliche Unterschiede bei den jeweiligen Vorstufenproteinen. Mitochondrielle Vorstufenproteine werden von den drei Proteinkinasen nicht phosphoryliert. Die Phosphorylierung von pSSU und pHcf136 durch die drei Proteinkinasen findet spezifisch in der N-terminalen Transitsequenz der Proteine statt. Die Proteinkinasen At2g17700 und At4g35780 weisen vergleichbare Transkriptmengen in allen Pflanzengewebe auf. Das Gen der Proteinkinase At4g38470 hat gegenüber den anderen beiden Enzymen ein durchschnittlich höheres mRNA Expressionsniveau und scheint vornehmlich in den Wurzel und den Wurzelanlagen exprimiert zu werden. Die Analyse von T-DNA-Insertionslinien für die Proteinkinasen At2g17700 und At4g35780 hat erste Hinweise erbracht, dass diese Enzyme auch für die Vorstufenprotein-Phosphorylierung *in vivo* verantwortlich sind. Die Phosphorylierung von pSSU durch Blattextrakt, gewonnen aus den jeweiligen Mutanten, ist um bis 60% reduziert. Aus Wildtyp-Pflanzen gewonnenes Blattextrakt lässt sich mit Antiserum gegen rekombinantes At2g17700 um 50% in seiner pSSU-Phosphorylierung depletieren.

Bei den drei Proteinkinasen handelt es sich um eine Proteinfamilie, die vermutlich für die Vorstufenprotein-Phosphorylierung von Chloroplastenproteinen verantwortlich ist. Differenzen in der Substratspezifität und in den mRNA-Expressionslevel weisen auf unterschiedliche Aufgaben der drei Kinasen in der Zelle hin.

Mit der Identifizierung dieser Proteinkinasefamilie ist es nun möglich weitere Komponenten, die an dem regulatorische Netzwerk des Proteinimportes von Chloroplasten beteiligt, sind zu untersuchen.

## 7 Literatur

- Anandatheerthavarada, H. K., Biswas, G., Mullick, J., Sepuri, N. B., Otvos, L., Pain, D., und Avadhani, N. G.** (1999) Dual targeting of cytochrome P4502B1 to endoplasmic reticulum and mitochondria involves a novel signal activation by cyclic AMP-dependent phosphorylation at ser128. *EMBO J.* 18, 5494-5504
- Becker, T., Hritz, J., Vogel, M., Caliebe, A., Bukau, B., Soll, J., und Schleiff, E.** (2004a) Toc12, a novel subunit of the intermembrane space preprotein translocon of chloroplasts. *Mol.Biol.Cell* 15, 5130-5144
- Becker, T., Jelic, M., Vojta, A., Radunz, A., Soll, J., und Schleiff, E.** (2004b) Preprotein recognition by the Toc complex. *EMBO J.* 23, 520-530
- Benavente, L. M. und Alonso, J. M.** (2006) Molecular mechanisms of ethylene signaling in Arabidopsis. *Mol.Biosyst.* 2, 165-173
- Birnboim, H. C. und Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523
- Blum, H., Beier, H., und Gross, H. J** (1987) **Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels.** *Eur.J.Biochem* 46, 84-88
- Bogre, L., Calderini, O., Binarova, P., Mattauch, M., Till, S., Kiegerl, S., Jonak, C., Pollaschek, C., Barker, P., Huskisson, N. S., Hirt, H., und Heberle-Bors, E.** (1999) A MAP kinase is activated late in plant mitosis and becomes localized to the plane of cell division. *Plant Cell* 11, 101-113

