

Proteinimport in Chloroplasten

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

Vorgelegt von

Penelope Strittmatter

München

2011

1. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Soll

2. Gutachter: PD Dr. Jörg Meurer

Eingereicht am: 11.07.2011

Tag der mündlichen Prüfung: 16.09.2011

Willst du dich am Ganzen erquicken, so musst du das Ganze im Kleinsten erblicken.

Johann Wolfgang von Goethe

Ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt wurde.

München, den 11.07.2011

Penelope Strittmatter

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich zuvor nicht versucht habe, anderweitig eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen. Die vorliegende Dissertation wurde keiner weiteren Prüfungskommission weder in Teilen noch als Ganzes vorgelegt.

München, den 11.07.2011

Penelope Strittmatter

Zusammenfassung

Die überwiegende Mehrzahl der chloroplastidären Proteine ist im Nukleus kodiert und muss folglich posttranslational in das Organell importiert werden. Der Transport dieser Vorstufenproteine in die Chloroplasten wird von zwei multimeren Proteinkomplexen bewerkstelligt, den Toc- (Translocon at the outer envelope of chloroplasts) und Tic- (Translocon at the inner envelope of chloroplasts) Komplexen. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Aspekte des Proteinimports analysiert: (i) die Evolution des Proteintransports, (ii) die Importwege von Proteinen der inneren Hüllmembran und (iii) die Struktur und Funktion des Kanalproteins Tic110. Zur Untersuchung der Evolution des Proteinimports wurde die Translokation verschiedener Vorstufenproteine in Chloroplasten höherer Pflanzen mit der in Chloroplasten des Mooses *Physcomitrella patens* verglichen. Dabei wurden Kinetik, Energiebedarf und Prozessierung analysiert. Dies ermöglicht Aussagen über die Entwicklung des Proteintransports, da bekannt ist, dass die Zusammensetzung der Toc- und Tic-Komplexe in der nicht-vaskulären Pflanze *P. patens* Unterschiede zu den Importapparaten höherer Pflanzen aufweist. Es konnte verdeutlicht werden, dass die untersuchten Vorstufenproteine dennoch das gleiche Importverhalten in den analysierten Modellsystemen zeigen, was darauf hinweist, dass die Importwege trotz der Unterschiede in den Translokationskomplexen konserviert sind. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde der Import von Proteinen der inneren Hüllmembran analysiert, für welche zwei unterschiedliche Wege beschrieben wurden: im „conservative-sorting“-Weg werden die Proteine über die Toc- und Tic-Komplexe in das Stroma transportiert, wo das Erkennungssignal von der stromalen Prozessierungs-peptidase vom maturen Protein getrennt wird, bevor anschließend die Insertion der Proteine in die Membran erfolgt. Beim „stop-transfer“-Weg dagegen stagnieren die Proteine auf Höhe des Translokationskanals der inneren Hüllmembran und werden von dort lateral in die Membran inseriert. Eine systematische Charakterisierung der Importwege hydrophober Proteine der inneren Membran in Chloroplasten von *Pisum sativum* bezüglich Energiebedarf, Nutzung von Rezeptorkomponenten, sowie Bildung löslicher Intermedie-te konnte zeigen, dass die Insertion der untersuchten Vorstufenproteine in die innere Hüllmembran mittels des „stop-transfer“-Weges erfolgt.

Des Weiteren wurde die Struktur und Funktion des Kanalproteins der inneren Chloroplastenmembran - Tic110 - näher untersucht, wobei vor allem die Verankerung

von Tic110 in die Membran von Interesse war. Tic110 besitzt zwei N-terminale, hydrophobe Transmembranhelices, welche für die Verankerung in die Membran verantwortlich sind, sowie vier C-terminale, amphipatische Transmembrandomänen. In dieser Arbeit konnte mittels Sequenzanalyse ein konservierter Bereich am Ende der ersten amphipatischen Helix identifiziert werden, welcher ebenfalls maßgeblich an der Membranverankerung beteiligt ist. Eine Mutation dieser Domäne führt zu einer Konformationsänderung des Proteins, woraufhin es nicht mehr in der Lage ist, stabil in Membranen zu inserieren. Die Topologie von Tic110 macht deutlich, dass große Teile des Proteins sowohl in den Intermembranraum, als auch in das Stroma hineinragen, wohingegen die amphipatischen Transmembrandomänen den Translokationskanal bilden. In dieser Arbeit konnte ein künstliches Importsystem mittels in Liposomen rekonstituiertem Tic110 etabliert werden, wodurch nicht nur gezeigt werden konnte, dass Tic110 in der Lage ist, Vorstufenproteine zu binden, sondern auch, dass eine Translokation der Proteine erfolgen kann. Die Daten weisen auf eine bedeutende Rolle von Tic110 als Proteinimportkanal der inneren Hüllmembran hin.

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Einleitung	3
2.1	Charakterisierung des Proteinimports in Chloroplasten	7
2.1.1	<i>In vitro</i> Import in Chloroplasten aus <i>Physcomitrella patens</i>	7
2.1.2	<i>In vitro</i> Import und Insertion in die innere Hüllmembran von Chloroplasten aus <i>Pisum sativum</i>	8
2.1.3	Lokalisierung von DJ-1c in <i>Pisum sativum</i>	8
2.2	Struktur und Funktion von Tic110	9
2.3	Zielsetzung dieser Arbeit	10
3	Material	11
3.1	Chemikalien	11
3.2	Enzyme	11
3.3	Stämme, Vektoren und Oligonukleotide	11
3.4	Molekulargewichts- und Größenstandards	12
3.5	Antikörper	13
4	Methoden	14
4.1	Molekularbiologische Methoden	14
4.1.1	Allgemeine Molekularbiologische Methoden	14
4.1.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	14
4.1.3	Klonierungsstrategien	14
4.1.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	14
4.1.5	Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA	15
4.1.6	Sequenzierung	15
4.1.7	Heterologe Proteinüberexpressionen in <i>E. coli</i>	15
4.1.8	<i>In vitro</i> Transkription und Translation	16
4.2	Zellbiologische Methoden	17
4.2.1	Isolierung intakter Chloroplasten aus <i>Pisum sativum</i>	17
4.2.2	Isolierung intakter Protoplasten und Chloroplasten aus <i>Physcomitrella patens</i>	18
4.2.3	Behandlung der Chloroplasten und des Translationsprodukts vor dem Import	18

4.2.4	<i>In vitro</i> Import in isolierte Chloroplasten und Nachbehandlung der Chloroplasten	19
4.2.5	Lokalisierung des importierten Proteine innerhalb der Chloroplasten	21
4.2.6	Stromale Prozessierungsreaktion	21
4.2.7	Isolierung intakter Mitochondrien aus <i>Pisum sativum</i>	22
4.2.8	<i>In vitro</i> Import in isolierte Mitochondrien	22
4.2.9	<i>In vitro</i> dualer Import in isolierte <i>Pisum sativum</i> Mitochondrien und Chloroplasten	23
4.3	Biochemische Methoden	24
4.3.1	Überexpression und Aufreinigung psTic110ΔN.....	24
4.3.2	Herstellung von Liposomen und Proteoliposomen	25
4.3.3	Anbindung an Liposomen	25
4.3.4	Transport in Proteoliposomen.....	26
4.3.5	Sucrose-Gradient	26
4.3.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE))	26
4.3.7	Immunodetektion von Proteinen	27
4.3.8	Trichloressigsäure (TCA) –Fällung von Proteinen.....	28
4.3.9	Methanol-Chloroform-Fällung	28
4.4	Pflanzenbiologische Methoden.....	29
5	Ergebnisse	30
5.1	Charakterisierung des Proteinimports in Chloroplasten.....	30
5.1.1	<i>In vitro</i> Import in Chloroplasten aus <i>Physcomitrella patens</i>	30
5.1.2	<i>In vitro</i> Import und Insertion in die innere Hüllmembran von Chloroplasten aus <i>Pisum sativum</i>	32
5.1.3	Lokalisierung von DJ-1c in <i>Pisum sativum</i>	37
5.2	Struktur von Tic110.....	41
5.3	Funktion von Tic110	49
6	Diskussion.....	55
6.1	Charakterisierung des Proteinimports in Chloroplasten.....	55
6.1.1	<i>In vitro</i> Import in Chloroplasten aus <i>Physcomitrella patens</i>	55
6.1.2	<i>In vitro</i> Import und Insertion in die innere Hüllmembran von Chloroplasten von <i>Pisum sativum</i>	57
6.1.3	Lokalisierung von DJ-1c in <i>Pisum sativum</i>	60
6.2	Struktur von Tic110.....	62
6.3	Funktion von Tic110	64
7	Literatur:	67

8	Lebenslauf.....	75
9	Veröffentlichungen	77
9.1	Publikationen	77
9.2	Reviews	77
9.3	Poster	77
10	Danksagung	78

1 Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäuren
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AP	Alkalische Phosphatase
bp	Basenpaar
β-ME	β-Mercaptoethanol
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
cDNA	komplementäre (copy-) DNA
CaM	Calmodulin
Ct	Carboxyterminus
Cys	Cystein
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
F	Phenylalanin
FNR	Ferredoxin-NADP(H) Oxidoreductase
G	Glycin
HAc	Essigsäure
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure
His	Histidin
Hip	Hsp70 bindendes Protein
HMW	Hoch Molekular Gewicht
Hop	Hsp90 organisierendes Protein
Hsp	Heat shock Protein
HP	Hypothetisches Protein
I	Isoleucin
IE	Innere Hüllmembran
IMS	Intermembranraum
L	Leucin
MeOH	Methanol
Met	Methionin
mRNA	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure
NADP ⁺	Nicotinamid Adenin Dinucleotide Phosphat, oxidierte Form
NADPH	Nicotinamid Adenin Dinucleotide Phosphat, reduzierte Form
Nt	Aminoterninus
OE	äußere Hüllmembran
PAGE	Polyacrylamid Gel Electrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pp	<i>Physcomitrella patens</i>
Ps	<i>Pisum sativum</i>
rpm	Runden pro Minute
RT	Raumtemperatur
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase

SDR	Short-Chain Dehydrogenase/Reductase
SDS	Natrium Dodecyl Sulphat
S	Serine
SPP	Stromale Prozessierungspeptidase
SSU	Ribulose-1,5-Bisphosphat Carboxylase/Oxygenase, kleine Untereinheit
Tic	Translocon an der äußeren Hüllmembran der Chloroplasten
TP	Erkennungssignal
TPR	Tetratricopeptide Repeat
Trx	Thioredoxin
Vipp1	Vesicle inducing Protein 1
W	Tryptophan
WT	Wildtyp
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

2 Einleitung

Plastiden sind vielseitige Organellen der Pflanzen. Charakteristisch für grünes Gewebe sind Chloroplasten, die Orte der Photosynthese. Wie auch Mitochondrien entstanden Chloroplasten durch Endosymbiose (Margulis, 1970). Sie entwickelten sich aus einem ursprünglichen Cyanobakterium, welches von einer eukaryotischen Zelle aufgenommen wurde. Das Genom der Plastiden wurde im Laufe der Evolution drastisch reduziert, da es durch horizontalen Gentransfer in den Wirtszellkern verlagert wurde. Folglich werden mehr als 98 % der Plastidenproteine an cytosolischen Ribosomen translatiert (Leister, 2003). Proteine, die für die Chloroplasten bestimmt sind, enthalten ein Erkennungssignal, welches nötig und ausreichend ist, um die Zielsteuerung zum Chloroplasten zu gewährleisten. Es gibt 2 Klassen an Erkennungssignalen. Die erste Klasse besitzt ein internes, nicht abspaltbares Signal, welches häufig in Proteinen der äußeren Hüllmembran (OEPs) gefunden wird (Bölter *et al.*, 1999; Li und Chen, 1996; Pohlmeier *et al.*, 1997; Pohlmeier *et al.*, 1998; Salomon *et al.*, 1990; Seedorf *et al.*, 1995). Mit wenigen Ausnahmen werden die meisten Proteine, die für ein inneres Kompartiment des Chloroplasten bestimmt sind, mit einem abspaltbarem Erkennungssignal synthetisiert. Erkennungssignale ähneln sich weder in Struktur noch in Länge (Cline *et al.*, 1985; von Heijne *et al.*, 1989). Zunächst binden die Vorstufenproteine im Cytosol an das Chaperon Hsp70, das sie in einem ungefalteten Zustand hält (Ruprecht *et al.*, 2010; Zang und Glaser, 2002). Anschließend können die Vorstufenproteine auf folgenden Wegen die äußere Hüllmembran von Chloroplasten erreichen: (I) direkt von Hsp70 zum Toc-Komplex (Translocon at the outer envelope of chloroplasts); (II) Phosphorylierung des Vorstufenproteins im Bereich des Erkennungssignals, wodurch eine Bindung mit einem 14-3-3 Dimer entsteht (Martin *et al.*, 2006; May und Soll, 2000; Waegemann und Soll, 1996); (III) Bindung an Hsp90 und mit Hilfe der Co-Chaperone HOP (Hsp70/Hsp90 organizing protein) und FKBP73 (FK506 binding protein) Zielsteuerung zu dem Rezeptorprotein der äußeren Hüllmembran Toc64 (Fellerer *et al.*, 2011; Qbadou *et al.*, 2007). An der äußeren Hüllmembran können die Vorstufenproteine von drei Rezeptoren des Toc-Komplexes erkannt werden (Abbildung 1). Toc34 erkennt nicht nur das Erkennungssignal, sondern auch das an 14-3-3 des Zielsteuerungskomplexes gebundene Vorstufenprotein über seine GTP-regulierte cytosolische Domäne (Schleiff *et al.*, 2002; Schleiff *et al.*, 2003). Toc34 ist über eine einzelne Transmembrandomäne in der äußeren Hüllmembran verankert (Hirsch *et al.*, 1994; Kessler *et al.*, 1994; Seedorf *et al.*,

1995) und befindet sich in enger physikalischer Nähe zu dem Importkanal der äußeren Hüllmembran Toc75 (Hirsch *et al.*, 1994; Kessler *et al.*, 1994; Seedorf *et al.*, 1995). Toc34 kann sowohl durch Phosphorylierung als auch durch GTP/GDP-Bindung und Hydrolyse reguliert werden: die Affinität zu phosphorylierten Vorstufenproteinen ist erhöht, zudem steigt die Anziehungskraft zu Vorstufenproteinen durch Bindung von GTP an Toc34. Gebundenes Vorstufenprotein wird durch die Hydrolyse von GTP weitergegeben. Das GDP kann entweder durch GTP ersetzt werden und Toc34 kann einen erneuten Zyklus durchlaufen, oder Toc34 wird phosphoryliert und somit deaktiviert, da es im phosphorylierten Zustand weder ein Vorstufenprotein erkennen, noch GTP binden kann. Die Dephosphorylierung und somit Aktivierung von Toc34 erfolgt über eine ATP-abhängige Phosphatase (Sveshnikova *et al.*, 2000). Toc34 bildet nach Bindung mit dem Vorstufenprotein mit Toc159 ein Heterodimer, wodurch das Vorstufenprotein von Toc34 zu Toc159 weiter gegeben wird. Toc159 ist ebenfalls ein GTP-abhängiges Rezeptorprotein der äußeren Hüllmembran. Zudem dient Toc159 als Antrieb zur Weitergabe und Translokation des Vorstufenproteins über Toc75. Die Bindung an das Vorstufenprotein führt zur Aktivierung der endogenen Toc159-GTPase Aktivität und zur Konformationsänderung der Proteine. Diese Aktivität verursacht die Bewegung der Proteinbindedomäne in Richtung des Translokationskanal (Schleiff und Soll, 2000). Die Rezeptorproteine Toc34 und Toc159, sowie das Kanalprotein Toc75 werden als „Toc-Core-Komplex“ bezeichnet. Toc64, ein weiteres Rezeptorprotein an der äußeren Hüllmembran, ist ein integrales Membranprotein, welches drei in das Cytosol ragende TPR-Domänen (Tetratricopeptid Repeat) besitzt (Sohrt und Soll, 2000). Die TPR-Domäne ist bekannt für Protein-Protein Interaktionen, besonders wenn es um Interaktionen mit molekularen Chaperonen wie Hsp70 (Heat shock protein) und Hsp90 geht (Frydman und Hohfeld, 1997; Lamb *et al.*, 1995). Die C-terminale TPR-Domäne von Toc64 erkennt das an Vorstufenprotein gebundene Hsp90, anschließend assoziiert es GTP-abhängig mit Toc34, woraufhin das Vorstufenprotein von Hsp90 entlassen wird und selbst von Toc34 erkannt werden kann. Nachdem das Vorstufenprotein an Toc34 abgegeben wurde, trennt sich Toc64 wieder vom Toc-Komplex (Qbadou *et al.*, 2006). Der N-Terminus von Toc64 ragt in den Intermembranraum des Chloroplasten. Dort wirkt es zusammen mit Hsp70 als Intermembranraum-Komplex, welcher für die direkte und effiziente Beförderung der Vorstufenproteine vom Toc-Komplex zum Tic-Komplex (Translocon at the inner envelope membrane) zuständig ist (Qbadou *et al.*, 2007). Wie bereits erwähnt

stellt Toc75 den Importkanal der äußeren Hüllmembran dar. Toc75 bildet einen Kationen-selektiven Kanal mit einer Porengröße von 14-26 Å (Hinnah *et al.*, 2002).

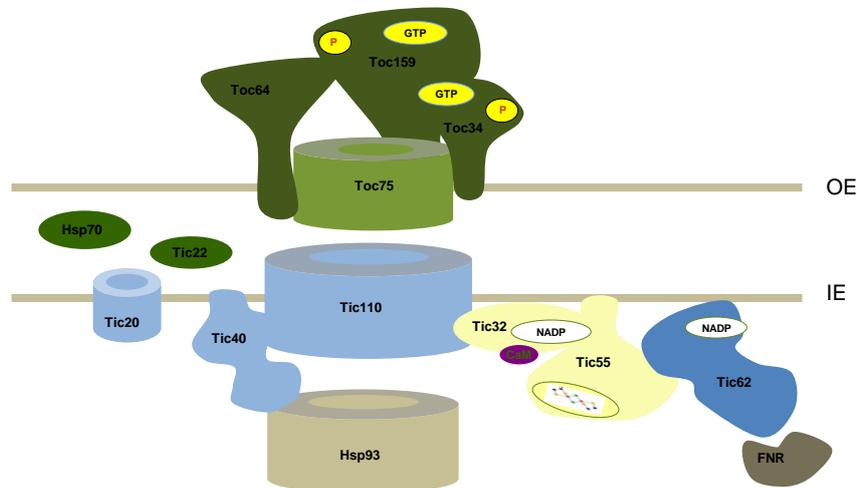


Abbildung 1: Model der Translokationsmaschinerie der Chloroplasten (Strittmatter *et al.*, 2010)

Der Translokationskomplex der äußeren Hüllmembran (Toc) besteht aus fünf Komponenten: Die Rezeptorproteine Toc34 und Toc159 bilden zusammen mit dem Kanalprotein Toc75 den sogenannten „Toc-core-Komplex“. Toc64 ist ebenfalls ein Rezeptorprotein, allerdings interagiert es auch im Intermembranraum zusammen mit Tic22 und Hsp70 als Intermembranraum-Komplex. Sieben Komponenten des Translokationskomplex der inneren Hüllmembran (Tic) wurden bislang identifiziert: Tic110 und Tic20 stellen mögliche Kanalproteine dar, während Tic32, Tic55 und Tic62 redox-regulatorische Komponenten sind. Tic40 bindet an stromale Chaperone.

Die Zusammensetzung und Stöchiometrie des Tic-Komplexes, sowie die Funktion der einzelnen Bestandteile sind bis heute nicht vollständig geklärt. In Landpflanzen sind sieben Untereinheiten des Tic-Komplexes bekannt (Abbildung 1). Tic20 und Tic110 gelten als mutmaßliche Bestandteile des Translokationskanals (Stengel *et al.*, 2007). Über die Funktion von Tic20 und Tic110 wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Beide Proteine erfüllen die Voraussetzungen zur Bildung eines Translokationskanals. Tic20 besitzt vier Transmembrandomänen, eine strukturelle Ähnlichkeit zu bakteriellen Aminosäuretransportern (Reumann *et al.*, 2005) und ebenso strukturelle Gemeinsamkeiten zu den Translokationskanälen der inneren Hüllmembran von Mitochondrien (Translocon at the Inner membrane of Mitochondria: TIM) Tim17 und Tim 23 (Rassow *et al.*, 1999). Allerdings fehlt jede Art von biochemischem Nachweis, dass es sich bei Tic20 um ein Kanalprotein handelt. Tic110 dagegen besitzt sechs Transmembrandomänen (Balsera *et al.*, 2009), wird in etwa den gleichen Mengen exprimiert wie Toc75 (Vojta *et al.*, 2004) und konnte in Assoziation mit Vorstufenproteinen und Chaperonen