- Bradford, M. M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72, 248-254
- Bruce, B. D.** (2001) The paradox of plastid transit peptides: conservation of function despite divergence in primary structure. *Biochim.Biophys.Acta* 1541, 2-21
- Butterfield, Nicholas J.** (2000) *Bangiomorpha pubescens* n. gen., n. sp.: implications for the evolution of sex, multicellularity, and the Mesoproterozoic/Neoproterozoic radiation of eukaryotes. *Paleobiology* 26, 386-404
- Cavalier-Smith, T.** (2000) Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends Plant Sci.* 5, 174-182
- Chen, X. und Schnell, D. J.** (1999) Protein import into chloroplasts. *Trends Cell Biol.* 9, 222-227
- Del Sal, G., Manfioletti, G., und Schneider, C.** (1988) A one-tube plasmid DNA mini-preparation suitable for sequencing. *Nucleic Acids Res.* 16, 9878
- Deshaies, R. J., Koch, B. D., Werner-Washburne, M., Craig, E. A., und Schekman, R.** (1988) A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* 332, 800-805
- Dessi, P. und Whelan, J.** (1997) Temporal regulation of in vitro import of precursor proteins into tobacco mitochondria. *FEBS Lett.* 415, 173-178
- Dobberstein, B., Blobel, G., und Chua, N. H.** (1977) In vitro synthesis and processing of a putative precursor for the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 74, 1082-1085

- Dolezal, P., Likic, V., Tachezy, J., und Lithgow, T.** (2006) Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. *Science* 313, 314-318
- Emanuelsson, O. und von Heijne, G.** (2001) Prediction of organellar targeting signals. *Biochim.Biophys.Acta* 1541, 114-119
- Glaser, E., Sjoling, S., Tanudji, M., und Whelan, J.** (1998) Mitochondrial protein import in plants. Signals, sorting, targeting, processing and regulation. *Plant Mol.Biol.* 38, 311-338
- Gorlich, D.** (1998) Transport into and out of the cell nucleus. *EMBO J.* 17, 2721-2727
- Hanks, S. K. und Quinn, A. M.** (1991) Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol.* 200, 38-62
- Hanks, S. K., Quinn, A. M., und Hunter, T.** (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241, 42-52
- Heiland, I. und Erdmann, R.** (2005) Biogenesis of peroxisomes. Topogenesis of the peroxisomal membrane and matrix proteins. *FEBS J.* 272, 2362-2372
- Heins, L., Mehrle, A., Hemmler, R., Wagner, R., Kuchler, M., Hormann, F., Sveshnikov, D., und Soll, J.** (2002) The preprotein conducting channel at the inner envelope membrane of plastids. *EMBO J.* 21, 2616-2625
- Hennekes, H., Peter, M., Weber, K., und Nigg, E. A.** (1993) Phosphorylation on protein kinase C sites inhibits nuclear import of lamin B2. *J.Cell Biol.* 120, 1293-1304

- Hofmann, N. R. und Theg, S. M.** (2005) Protein- and energy-mediated targeting of chloroplast outer envelope membrane proteins. *Plant J.* 44, 917-927
- Ichimura, K., Mizoguchi, T., Yoshida, R., Yuasa, T., und Shinozaki, K.** (2000) Various abiotic stresses rapidly activate Arabidopsis MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *Plant J.* 24, 655-665
- Ingram, G. C. und Waites, R.** (2006) Keeping it together: co-ordinating plant growth. *Curr.Opin.Plant Biol.* 9, 12-20
- Jackson-Constan, D., Akita, M., und Keegstra, K.** (2001) Molecular chaperones involved in chloroplast protein import. *Biochim.Biophys.Acta* 1541, 102-113
- Jarvis, P. und Soll, J.** (2001) Toc, Tic, and chloroplast protein import. *Biochim.Biophys.Acta* 1541, 64-79
- Jarvis, P. und Soll, J.** (2002) Toc, tic, and chloroplast protein import. *Biochim.Biophys.Acta* 1590, 177-189
- Jelic, M., Sveshnikova, N., Motzkus, M., Horth, P., Soll, J., und Schleiff, E.** (2002) The chloroplast import receptor Toc34 functions as preprotein-regulated GTPase. *Biol.Chem.* 383, 1875-1883
- Jonak, C., Heberle-Bors, E., und Hirt, H.** (1994) MAP kinases: universal multi-purpose signaling tools. *Plant Mol.Biol.* 24, 407-416
- Jonak, C., Kiegerl, S., Ligterink, W., Barker, P. J., Huskisson, N. S., und Hirt, H.** (1996) Stress signaling in plants: a mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 11274-11279
- Keegstra, K. und Cline, K.** (1999) Protein import and routing systems of chloroplasts. *Plant Cell* 11, 557-570