gefunden werden (Lübeck *et al.*, 1996; Nielsen *et al.*, 1997). Zudem konnte eine Kanalaktivität *in vitro* nachgewiesen werden (Balsera *et al.*, 2009; Heins *et al.*, 2002). Drei Mitglieder des Tic-Komplexes, Tic32, Tic55 und Tic62, enthalten strukturelle Eigenschaften, die sie zu geeigneten redox-regulatorischen Komponenten des Importprozesses auf Höhe der inneren Hüllmembran machen (Stengel *et al.*, 2010). Tic32 ist ein Mitglied der „short-chain dehydrogenases/reductase“-Familie (SDR) und zeigt Dehydrogenase Aktivität in Abhängigkeit von NADPH (Chigri *et al.*, 2006). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es sich bei Tic32 um ein Calmodulin-bindendes Protein handelt, dessen Dehydrogenase-Aktivität von Calmodulin, und somit die redox-Regulierung durch Calcium-Signale beeinflusst werden kann (Chigri *et al.*, 2005; Chigri *et al.*, 2006). Tic55 enthält ein Rieske-Eisen-Sulfur-Cluster und eine mononukleare Eisen-Bindestelle (Caliebe *et al.*, 1997). Rieske-Eisen-Sulfur-Cluster sind oft in Elektronentransportketten beteiligt oder dienen als Sensor für oxidativen Stress (Ding *et al.*, 1996). Das CxxC-Motiv von Tic55 könnte mit Thioredoxinen interagieren, weshalb sie eine Rolle in der Dunkel/Hell-Regulierung der Proteintranslokation spielen könnten (Bartsch *et al.*, 2008). Der N-Terminus von Tic62 ist wie Tic32 ein Mitglied der SDR-Familie, da es eine aktive Dehydrogenase-Domäne besitzt. Dagegen enthält der C-Terminus von Tic62 eine Serin/Prolin-reiche Region, welches als Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase (FNR)-Bindemotiv dient (Balsera *et al.*, 2007; Küchler *et al.*, 2002; Stengel *et al.*, 2008). Der N-Terminus von Tic62 ist hoch konserviert in allen oxyphototrophen Organismen, während der C-Terminus nur in vaskulären Pflanzen gefunden wird (Balsera *et al.*, 2007). Deshalb scheint die Interaktion von Tic62 mit FNR evolutiv betrachtet eine relativ neue Eigenschaft zu sein. Tic22 ist ein Mitglied des Intermembranraum-Komplexes, wo es mit Toc64 und Hsp70 interagiert (Becker *et al.*, 2004a; Qbadou *et al.*, 2007). Tic40 bildet wahrscheinlich einen Komplex zusammen mit Tic110 und Hsp93/ClpC (Chou *et al.*, 2003; Inaba *et al.*, 2003; Kovacheva *et al.*, 2007). Der C-Terminus von Tic40 besitzt Ähnlichkeit zu den C-terminalen Sti1 Domänen des „Hsp70-interacting Protein (Hip) und Hsp70/Hsp90-organizing Protein (Hop)“ Co-Chaperons von Säugern. Im Stroma werden die zu importierenden Proteine vermutlich ATP-abhängig von dem stromalen Proteinen Hsp93/ClpC und Hsp70 durch die Membran gezogen (Keegstra und Cline, 1999). Hsp93/ClpC ist permanent an den Tic-Komplex assoziiert, während ein weiteres stromales Chaperon Cpn60 nur in Anwesenheit von Vorstufenproteinen mit dem Tic-Komplex interagiert (Nielsen *et al.*, 1997). Nach der Translokation wird das Erkennungssignal durch die Stromale Prozessierungspeptidase (SPP) entfernt (Richter und Lamppa,

1998). Anschließend kann das Protein in die innere Hüllmembran eingebaut werden, im Stroma bleiben oder den Weg zu den Thylakoiden fortsetzen.

2.1 Charakterisierung des Proteinimports in Chloroplasten

Durch den Toc- und der Tic-Komplex der Chloroplasten werden die meisten Proteine der inneren Hüllmembran, des Stromas und der Thylakoide über den sogenannten „generellen“-Importweg transportiert (Cline und Henry, 1996; Gutensohn *et al.*, 2006; Soll und Schleiff, 2004). Es existiert jedoch auch mindestens ein alternativer Importweg, da es einige Proteine gibt, die unabhängig von den Komponenten des „generellen“-Weges importiert werden können. Dazu gehören Tic32 (Nada und Soll, 2004) und das chloroplastidäre Homolog der Quinon-Oxidoreduktase (ceQORH) (Miras *et al.*, 2002; Miras *et al.*, 2007). Beide enthalten kein abspaltbares Erkennungssignal, werden jedoch in die innere Hüllmembran der Chloroplasten inseriert. Die Translokation von Vorstufenproteinen über die chloroplastidären Hüllmembranen ist ein Energie-abhängiger Prozess (Theg und Scott, 1993). Zur Bindung des Vorstufenproteins an den Plastiden wird nur eine geringe Menge an Energie benötigt ($< 50 \mu\text{M}$ NTP), während die Translokation über die Hüllmembranen höhere Energiemengen benötigt ($> 100 \mu\text{M}$) (Soll und Schleiff, 2004; Vothknecht und Soll, 2000).

2.1.1 In vitro Import in Chloroplasten aus *Physcomitrella patens*

Das Moos *Physcomitrella patens* (*P. patens*), wurde ursprünglich als Modellpflanze in der Entwicklungsbiologie genutzt (Cove *et al.*, 1997). *P. patens* eignet sich jedoch aufgrund folgender Eigenschaften auch für viele andere Studien (Reski und Cove, 2004): (I) eine geringe Anzahl an unterschiedlichen Zelltypen, einfache Gewebestrukturen und Morphologie, (II) kurze Reproduktionszeit, (III) dominanter haploider Gametophyt, (IV) asexuelle Vermehrung, (V) hoher Grad an homologer Rekombination, (VI) einfache *in vitro* Zellkulturhaltung, (VII) vollständige Genomsequenz erhältlich (Rensing *et al.*, 2008). Außerdem konnten fast alle Homologe der Toc- und Tic-Komponenten mittels Abgleich der *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*)-Sequenz mit dem *P. patens*-Genom gefunden werden (Kalanon und McFadden, 2008).

2.1.2 In vitro Import und Insertion in die innere Hüllmembran von Chloroplasten aus *Pisum sativum*

Für die Proteine der inneren Hüllmembran werden mehrere Importwege diskutiert. Beim „conservative-sorting“-Importweg in die innere Hüllmembran werden die Vorstufenproteine ins Stroma transportiert, wobei das Erkennungssignal von der Stromalen Prozessierungspeptidase entfernt wird. Anschließend werden die Proteine in die innere Hüllmembran re-exportiert. Es konnte gezeigt werden, dass Tic110 und Tic40 diesen Importweg nutzen (Lübeck *et al.*, 1997; Tripp *et al.*, 2007; Vojta *et al.*, 2007). Dabei dient das abspaltbare Erkennungssignal der Zielsteuerung in das Stroma, während die Information zur Zielsteuerung in die innere Hüllmembran im Fall von Tic110 im N-Terminus, im Fall von Tic40 in einer Serin/Prolin-reichen Domäne enthalten ist (Lübeck *et al.*, 1997; Tripp *et al.*, 2007). Es besteht jedoch mindestens noch ein alternativer Importweg zu dem „conservative sorting“-Weg in Chloroplasten. Dieser Weg wird von Vorstufenproteinen genutzt, welche auf Höhe der Translokationsmaschinerie der inneren Hüllmembran in die Membran inseriert werden. Dieser „stop-transfer“-Weg wurde für die Proteine Triose Phosphate/Phosphate Translocator (TPT) und Arc6 beschrieben (Flügge und Hinz, 1986; Tripp *et al.*, 2007). Bislang wurden nur zwei Proteine der inneren Hüllmembran beschrieben, die kein abspaltbares Erkennungssignal besitzen: Tic32 (Nada und Soll, 2004) und das chloroplastidäre Homolog der Quinon-Oxidoreduktase (ceQORH) (Miras *et al.*, 2002; Miras *et al.*, 2007).

2.1.3 Lokalisierung von DJ-1c in *Pisum sativum*

Das Parkinson disease 7 (PARK7) Protein, welches von dem PARK7-Gen kodiert wird und auch unter dem Namen DJ-1 bekannt ist, konnte als eine Ursache beim autosomal-rezessiven juvenilen Parkinson-Syndrom identifiziert werden (Bonifati *et al.* 2003, Goldberg *et al.* 2005). Der Locus PARK7 liegt auf dem Chromosom 1p36 (Bonifati *et al.* 2002, van Duijn *et al.* 2001). Dj-1 ist ein H₂O₂ sensitives Protein, und stellt somit ein Sensormolekül für oxidativen Stress dar (Mitsumoto und Nakagawa 2001). Diese Funktion spielt in der Pathogenese des DJ-1 assoziierten Parkinson-Syndroms wahrscheinlich die wesentliche Rolle (Blackinton *et al.* 2005, Yokota *et al.* 2003). Weiterhin hat DJ-1 eine Vielzahl an intrazellulären Bindungspartnern, die verschiedene Zellvorgänge regulieren (Blackinton *et al.* 2005, Yokota *et al.* 2003). Umstritten ist eine Kollokalisierung von DJ-1 mit Mitochondrien (Canet-Avilés *et al.*, 2004; Goerner, 2006; Zhang *et al.*, 2005). Drei Homologe des Proteins DJ-1 wurde in *Arabidopsis thaliana* identifiziert: DJ-1a

(At3g14990), DJ-1b (At1g53280) und DJ-1c (At4g34020). DJ-1a ist ein Sensor für oxidativen Stress in Pflanzen. Es konnte gezeigt werden, dass Pflanzen, in denen DJ-1a nicht vorhanden ist, kaum noch einen Abwehrmechanismus gegen Stress, wie zum Beispiel Starklicht, H₂O₂, Behandlung mit Paraquat und Kupfersulfat, aufbauen, was zum Zelltod führen kann. Zudem konnten die Superoxid Dismutase 1 (SOD1) und die Gluthatione Peroxidase 2 (GPX2) als Interaktionspartner identifiziert werden (Xu *et al.*, 2010). Über die Funktion von DJ-1b und DJ-1c in Pflanzen ist bislang nichts bekannt.

2.2 Struktur und Funktion von Tic110

Tic110 ist essentiell für den Proteinimport in Plastiden (Inaba *et al.*, 2005; Schnell *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1994). Es spielt eine wichtige Rolle in der Plastidbiogenese, da der knock-out des tic110 Genes in *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) embryonal ist (Inaba *et al.*, 2005). Nachdem in der Literatur über die Struktur und Funktion kontrovers diskutiert wurde, konnte Balsera *et al.* 2009 eine Studie veröffentlichen, die die verschiedenen Hypothesen vereint. Tic110 besitzt am N-Terminus zwei hydrophobe α -helikalen im C-Terminus vier amphipathische Transmembrandomänen (Balsera *et al.*, 2009). Daraus ergibt sich für Tic110 folgende dreigeteilte Struktur: (I) Teile von Tic110 ragen in den Intermembranraum, um dort einen Superkomplex zusammen mit Toc und dem Intermembranraum-Komplex zur Annahme von Importsubstraten zu bilden (Inaba *et al.*, 2003; Inaba *et al.*, 2005). (II) Ein anderer Teil von Tic110 liegt im Stroma der Chloroplasten, weshalb Tic110 in der Lage ist, dort mit Tic40 und dem Chaperon Hsp93 zu interagieren. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Tic110 am N-Terminus mit Tic32 interagiert (Hörmann *et al.*, 2004). Ebenfalls in den stromalen Regionen von Tic110 befinden sich sechs in vaskulären Pflanzen konservierte Cysteine, weshalb Tic110 über Thioredoxine reguliert werden könnte (Balsera *et al.*, 2009). (III) Die vier amphipatischen Helices von Tic110 bilden einen Kationen-selektiven Kanal mit einem Leitwert von 600 pS (Heins *et al.*, 2002). Der N-Terminus ist für die Bildung eines Kanals nicht notwendig, weshalb man davon ausgeht, dass der N-Terminus von Tic110 eine andere Funktion besitzt. Tic110 besitzt ein abspaltbares Erkennungssignal und wird über den „Conservative Sorting“-Importweg in die Chloroplasten importiert. Nachdem das Erkennungssignal im Stroma abgespalten wurde, wird Tic110 mittels eines Zielsteuerungssignals im maturen Protein reinseriert (Lübeck *et al.*, 1997). Zur Untersu-

chung welcher Teil von Tic110 für die Zielsteuerung in die innere Hüllmembran zuständig ist, wurde ein Hybrid aus dem N-Terminus von Tic110 (IEP110) und dem stromalen Protein SSU (small subunit of rubisco) erstellt (Abbildung 16) und anschließend Importexperimente in isolierte *P. sativum* Chloroplasten ausgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren (AS) 1-111 (110N1) zwar in der Lage sind in die innere Hüllmembran zu inserieren, während die AS 112-235 (110N2) dazu nicht in der Lage waren, jedoch wird die Effizienz der Insertion drastisch erhöht, wenn beide Regionen (110N: AS 1-235) als Importssubstrat verwendet werden. Die Autoren schließen daraus, dass die Effizienz der Reinsertion von der 110N2-Region abhängt (Lübeck *et al.*, 1997).

2.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Vor dem geschilderten Hintergrund sowie dem Kenntnisstand der Forschung sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit folgende Ziele erreicht werden:

(I) Zur Untersuchung der evolutiven Entwicklung des Toc- und Tic-Komplexes sollten verschiedene Vorstufenproteine in isolierte *P. patens* Chloroplasten importiert und anschließend die Kinetik des Imports, sowie die Abhängigkeit von Energie in Form von ATP analysiert werden.

(II) Eine systematische Charakterisierung des Importverhaltens verschiedener Proteine der inneren Chloroplastenhüllmembran sollte durchgeführt werden.

(III) Im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Møller, Universität Stavanger, sollte die intrazelluläre Lokalisation von DJ-1c untersucht werden.

(IV) Es sollte analysiert werden, welcher Teil des N-Terminus von Tic110 für die Verankerung von Tic110 in die Membran verantwortlich ist.

(V) Die Bedeutung von Tic110 als möglicher Importkanal der inneren Hüllmembran sollte im Hinblick auf die Bindung und Translokation von Vorstufenproteinen untersucht werden.

3 Material

3.1 Chemikalien

Chemikalien wurden von Applichem (Darmstadt, Deutschland), Fluka (Buchs, Schweiz), Biomol (Hamburg, Deutschland), Difco (Detroit, USA), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), GibcoBLR (Paisly, UK), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Roche (Penzberg, Deutschland) und Serva (Heidelberg, Deutschland) bezogen. Radioaktiv markierte Aminosäuren ($[^{35}\text{S}]\text{Met}$) mit der Aktivität von 1000 Ci/mM wurden von GE Healthcare (München, Deutschland) erworben. Die in dieser Arbeit benutzten Detergenzien Natrium-Dodecyl Sulfat (SDS), *n*-Dodecyl- β -D-Maltosid (DDM) und Triton X100 (TX100) wurden von Roth bezogen.

3.2 Enzyme

Enzyme wurden von folgenden Herstellern erworben: Restriktionsenzyme von MBI Fermentas (St.Leon-Rot, Deutschland), New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland), T4-Ligase von Eppendorf (Hamburg, Deutschland) und MBI Fermentas, Taq-Polymerasen von Diagonal (Münster, Deutschland), Eppendorf, MBI Fermentas, Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich), Finnzymes (Espoo, Finnland), Reverse Transkriptase von Promega (Madison, USA), RNase freie DNase I von Roche (Penzberg, Deutschland), RNase von GE Healthcare (München, Deutschland). Die Proteasen Thermolysin und Trypsin wurden von Merck und Sigma-Aldrich bezogen. Driselase zur Isolation von *Physcomitrella patens* (*P. patens*) Protoplasten wurde bei Karlan (Arizona, USA) bestellt.

3.3 Stämme, Vektoren und Oligonukleotide

Die Klonierungen wurden in dem *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stamm Top10 (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Für die Überexpression von Proteinen wurde der BL21 (DE3)-Stamm (Novagen/Merck, Darmstadt, Deutschland) benutzt. Die folgenden Vektoren wurden für die Klonierungen verwendet: pCR2.1 (Invitrogen), pET21d

(Novagen/Merck), pSP64 und pSP65 (beide von Promega). Oligonukleotide wurden von Qiagen/Operon (Köln, Deutschland) oder von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) synthetisiert.

Tabelle 1: Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz
Lüb._Sac1_fwd	GATCGAGCTCATGGCTTCCTTAGTTCCTTC
Lüb._rvs	GTGGTGCTCGAGTTACATCATCATCATC
Lüb._FWF_mitte_fwd	ATCATCTTTACTTCTACCTATTAAGCGTGTCTTAAAGGTC
Lüb._FWF_mitte_rvs	GACCTTTAAGACACGCTTAATAGGTAGAAGTAAAGATGAT
Lüb.GSG_mitte_fwd	ATCATCTGGACTTCTACCTTCAAAGCGTGTGCGAAAGGTC
Lüb.GSG_mitte_rvs	GACCTTTCCGACACGCTTTGAAGGTAGAAGTCCAGATGAT
Lüb._pET21d_Fwd	GATCCCATGGCCTCCGACACTAAC
Lüb._pET21d_Rvs	GATCCTCGAGGTAACAATCACTAAGC
M1_Fwd	GATCGAATTCATGGCACCGCAAGTTG
M1_RVS_NEU	GATCGGATCCCTAGAATAACAACTTCTCTTCCTCG
Fwd (LIL):	GTATTTGGAGATGCATCATCTTTACTTCTACCTATTAAGCGTGTCTTAAAGGTC ATGC
Fwd (GSG):	GTATTTGGAGATGCATCATCTGGACTTCTACCTTCAAAGCGTGTGCGAAAGGT CATGC
Rvs:	AGATGATGCATCTCCAAATACAATATTTGAC
ARA LIL Fwd:	GTGTTTGGAGATGCTTCATCCTTACTTCTACCTATTAAGCGAGTATTGAAGGTC ACAG
ARA GSG Fwd:	GTGTTTGGAGATGCTTCATCCGGACTTCTACCTTCAAAGCGAGTAGGAAAGGT CACAG
ARA Rvs_LIL:	GGATGAAGCATCTCCAAACACAAGAGCTGA

3.4 Molekulargewichts- und Größenstandards

Als Molekulargewichtsstandard für SDS-PAGE diente ein „Low Molecular Weight Marker“ bestehend aus α -Lactalbumin (14 kDa), Trypsin-Inhibitor (20 kDa), Trypsinogen (24 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Glyceraldehyd-3-Dehydrogenase (36 kDa), Ovalbumin (45 kDa) und Rinderserumalbumin (66 kDa) von Sigma-Aldrich (Laemmli, 1970). Zur Ergänzung wurde in einigen Fällen ein „High Molecular Weight Marker“ verwendet. Dieser enthält zusätzlich noch Kaninchenphosphorylase B (97 kDa). Für die Agarose-Gelelektrophorese wurde mit PstI geschnittene DNA des Phagen λ (MBI Fermentas) als Größenstandard verwendet.

3.5 Antikörper

Die verwendeten Antikörper wurden gegen heterolog exprimierte Proteine in Kaninchen erzeugt und von der Arbeitsgruppe von Prof. Jürgen Soll zur Verfügung gestellt.

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Allgemeine Molekularbiologische Methoden

Die Anzucht von Bakterienkulturen, die Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA sowie deren Präzipitation mit Ethanol oder Isopropanol wurden nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Die Herstellung kompetenter *E. coli* erfolgte nach Hanahan et al. (1985).

4.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

DNA-Fragmente zur Klonierung in Plasmid-Vektoren wurden mittels Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) generiert (Saiki *et al.*, 1988). Die PCR-Ansätze wurden mit 100 ng DNA Template, jeweils 200 µM dNTPs, 200 nM der Oligonukleotide, sowie 1-2 U der jeweiligen DNA-Polymerase und ihrem dazugehörigen Puffer durchgeführt. Es wurden folgende DNA-Polymerasen verwendet: BioTherm Taq-Polymerase (Diagonal) zur PCR-Genotypisierung und Triple Master Taq-Polymerase (Eppendorf), Pfu-Polymerase (MBI Fermentas) bzw. Phusion™-Polymerase (Finnzymes) zur Subklonierung von PCR-Fragmenten. Die Temperatur wurde der Annealing-Temperatur der Oligonukleotide angepasst. Vor der Ligation mit dem jeweiligen Insert wurden die Vektoren mittels Alkalischer Phosphatase vom Kalbdarm nach Herstellerangaben dephosphoryliert (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

4.1.3 Klonierungsstrategien

Der Restriktionsverdau von Plasmid-DNA, die Ligation von DNA, die Dephosphorylierung von DNA sowie die DNA-Gelelektrophorese erfolgten nach Standardmethoden (Sambrook *et al.*, 1989) sowie den Angaben der Enzymhersteller. Die Extraktion von PCR-Produkten aus Agarose-Gelen erfolgte mit dem Gel-Extraktion Kit QIAEX® II von Qiagen (Hilden, Deutschland).

4.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Plasmid-DNA aus transformierten *E.coli* Zellen wurde durch alkalische Lyse mit SDS und NaOH aus 3-5 ml Übernachtskulturen in Anlehnung an das Protokoll von Zhou et al. (1990) isoliert. Zur Isolierung größerer Mengen hochreiner Plasmid-DNA wurden die

„Nucleobond® AX“ Plasmid Purification Midi („AX100“) und Maxi („AX500“) Kits von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet.