- Kessler, F. und Schnell, D. J.** (2004) Chloroplast protein import: solve the GTPase riddle for entry. *Trends Cell Biol.* 14, 334-338
- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Leister, D.** (2003) Chloroplast research in the genomic age. *Trends Genet.* 19, 47-56
- Lowry, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., und RANDALL, R. J.** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193, 265-275
- Margulis, L.** (1971) The origin of plant and animal cells. *Am.Sci.* 59, 230-235
- Martinez-Barajas, E. und Randall, D. D.** (1998) Purification and characterization of a glucokinase from young tomato (*Lycopersicon esculentum* L. Mill.) fruit. *Planta* 205, 567-573
- May, T.** (2000) Proteinimport in Chloroplasten. *Doktorarbeit Universität Kiel*
- May, T. und Soll, J.** (1999) Chloroplast precursor protein translocon. *FEBS Lett.* 452, 52-56
- May, T. und Soll, J.** (2000) 14-3-3 proteins form a guidance complex with chloroplast precursor proteins in plants. *Plant Cell* 12, 53-64
- Miras, S., Salvi, D., Ferro, M., Grunwald, D., Garin, J., Joyard, J., und Rolland, N.** (2002) Non-canonical transit peptide for import into the chloroplast. *J.Biol.Chem.* 277, 47770-47778

- Mizoguchi, T., Putterill, J., and Ohkoshi, Y.** (2006) Kinase and phosphatase: the cog and spring of the circadian clock. *Int.Rev.Cytol.* 250, 47-72
- Moll, T., Tebb, G., Surana, U., Robitsch, H., and Nasmyth, K.** (1991) The role of phosphorylation and the CDC28 protein kinase in cell cycle-regulated nuclear import of the *S. cerevisiae* transcription factor SWI5. *Cell* 66, 743-758
- Nada, A. und Soll, J.** (2004) Inner envelope protein 32 is imported into chloroplasts by a novel pathway. *J.Cell Sci.* 117, 3975-3982
- Nakrieko, K. A., Mould, R. M., and Smith, A. G.** (2004) Fidelity of targeting to chloroplasts is not affected by removal of the phosphorylation site from the transit peptide. *Eur.J.Biochem* 271, 509-516
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., and Ehrhardt, W.** (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9, 255-262
- Peck, S. C.** (2006) Analysis of protein phosphorylation: methods and strategies for studying kinases and substrates. *Plant J.* 45, 512-522
- Rehling, P., Brandner, K., und Pfanner, N.** (2004) Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 5, 519-530
- Rial, D. V., Arakaki, A. K., und Ceccarelli, E. A.** (2000) Interaction of the targeting sequence of chloroplast precursors with Hsp70 molecular chaperones. *Eur.J.Biochem* 267, 6239-6248

- Robin, M. A., Anandatheerthavarada, H. K., Biswas, G., Sepuri, N. B., Gordon, D. M., Pain, D., und Avadhani, N. G.** (2002) Bimodal targeting of microsomal CYP2E1 to mitochondria through activation of an N-terminal chimeric signal by cAMP-mediated phosphorylation. *J.Biol.Chem.* 277, 40583-40593
- Robin, M. A., Prabu, S. K., Raza, H., Anandatheerthavarada, H. K., und Avadhani, N. G.** (2003) Phosphorylation enhances mitochondrial targeting of GSTA4-4 through increased affinity for binding to cytoplasmic Hsp70. *J.Biol.Chem.* 278, 18960-18970
- Rudrabhatla, P., Reddy, M. M., und Rajasekharan, R.** (2006) Genome-wide analysis and experimentation of plant serine/ threonine/tyrosine-specific protein kinases. *Plant Mol.Biol.* 60, 293-319
- Schleiff, E., Jelic, M., und Soll, J.** (2003) A GTP-driven motor moves proteins across the outer envelope of chloroplasts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100, 4604-4609
- Schleiff, E., Soll, J., Sveshnikova, N., Tien, R., Wright, S., Dabney-Smith, C., Subramanian, C., und Bruce, B. D.** (2002) Structural and guanosine triphosphate/diphosphate requirements for transit peptide recognition by the cytosolic domain of the chloroplast outer envelope receptor, Toc34. *Biochemistry* 41, 1934-1946
- Soll, J. und Schleiff, E.** (2004) Protein import into chloroplasts. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 5, 198-208
- Stoebe, B. und Maier, U. G.** (2002) One, two, three: nature's tool box for building plastids. *Protoplasma* 219, 123-130
- Struglics, A. und Hakansson, G.** (1999) Purification of a serine and histidine phosphorylated mitochondrial nucleoside diphosphate kinase from *Pisum sativum*. *Eur.J.Biochem* 262, 765-773