4.1.5 Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ermittelt. Dafür wurde die Absorption einer verdünnten Probe bei 260 nm und 320 nm gemessen. Anschließend wurde die Konzentration in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ nach folgenden Formeln berechnet:

$$\text{RNA: } c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = (E_{260} - E_{320}) \times 0,04 \times f_{\text{verd}}$$

$$\text{DNA: } c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = (E_{260} - E_{320}) \times 0,05 \times f_{\text{verd}}$$

E bezeichnet die Absorption der Probe bei der angegebenen Wellenlänge, f_{verd} den Verdünnungsfaktor der Probe. Zusätzlich wurde die Absorption bei 280 nm gemessen, um eine eventuelle Verunreinigung mit Proteinen festzustellen.

4.1.6 Sequenzierung

Alle klonierten Konstrukte wurden zur Überprüfung sequenziert. Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde vom Sequenzierservice des Departments Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

4.1.7 Heterologe Proteinüberexpressionen in *E. coli*

Der Translationsklon tpSSU-110N-mSSU (Lübeck *et al.*, 1996), sowie tpSSU-110N/LIL-mSSU und tpSSU-110n/GSG-mSSU wurden mit den Oligonukleotiden Lüb._pET21d_Fwd, sowie Lüb._pET21d_Rvs vom pSP65-Vektor in den pET21d-Vektor umkloniert. Die Überexpression erfolgte im BL21 (DE3) Stamm für 3 h bei 37 °C, induziert wurde bei OD 0,5 mit 1 mM IPTG.

psTic110ΔN (Aminosäure 96-959 der *Pisum sativum* Sequenz) (Balsera *et al.*, 2009) wurde in den *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) transformiert bei 12 °C über Nacht überexprimiert, nachdem die Zellen bei 27 °C bis OD 0,5 gewachsen und anschließen mit 1 mM IPTG induziert wurden.

4.1.8 In vitro Transkription und Translation

Vor der *in vitro* Transkription wurden 2 µg Plasmid-DNA mit dem entsprechenden Restriktionsenzym (siehe Tabelle 2) für 60 min bei 37 °C linearisiert.

Tabelle 2: Translationsklone und die genutzten Restriktionsenzyme

Translationsklon	pSSU	HP28	HP36	IEP37	Vipp1	DJ-1c
Vektor	pSP64	pSP65	pSP65	pSP65	pSP65	pSP65
Restriktionsenzym	EcoR1	Sal1	Sal1	Sal1	BamH1	Sac1

Translationsklon	tpSSU-110N-mSSU	tpSSU-110N/LIL-mSSU	tpSSU-110N/GSG-mSSU	psTic110 ΔN	psTic110 ΔN /LIL	psTic110 ΔN /GSG
Vektor	pSP65	pSP65	pSP65	pSP65	pSP65	pSP65
Restriktionsenzym	Xho1	Xho1	Xho1	BamH1	BamH1	BamH1

Die linearisierte DNA wurde mit Phenol/Chloroform, pH 8 extrahiert, mit Isopropanol präzipitiert und in 20 µl RNase-freiem H₂O resuspendiert. *In vitro* Transkription der linearisierten DNA wurde in einem Reaktionsvolumen von 50 µl ausgeführt. Für die Reaktion wurde Transkriptionspuffer (MBI Fermentas), 10 mM DTT, 40 U/µl RNase Inhibitor, 0.05 % (w/v) BSA, 0.5 mM ATP, CTP und UTP, 0.375 mM m⁷-Guanosin (5') ppp (5') Guanosine (Cap), 20 U/µl SP6 oder T7 RNA-Polymerase und 1 µg linearisierte Plasmid-DNA benötigt. Der Reaktionsansatz wurde zunächst für 20 min bei 37 °C inkubiert, anschließend wurden 1,2 mM GTP zugegeben, und der Reaktionsansatz wurde für weitere 2 h bei 37 °C inkubiert. Die mRNA wurde entweder direkt zur *in vitro* Translation eingesetzt oder in flüssigem N₂ eingefroren und bei -80 °C gelagert. Die *in vitro* Translation wurde mit dem „Wheat Germ System“ oder dem „Flexi Rabbit Reticulocyte Lysate System“ von Promega nach Herstellerangaben durchgeführt. Die optimale Konzentrationen an KOAc (1-100 mM), bzw. MgCl₂ und DTT sowie an mRNA wurden durch Test-Translationsansätze ermittelt. Die radioaktive Markierung erfolgte durch die Zugabe von 150 µCi eines [³⁵S]-markierten Methionin/Cystein-Gemischs (GE Healthcare). Der Reaktionsansatz wurde nach der Translation für 20 min bei 50.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Proteinimportversuche verwendet.

4.2 Zellbiologische Methoden

4.2.1 Isolierung intakter Chloroplasten aus *Pisum sativum*

Zur Isolierung intakter Chloroplasten (Schindler und Soll, 1986) wurden Blätter von 9-11 Tage alten *Pisum sativum*-Keimlingen verwendet. Die folgenden Arbeitsschritte wurden bei 4 °C ausgeführt. Etwa 200 g Blätter wurden in 300 ml Isolierungsmedium in einem Küchenmixer zerkleinert und durch 4 Lagen Mull und eine Lage Gaze (Porengröße: 30 µm) filtriert. Anschließend wurde für 1 min bei 1.500 g zentrifugiert. Das Präzipitat wurde vorsichtig in 1 ml Waschmedium 1 resuspendiert, dann auf einen Stufen-Gradienten mit 40 % und 80 % Percoll gegeben und für 5 min bei 3.000 g in einem Ausschwing-Rotor zentrifugiert. Die intakten Chloroplasten wurden zweimal mit Waschmedium 1 gewaschen und in etwa 0,5-1 ml Waschmedium 1 aufgenommen. Zur Bestimmung des Chlorophyllgehalts wurden 5 µl Chloroplasten in 5 ml 80 % Aceton gelöst. Anschließend wurde die optische Dichte bei 645 nm, 663 nm und 750 nm gemessen. Die Chlorophyllkonzentration wurde nach der folgenden Formel berechnet (Arnon, 1949):

$$\text{Chlorophyll } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = (A_{663} - A_{750}) \times 8,02 + (A_{645} - A_{750}) \times 20,2$$

Verwendete Puffer:

Isolierungsmedium	330 mM	Sorbitol
	20 mM	Mops
	13 mM	Tris
	3 mM	MgCl ₂
	0,1 %	BSA (w/v)
Waschmedium 1	330 mM	Sorbitol
	50 mM	Hepes/KOH pH 7,6
	3 mM	MgCl ₂
40 % Percoll	40 %	Percoll
	330 mM	Sorbitol
	50 mM	Hepes/KOH pH 7,6

80 % Percoll	80 %	Percoll
	330 mM	Sorbitol
	50 mM	Hepes/KOH pH 7,6

4.2.2 Isolierung intakter Protoplasten und Chloroplasten aus *Physcomitrella patens*

Zur Gewinnung von Protoplasten wurden zunächst 2 g Driselase in 50 ml 8 % Mannitol durch kräftiges Schütteln gelöst. Die Lösung wurde für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert und anschließend für 10 min bei 2.300 g zentrifugiert. Je 8 ml des Überstands und 8 ml 8 % Mannitol wurden zu 1 l 10 Tage altem filtriertem (100 µm Sieb) Moosmaterial gegeben und wurde eine weitere Stunde bei RT im Dunkeln inkubiert bevor es durch 100 µm und 50 µm Siebe filtriert wurde. Das Filtrat wurde für 7 min bei 100 g und 4 °C zentrifugiert. Das Präzipitat wurde vorsichtig zweimal in 10 ml 8 % Mannitol resuspendiert und zweimal durch Zentrifugation für 7 min bei 100 g und 4 °C gewaschen. Die isolierten Protoplasten wurden in 3-4 ml Isolierungsmedium (siehe 4.2.1) aufgenommen und anschließend durch eine Lage Gaze (Porengröße: 30 µm) filtriert. Das anschließende Verfahren zur Isolation von Chloroplasten aus *Physcomitrella patens* wurde wie in 4.2.1 beschrieben ausgeführt.

4.2.3 Behandlung der Chloroplasten und des Translationsprodukts vor dem Import

4.2.3.1 Entfernung von ATP

Vor Isolation der Chloroplasten wurden die Erbsen über Nacht im Dunkeln gelassen. Nach der Isolation wurden die Chloroplasten 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert, damit das während der Isolation durch Photosynthese entstandene ATP vollständig verbraucht wurde und somit sichergestellt ist, dass nur kontrolliert hinzugefügte Mengen an ATP für die Importreaktion verantwortlich sind. Um das im Translationsprodukt enthaltene ATP zu entfernen wurde eine Micro Bio-Spin Chromatographie-Säule (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) nach Herstellerangaben verwendet.

4.2.3.2 Protease-Vorbehandlung der isolierten Chloroplasten

Um Rezeptoren an der äußeren Hüllmembran der Chloroplasten zu entfernen wurde vor dem Import eine Proteasebehandlung der Chloroplasten vorgenommen. Dazu wurden Chloroplasten entsprechend einer Chlorophyllmenge von 1 mg mit 1 mg Thermolysin in Waschmedium 2 für 30 min auf Eis inkubiert. Die Proteasereaktion wurde mit 5 mM EDTA gestoppt. Intakte Chloroplasten wurden mittels eines Stufen-Gradienten

(40 % und 80 % Percoll, mit 5 mM EDTA) reisoliert und zweimal mit Waschmedium 3 gewaschen.

Verwendete Puffer:

Waschmedium 2	330 mM	Sorbitol
	50 mM	Hepes/KOH pH 7,6
	3 mM	MgCl ₂
	0,5 mM	CaCl ₂

Waschmedium 3	330 mM	Sorbitol
	50 mM	Hepes/KOH pH 7,6
	5 mM	EDTA

4.2.4 In vitro Import in isolierte Chloroplasten und Nachbehandlung der Chloroplasten

4.2.4.1 Import von radioaktiv markierten Proteinen in intakte Chloroplasten

Frisch isolierte Chloroplasten (Menge entspricht 15 µg Chlorophyll in *Pisum sativum*, und 20 µg Chlorophyll in *Physcomitrella patens*) wurden zusammen mit [³⁵S]Met-markiertem Vorstufenprotein (Translationsprodukt; zwischen 2-6 µl) in Importpuffer in einem Reaktionsvolumen von 100 µl für 0-30 min bei 25 °C inkubiert (Waegemann und Soll, 1995). Die Chloroplasten wurden über ein 40 %-iges Percoll-Kissen reisoliert, zweimal mit Waschmedium 1 gewaschen und die enthaltenen Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Gele wurden anschließend mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt, entfärbt, getrocknet und dann zur Detektion der aufgenommenen radioaktiv markierten Proteine über Nacht auf einen Röntgenfilm gelegt.

Verwendete Puffer:

Importpuffer	330 mM	Sorbitol
	50 mM	Hepes/KOH pH 7,6
	3 mM	MgSO ₄
	10 mM	Methionin
	10 mM	Cystein
	20 mM	Kalium-Glukonat
	10 mM	NaHCO ₃ ,

2 %	BSA (w/v)
0-3 mM	ATP

4.2.4.2 Protease-Nachbehandlung mit Thermolysin

Indem die Chloroplasten nach dem Import mit Thermolysin nachbehandelt wurden, kann die Effizienz des Proteinimports durch die äußere Hüllmembran kontrolliert werden. Nach dem Import wurden die Chloroplasten für 1 min bei 1.500 g und 4 °C präzipitiert, in 100 µl Waschmedium 2 resuspendiert, 0,5 mg Thermolysin wurde pro 1 mg Chlorophyll zugegeben und der Reaktionsmix wurde für 20 min auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 5 mM EDTA gestoppt. Anschließend wurden die Chloroplasten zweimal in Waschmedium 3 gewaschen.

4.2.4.3 Protease-Nachbehandlung mit Trypsin

Unter kontrollierten Bedingungen ist es möglich die Proteine der äußeren Hüllmembran proteolytisch abzubauen, während die Proteine der inneren Hüllmembran unbeschädigt bleiben. Hierfür wurden die Chloroplasten nach dem Import über ein 40 %-iges Percoll-Kissen reisoliert, in Waschmedium 2 aufgenommen und 0,5-1,5 µg Trypsin pro 1 µg Chlorophyll zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 1 h auf Eis inkubiert und anschließend mit 0,5-1,5 µg Trypsin-Inhibitor, 2,5-7,5 µg Makroglobulin und 1 mM PMSF abgestoppt. Die Chloroplasten wurden über ein 40 %-iges Percoll-Kissen reisoliert, die Chlorophyllkonzentration bestimmt (siehe 4.2.1), eine äquivalente Menge in Solubilisierungspuffer aufgenommen (siehe 4.3.6) und mittels einer SDS-PAGE analysiert.

4.2.4.4 ATP-Konzentrationsreihe

Um den Bedarf an ATP beim Import von Proteinen in den Chloroplasten zu bestimmen wurde zunächst das ATP aus den isolierten Chloroplasten und des Translationsprodukts (siehe 4.2.3.1) entfernt und der Import unter verschiedenen ATP-Konzentrationen (10-3000 µM) durchgeführt. Die Arbeitsschritte erfolgten im Dunkeln, um die Produktion von ATP durch Photosynthese zu vermeiden.

4.2.4.5 Pulse-Chase-Versuch

Das Translationsprodukt wurde zunächst 3 min auf Eis mit isolierten Chloroplasten, entsprechend 15 mg Chlorophyll, in Importpuffer (siehe 4.2.4.1) ohne ATP inkubiert. Unter diesen Bedingungen wurden die Vorstufenproteine an die Oberfläche der Chloroplasten

gebunden, ohne jedoch importiert zu werden (pulse). Die Chloroplasten wurden anschließend 1 min bei 1.500 g pelletiert, einmal in Importpuffer gewaschen, nochmals pelletiert, und dann in Importpuffer mit 3 mM ATP aufgenommen (chase). Die Importreaktion wurde für 0-30 min bei 25 °C durchgeführt und durch die Zugabe von Solubilisierungspuffer gestoppt (siehe 4.3.6). Anschließend wurden die Proben mittels SDS-PAGE analysiert. Die Arbeitsschritte wurden im Dunkeln durchgeführt, um die Produktion von ATP durch Photosynthese zu vermeiden.

4.2.5 Lokalisierung des importierten Proteine innerhalb der Chloroplasten

4.2.5.1 Fraktionierung der Chloroplasten

Um zwischen Membranproteinen und löslichen Proteinen zu differenzieren wurden die Chloroplasten nach dem Import in 10 mM Hepes/KOH pH 7,6 für 20 min auf Eis lysiert. Durch die darauf folgende Zentrifugation für 10 min bei 256.000 g und 4 °C wurden die Membranen im Präzipitat von den löslichen Kompartimenten der Chloroplasten im Überstand getrennt. Die Analyse wurde mittels SDS-PAGE durchgeführt.

4.2.5.2 Extraktion von Membranproteinen

Zur Überprüfung, ob es sich bei den Membranproteinen um integrale Membranproteine handelt, oder ob sie nur aufgrund hydrophober Wechselwirkungen nach der Fraktionierung im Präzipitat zu finden sind, wurde eine Extraktion mittels Harnstoff durchgeführt. Nach dem Import wurden die Chloroplasten, wie in 4.2.5.1 beschrieben, in lösliche und Membranproteine getrennt. Die Membranproteine wurden anschließend für 10 min mit 6 M Harnstoff in 10 mM Hepes/KOH pH 7,6 bei RT behandelt. Die Proben wurden anschließend 10 min bei 256.000 g zentrifugiert und der Überstand und das Präzipitat mittels SDS-PAGE analysiert.

4.2.6 Stromale Prozessierungsreaktion

Intakte Chloroplasten wurden, wie in 4.2.1 beschrieben, isoliert. Chloroplasten entsprechend 800 µg Chlorophyll wurden für 1 min bei 1.600 g und 4 °C pelletiert und mit 1 ml 5 mM eiskaltem Hepes/KOH pH 8 für 15 min auf Eis lysiert. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 16.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, der die stromale Prozessierungspeptidase enthält, wurde direkt eingesetzt. Der Reaktionsmix enthält 15 µl des Überstands, 20 mM Hepes/KOH pH 8 und 1 µl des Translationsprodukts (pSSU) und wurde für 15 min bei 26 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe

von Solubilisierungspuffer (siehe 4.3.6) gestoppt und anschließend mittels SDS-PAGE analysiert.

4.2.7 Isolierung intakter Mitochondrien aus *Pisum sativum*

Zur Isolierung intakter Mitochondrien wurden 9-11 Tage alte *Pisum sativum*-Keimlinge verwendet. Die folgenden Arbeitsschritte wurden bei 4 °C ausgeführt. Die Blätter wurden in 300 ml Isolierungspuffer in einem vorgekühlten Mörser zerkleinert. Nachdem die Blätter dreimal gemahlen und anschließend durch eine Lage Gaze (Porengröße: 30 µm) filtriert wurden, wurde das Homogenisat für 5 min bei 2.450 g zentrifugiert und der Überstand anschließend für 20 min bei 17.400 g zentrifugiert. Daraufhin wurde das Präzipitat mit Waschpuffer gewaschen und für 5 min bei 2.450 g zentrifugiert. Der Überstand wurde für 20 min bei 17.400 g ein weiteres Mal zentrifugiert. Das daraus resultierende Präzipitat wurde in 5-10 ml Waschpuffer aufgenommen und auf einen linearen 0-4,4 % PVP-Gradienten gegeben, welcher für 40 min bei 35.000 g und 4 °C in einem Ausschwing-Rotor ohne Bremse zentrifugiert wurde. Die Mitochondrien-Fraktion wurde in Waschpuffer aufgenommen und zweimal für 15 min bei 27.200 g und 4 °C gewaschen. Zum Schluss wurden die Mitochondrien in Waschpuffer aufgenommen.

Verwendete Puffer:

Isolierungspuffer pH 7,5	0,3 M	Sucrose
	25 mM	Tetra-Natrium Pyrophosphat
	2 mM	EDTA
	10 mM	KH ₂ PO ₄
	1 %	PVP-40
	1 %	BSA
	20 mM	Ascorbinsäure
Waschpuffer pH 7,5	0,3 M	Sucrose
	10 mM	TES
	0,2 %	BSA (w/v)

4.2.8 In vitro Import in isolierte Mitochondrien

Nach der Isolierung von Mitochondrien wurde die Proteinmenge nach Bradford bestimmt. Die Importreaktion erfolgte nach Whelan et. al. (1990; 1996). Frisch isolierte

Mitochondrien (entsprechend 100 µg Protein) wurden dafür in Importpuffer aufgenommen und mit 2,5 bis 5 µl Translationsprodukt versetzt. Die Importreaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 100 µl für 20 min bei 25 °C durchgeführt. Anschließend wurde der Importmix auf ein 20 % (w/v) Sucrose-Kissen geschichtet. Die Mitochondrien wurden mittels Zentrifugation für 5 min bei 14.000 g und 4 °C reisoliert und hinterher mit 1 ml Waschpuffer gewaschen und in 30 µl Solubilisierungspuffer (siehe 4.3.6) aufgenommen und mittels SDS-PAGE analysiert.

Verwendete Puffer:

Importpuffer pH 7,5	1 mM	Methionin
	0,75 mM	ATP
	50 mM	Succinat
	50 mM	DTT
	1 mM	MgCl ₂
	0,3 M	Sucrose
	50 mM	KCl
	10 mM	MOPS

4.2.9 In vitro dualer Import in isolierte *Pisum sativum* Mitochondrien und Chloroplasten

Für einen dualen Import in Mitochondrien und Chloroplasten wurden die Mitochondrien und Chloroplasten zunächst separat voneinander isoliert (siehe 4.2.1 und 4.2.7). Anschließend wurden sie zusammen in einem Importpuffer, der den Import in beide Organellen unterstützt, für 20 min und 25 °C unter leichtem Rütteln inkubiert. Die Proben wurden anschließend auf Eis in zwei Reaktionsgefäße verteilt. Ein Teil wurde mit 1 µl Thermolysin (1mg/ml) und 0,1 mM CaCl₂ für 30 min auf Eis nachbehandelt, durch die Zugabe von 10 mM EDTA gestoppt, und anschließend auf 300 µl eines 40 %-igen Percoll-Kissens in einem 400 µl verlängerten Mikrozentrifugenröhrchen gegeben und für 30 sec bei 4.500 g und 4 °C zentrifugiert. Die Chloroplasten-Fraktion (Präzipitat) und die Mitochondrien-Fraktion (löslicher Überstand) wurden reisoliert und in 1 ml Waschmedium gewaschen. Die Chloroplasten wurden anschließend für 2 min bei 800 g und 4 °C, die Mitochondrien für 10 min bei 14.000 g und 4 °C zentrifugiert und anschließend mittels SDS-PAGE analysiert.