- Tena, G., Asai, T., Chiu, W. L., und Sheen, J.** (2001) Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Curr.Opin.Plant Biol.* 4, 392-400
- Timmis, J. N., Ayliffe, M. A., Huang, C. Y., und Martin, W.** (2004) Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat.Rev.Genet.* 5, 123-135
- Towbin, H., Staehelin, T., und Gordon, J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology* 24, 145-149
- Tranel, P. J., Froehlich, J., Goyal, A., und 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, 2436-2446
- van Dooren, G. G., Schwartzbach, S. D., Osafune, T., und McFadden, G. I.** (2001) Translocation of proteins across the multiple membranes of complex plastids. *Biochim.Biophys.Acta* 1541, 34-53
- von Heijne, G. und Nishikawa, K.** (1991) Chloroplast transit peptides. The perfect random coil? *FEBS Lett.* 278, 1-3
- Vothknecht, U. C. und Westhoff, P.** (2001) Biogenesis and origin of thylakoid membranes. *Biochim.Biophys.Acta* 1541, 91-101
- Waegemann, K.** (1990) Translocation of proteins into isolated chloroplasts requires cytosolic factors to obtain import competence. *FEBS Lett.* 261, 89-92
- Waegemann, K. und Soll, J.** (1996) Phosphorylation of the transit sequence of chloroplast precursor proteins. *J.Biol.Chem.* 271, 6545-6554

- Yang, J., Winkler, K., Yoshida, M., und Kornbluth, S.** (1999) Maintenance of G2 arrest in the *Xenopus* oocyte: a role for 14-3-3-mediated inhibition of Cdc25 nuclear import. *EMBO J.* 18, 2174-2183
- Zhang, T., Liu, Y., Yang, T., Zhang, L., Xu, S., Xue, L., und An, L.** (2006) Diverse signals converge at MAPK cascades in plant. *Plant Physiol Biochem*
- Zhang, X. P. und Glaser, E.** (2002) Interaction of plant mitochondrial and chloroplast signal peptides with the Hsp70 molecular chaperone. *Trends Plant Sci.* 7, 14-21
- Zimmermann, R., Sagstetter, M., Lewis, M. J., und Pelham, H. R.** (1988) Seventy-kilodalton heat shock proteins and an additional component from reticulocyte lysate stimulate import of M13 procoat protein into microsomes. *EMBO J.* 7, 2875-2880

27.06.1973	geboren in Mainz
09-1984 – 07-1987	Johannes-Gutenberg-Gymnasium Mainz
09-1987 – 05-1993	Abitur, Otto-Hahn Gymnasium Göttingen
10-1994 – 08-2000	Biologiestudium, Georg-August-Universität Göttingen
09-2000 – 09-2001	Diplomarbeit an der Georg-August-Universität Göttingen
05-2002 – 11-2006	Promotion an der Ludwig-Maximilians Universität München

## **Ehrenwörtliche Versicherung**

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde.

Torsten Martin, München, Dezember 2006

## **Erklärung**

Diese Dissertation wurde keiner weiteren Prüfungskommission weder in Teilen noch als Ganzes vorgelegt. Ich habe nicht versucht, anderweitig eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

Torsten Martin, München, Dezember 2006

## Veröffentlichung

**Martin, T.**, Sharma, R., Sippel, C., Waagemann, K., Soll, J., und Vothknecht, U. C. (2006) A protein kinase family in Arabidopsis phosphorylates chloroplast precursor proteins. *J.Biol.Chem.*