Verwendete Puffer:

Importpuffer	0,3 M	Sucrose
	15 mM	Hepes/KOH pH 7,4
	5 mM	KH ₂ PO ₄
	0,5 %	BSA
	4 mM	MgCl ₂
	4 mM	Methionin
	4 mM	ATP
	1 mM	GTP
	0,2 mM	ADP
	5 mM	Succinat
	4,5 mM	DTT
	10 mM	Natriumacetat
	10 mM	NaHCO ₃
	Waschpuffer	0,3 M
15 mM		Hepes/KOH pH 7,4
5 mM		KH ₂ PO ₄
0,5 %		BSA

4.3 Biochemische Methoden

4.3.1 Überexpression und Aufreinigung psTic110ΔN

psTic110ΔN (Aminosäuren 96-959 der *Pisum sativum* Sequenz) wurde in *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) transformiert (Balseira *et al.*, 2009). Die Vorkultur (30 ml LB-Medium mit 100 µg/µl Ampicilin) bei 37 °C angezogen und dann in 1 l Hauptkultur überimpft, bei 27 °C bis zu einer OD von 0,5 wachsen gelassen und mit 1 mM IPTG induziert. Die Proteinüberexpression erfolgte über Nacht bei 12 °C. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation für 20 min bei 4.000 g und 4 °C geerntet und in 30 ml Aufschlusspuffer (3 ml Glycerin, 300 µl PMSF, 8,4 µl β-Mercaptoethanol (β-ME), einer Tablette EDTA-freie Proteaseinhibitortablette (Roche), 20 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl) aufgenommen. Der Zellaufschluß fand mittels Tissue Lyser Microfluidics und 6x2 sec Ultraschall statt. Daraufhin wurde für 30 min bei 18.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf 15 mM

Imidazol gebracht, steril filtriert und an eine His-Trap HP-Säule (GE Healthcare), welche mit 20 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl äquilibriert worden ist, gebunden. Das Protein wurde mit 100 mM Imidazol von der Säule eluiert, aufkonzentriert und auf eine Superdex200-Säule (Size exclusion chromatographie, GE Healthcare), equilibriert mit 20 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, gegeben. Die Proteinmenge wurde anschließend mit Bradford-Messung bestimmt. Die Reinheit des Proteins wurde mittels einer SDS-PAGE überprüft.

Verwendete Puffer:

LB-Medium	0,17 M	NaCl
	5 g	Pepton
	2,5 g	Hefeextrakt

4.3.2 Herstellung von Liposomen und Proteoliposomen

20 mg Phosphocholine wurden mit 1 ml Chloroform:Methanol im Verhältnis 1:1 gewaschen und mittels N₂-Begasung im Vakuum getrocknet. Die getrockneten Lipide wurden im jeweils angegebenen Puffer (siehe Ergebnisteil) aufgenommen und je nach Versuchsaufbau 5x in flüssigem N₂ eingefroren und aufgetaut. Durch die Verwendung eines Liposofasts (Porengröße 2 µm) wurden die Lipide auf einfache Vesikel gleicher Größe gebracht. Anschließend wurden jeweils 25 µg aufgereinigtes Protein zu 100 µl Liposomen gegeben für 15 min bei 4 °C inkubiert, wodurch das Protein in die Liposomen rekonstituiert wurde.

4.3.3 Anbindung an Liposomen

2 µl [³⁵S]Met-markiertes Vorstufenprotein wurden zusammen mit 3 mM ATP, 3 mM MgCl₂, 100 µl Proteoliposomen in 20 mM Tris pH 8 und 150 mM NaCl für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz bei 100.000 g für 1 h bei 4 °C zentrifugiert. Das Präzipitat, welches an die Proteoliposomen gebundenes Translationsprodukt enthält, wurde anschließend nacheinander mit 20 mM Tris pH 8 und 150 mM NaCl, 1 M Mops pH 8, 10 mM Na₂CO₃ pH 11 oder 6 M Urea pH 8 gewaschen, auf einen Sucrose-Gradient (siehe 4.3.5) geladen und mit TCA gefällt. Die Lokalisierung des Proteins und des Translationsprodukts wurde mittels SDS-PAGE überprüft.

4.3.4 Transport in Proteoliposomen

Isoliertes Stroma wurde in 100 µl Liposomen (20 mg/ml) in 20 mM Hepes pH 8 unter Verwendung des Liposofasts inseriert und anschließend bei 100.000 g für 1 h bei 4 °C zentrifugiert, um nicht eingeschlossenes Stoma zu entfernen. Zur Erzeugung von Proteoliposomen wurde das Präzipitat in 20 mM Hepes pH 8 gelöst, 25 µg gereinigtes M1 hinzugegeben und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 µl [³⁵S]Met-markiertes Vorstufenprotein und Inkubation für 15 min bei 26 °C. Die Versuchsansätze wurden ohne oder mit 2 µl Thermolysin (1 mg/ml) und 0,5 mM CaCl₂ für 2 min bei RT behandelt und durch Zugabe von 1 mM EDTA gestoppt. Die Reaktion wurde zur Analyse bei 100.000 g für 1 h bei 4 °C zentrifugiert und anschließend wurden Präzipitat und Überstand mit Methanol-Chloroform gefällt. Die Lokalisation des Proteins und des Translationsprodukts wurde mittels SDS-PAGE überprüft.

4.3.5 Sucrose-Gradient

Die Reaktionsansätze wurden mit 2,13 M Sucrose versetzt (1,6 M Endkonzentration), in einem Zentrifugationsröhrchen mit 0,8 M, 0,4 M, 0,2 M und 0,1 M Sucrose überschichtet und über Nacht bei 100.000 g bei 4 °C im Ausschwingrotor zentrifugiert. Liposomen sind auf Grund ihrer Dichte in den Fraktionen, die 0,4 M Sucrose enthalten, zu finden.

4.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte elektrophoretisch in denaturierenden Gelen nach Laemmli (1970) mit Acrylamid-Konzentrationen (Verhältnis Acrylamid zu N, N'-Methylen-Bisacrylamid 30:0,8) von 7,5-15 % (je nach Experiment) im Trenngel. Für das Trenngel wurde 1,5 M Tris/HCl pH 8,8 und für das Sammelgel wurde 0,5 M Tris/HCl pH 6,8 verwendet. Vor dem Auftragen wurden die Proben in Solubilisierungspuffer (250 mM Tris/HCl pH 6,8, 40 % Glycerin, 9 % SDS, 20 % β-Mercaptoethanol und einer Spatelspitze Bromphenolblau) denaturiert.

Die mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden im Gel 30 min mit Coomassie-Färbelösung (50 % MeOH, 7 % HAc, 0,18 % Coomassie Brilliant Blue R250) unter Schütteln gefärbt. Die Entfärbung des Hintergrunds erfolgte mit Entfärbelösung (40 % MeOH, 7 % HAc, 3 % Glycerin). Anschließend wurden die Gele gewässert und unter Vakuum getrocknet.

4.3.7 Immunodetektion von Proteinen

4.3.7.1 Elektrotransfer von Proteinen (Western Blot)

Über SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden mittels einer Semi-Dry-Blot-Apparatur (Hoefer TE77, GE Healthcare) auf Nitrozellulose-Membranen (Protran, 0,2 µm, Whatman/Schleicher und Schüll) oder auf PVDF-Membranen (Zefa Transfermembran Immobilon-P, 0,45 µm, Zefa-Laborservice GmbH, Harthausen) nach Kyhse-Anderson (1984) unter Verwendung des Towbin Puffers transferiert. Der Transfer wurde für 1 h bei 0,8 mA/cm² der Membranfläche asugeführt. Anschließend wurde die Membran mit Ponceau S (0,5 % Ponceau S; 1 % HAc) gefärbt und die Proteine des Größenstandards markiert.

Verwendete Puffer

Towbin Puffer	25 mM	Tris/HCl pH 8,2-8,4
	192 mM	Glycerin
	0,1 %	SDS
	20 %	Methanol

4.3.7.2 Nachweis von Proteinen durch einen spezifischen Antikörper

Die spezifische Antigenidentifizierung erfolgte durch Reaktion der Proteine mit polyklonalen Antikörpern und anschließender Detektion mittels eines enzymgekoppelten Sekundär-Antikörpers (alkalische Phosphatase gekoppelt an Anti-Kaninchen-IgG (AP-Färbung) oder Meerrettich Peroxidase (ECL-Färbung) ebenfalls gekoppelt an Anti-Kaninchen-IgG). Die Membran wurde zunächst dreimal für 10 min in Magermilch-Puffer abgesättigt und zusammen mit dem Antiserum in einer Antikörperverdünnung (1:200 bis 1:2000) in TTBS für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für 10 min in Magermilch-Puffer gewaschen und mit dem sekundären Antikörper (1:30000 bzw. 1:8000 in TTBS) für 1 h inkubiert. Ungebundene Phosphatase-Konjugat-Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen in Magermilch-Puffer entfernt. Anschließend wurde die Färbereaktion durch die Zugabe der Färbelösung mit 66 µl/10 ml NBT und 133 µl/10 ml BCIP gestartet. Die Farbentwicklung wurde durch Waschen in H₂O mit 50 mM EDTA gestoppt. Für die enhanced chemoluminescent (ECL) Methode zur Proteindetektion wurde statt der Färbelösung entweder der Pierce ECL Western Blotting Substrat Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA) nach

Herstellerangaben verwendet oder es wurde folgendermaßen vorgegangen: Lösung 1 wurde in einem 1:1 Verhältnis mit Lösung 2 gemischt und auf die Membran aufgetragen. Nach entsprechender Inkubationszeit (5 s bis 30 min) wurde die Lumineszenz durch einen Film (Kodak Biomax MR; PerkinElmer, Rodgau, Deutschland) detektiert.

Verwendete Puffer:

TTBS	100 mM	Tris/HCl pH 7,5
	0,2 %	Tween 20
	0,1 %	BSA
	150 mM	NaCl

Färbelösung	100 mM	Tris/HCl pH 9,5
	100 mM	NaCl
	5 mM	MgCl ₂

NBT 50 mg/ml 4-Nitrotetrazoliumchloridblau in 70 % Dimethylformamid

BCIP 12,5 mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat in 100 % Dimethylformamid

Lösung 1	100 mM	Tris/HCl pH 8.5
	1 %	Luminol (w/v)
	0.44 %	Cuomarinsäure (w/v)

Lösung 2	100 mM	Tris/HCl pH 8.5
	0.018 %	H ₂ O ₂ (v/v)

4.3.8 Trichloressigsäure (TCA) –Fällung von Proteinen

Zu 200 µl Proteinprobe wurden 200 µl 50 %-ige TCA zugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde bei 20.000 g für 30 min und 4 °C zentrifugiert. Zum Präzipitat wurden 200 µl Aceton zugegeben, für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 20.000 g für 10 min und 4 °C zentrifugiert. Das Präzipitat wurde getrocknet und anschließend in Solubilisierungspuffer aufgenommen.

4.3.9 Methanol-Chloroform-Fällung

Zu 200 µl Proteinprobe wurden 800 µl Methanol und 200 µl Chloroform gegeben und gemischt. Anschließend wurden 600 µl H₂O zugegeben, ein weiteres Mal geschüttelt,

bei 5.000 g für 10 min zentrifugiert und die wässrige Phase verworfen. Die organische Phase wurde mit 600 µl Methanol versetzt, gemischt und bei 14.000 g für 5 min zentrifugiert. Nach Trocknen des Präzipitats erfolgte die Aufnahme in Solubilisierungspuffer.

4.4 Pflanzenbiologische Methoden

Erbsen (*Pisum sativum*) der Sorte „Arvica“ (Prag, Tschechische Republik) wurden beim Bayerischen Futtersaatbau (Ismaning, Deutschland) bestellt und auf Vermiculit bei einem 12 h Tag/Nacht-Zyklus in einer Klimakammer bei 20 °C wachsen gelassen.

Moos (*Physcomitrella patens*) wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Ralf Reski zur Verfügung gestellt. Langzeitkulturen werden auf Festmedium (Reski und Abel, 1985) in Petrischalen bei 25 °C, einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 h bei einer Lichtintensität von 55 µmol/m² angelegt. Die Pflanzen wurden monatlich umgesetzt. Zur Anzucht größerer Mengen wurde das Moosmaterial vom Festmedium in 5 l Flüssigmedium (Knob-Medium) transferiert und mit einem Ultra Turrax für 60 s bei 19.000 rpm zerkleinert. Der Wachstum erfolgt in einem Bioreaktor (Applikon, Schiedmann, Holland) unter Rühren bei 500 rpm, einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 h bei einer Lichtintensität von 120 µmol/m² und einem pH von 5,5 (Cove *et al.*, 1997; Hohe *et al.*, 2002; Reutter und Reski, 1996).

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung des Proteinimports in Chloroplasten

5.1.1 In vitro Import in Chloroplasten aus *Physcomitrella patens*

Das Moos *Physcomitrella patens* (*P. patens*) gehört zu den Bryophyten und dient als Modelorganismus für viele wissenschaftliche Fragestellungen. Zur Untersuchung der evolutiven Entwicklung des Toc- und Tic-Komplexes wurden in dieser Arbeit verschiedene Vorstufenproteine in isolierte Chloroplasten dieser Modelpflanze importiert und anschließend die Kinetik des Imports, sowie die Abhängigkeit von Energie in Form von ATP untersucht.

Um ein geeignetes Importsubstrat zu finden wurden zunächst die Vorstufenproteine pHP36 und pIEP37 (Tabelle 3), sowie pOE33 und pVipp1 (wurden von der Arbeitsgruppe Soll zur Verfügung gestellt) mit isolierten *P. patens* Chloroplasten inkubiert und nicht-importiertes Protein wurde anschließend mittels der Protease Thermolysin entfernt. Alle Vorstufenproteine konnten erfolgreich importiert und anschließend prozessiert werden (Abbildung 2). Die maturen Proteine entsprachen der vorhergesagten Größe (www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/).

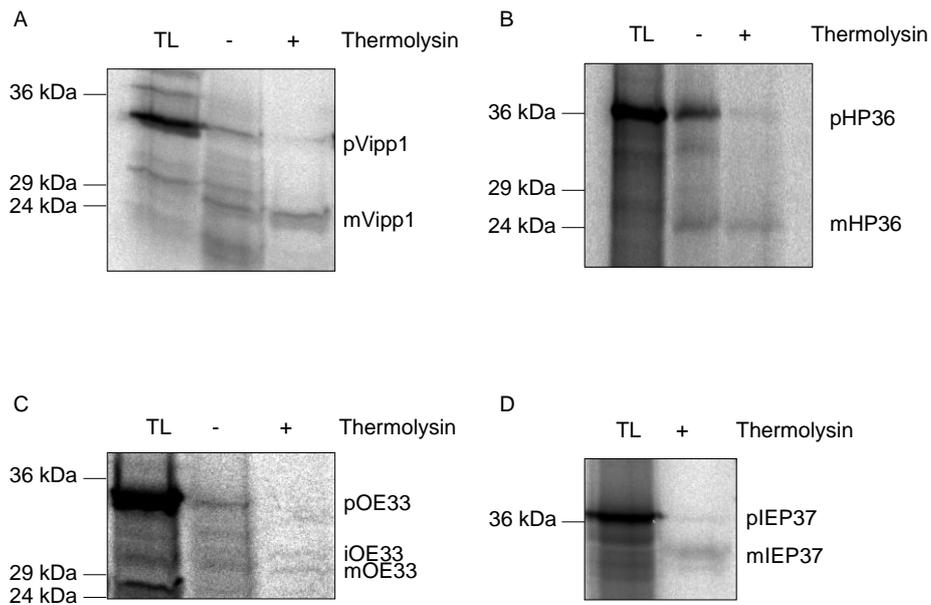


Abbildung 2: Import von pVipp1, pHP36, pOE33 und pIEP37 in isolierte *P. patens* Chloroplasten

pVipp1 (A), pHP36 (B), pOE33 (C) und pIEP37 (D) wurden für 30 min bei 25 °C mit isolierten Chloroplasten inkubiert und anschließend ohne (-) oder mit (+) Thermolysin für 20 min auf Eis behandelt. Eine Thermolysin-resistente Bande der Größe der jeweiligen muren Proteine ist in der Autoradiographie zu erkennen. TL: 10 % des eingesetzten Translationsproduktes, p: Vorstufenprotein, i: Intermediat, m: matures Protein.

Die nachfolgenden Versuche wurden mit Vipp1 (Vesicle Inducing Protein 1) durchgeführt, da dieses Protein die höchste Importeffizienz erreichte. Zur Untersuchung der Geschwindigkeit des Vipp1-Imports wurde eine Kinetik erstellt. Dabei zeigt sich, dass Vipp1 bereits nach 5 min Inkubationszeit importiert wurde (Abbildung 3). Eine deutliche Steigerung erreichte die Importrate nach 20 bis 30 min.

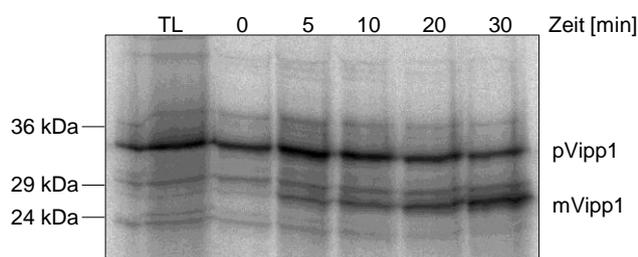


Abbildung 3: Kinetik des Imports von Vipp1 in isolierte *P. patens* Chloroplasten

pVipp1 wurde für 0, 5, 10, 20 und 30 min bei 25 °C mit Chloroplasten inkubiert. Ein erfolgreicher Import ist in der Autoradiographie bereits nach 5 min zu erkennen. Die Importrate steigt mit verlängerter Inkubationszeit. TL: 10 % des eingesetzten Translationsproduktes, p: Vorstufenprotein, m: matures Protein.

Da die für den Import benötigte Menge an ATP einen Indikator für den verwendeten Importweg darstellt (Inoue und Akita, 2008), wurde Vipp1 ohne und mit 3 mM ATP in isolierte *P. patens* Chloroplasten importiert (Abbildung 4). Dabei zeigte sich, dass Vipp1 nur in Anwesenheit von ATP importiert werden kann, was auf eine Beteiligung stromaler Chaperone am Import hindeutet (Kessler und Blobel, 1996).

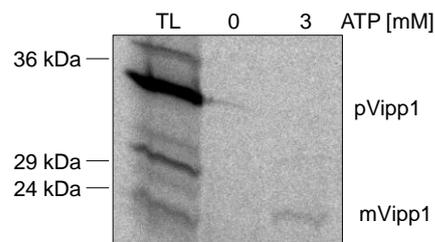


Abbildung 4: ATP-Abhängigkeit des Import von Vipp1 in *P. patens* Chloroplasten

Vipp1-Translationsprodukt wurde von internem ATP befreit und anschließend mit isolierten Chloroplasten unter Zugabe von 0 oder 3 mM ATP für 30 min bei 25 °C inkubiert. Das mature Protein wurde nach Zugabe von 3 mM ATP in der Autoradiographie detektiert. TL: 10 % des eingesetzten Translationsproduktes, p: Vorstufenprotein, m: matures Protein.

Die Importexperimente in *P. patens* haben gezeigt, dass der „generelle“ Importweg durch die Hüllemembranen der Chloroplasten bereits in Moosen existiert hat.

5.1.2 *In vitro* Import und Insertion in die innere Hüllmembran von Chloroplasten aus *Pisum sativum*

Ziel dieser Untersuchungen war die systematische Charakterisierung des Importverhaltens verschiedener Proteine der inneren Chloroplastenhüllmembran. Die verwendeten Proteine wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt: (I) vorhergesagte Lokalisation in der inneren Hüllmembran anhand von Proteomstudien (Ferro *et al.*, 2002; Froehlich *et al.*, 2003; Rolland *et al.*, 2003), (II) Vorhersage eines Erkennungssignals mittels des Programms ChloroP (www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/), (III) Vorhandensein von Transmembrandomänen, (IV) gute Transkriptions- und Translationsraten *in vitro* (Firlej-Kwoka *et al.*, 2008). Die wichtigsten Eigenschaften der verwendeten Proteine wurden in Tabelle 3 zusammengefasst. Zur umfassenden Charakterisierung des Importwegs wurden die Effizienz des Imports, die Abhängigkeit von Energie, die Beteiligung der Komponenten des generellen Importweges, sowie die anschließende Verteilung der Proteine in den Chloroplasten analysiert.

Tabelle 3: Eigenschaften der in dieser Arbeit untersuchten Proteine

	HP28	HP36	IEP37
Funktion	nicht bekannt	Putativer Natrium-abhängiger Gallensäuresymporter	SAM-abhängige Methyl Transferase
AGI Acc. Nr.	At3g51140	At2g26900	At3g63410
Vorhergesagte Länge des Vorstufenproteins (AS)	278	409	338
Verhergesagte Länge des Transit Peptid laut ChloroP (AS)	66	74	51
Kalkuliertes Molekulargewicht (kDa)	27,9	36,1	37,9
Verhergesagte Transmembran-domänen laut Aranemnon	4	9	1

Die Proteine wurden wie in 4.1.8 beschrieben transkribiert und translatiert und anschließend von internem ATP befreit, um den Effekt verschiedener Konzentrationen an ATP auf den Import untersuchen zu können. Zur Kontrolle diente in den folgenden Versuchen das Protein SSU (Small Subunit of Rubisco), da es sich um ein gut charakterisiertes Imports substrat handelt (Waegemann und Soll, 1991; Waegemann und Soll, 1995). Alle Vorstufenproteine konnten erfolgreich in die isolierten *Pisum sativum* Chloroplasten importiert und prozessiert werden (Abbildung 5). Die Länge des Erkennungssignals entsprach dabei jeweils der vorhergesagten Länge (Ferro *et al.*, 2011; Schein *et al.*, 2001).

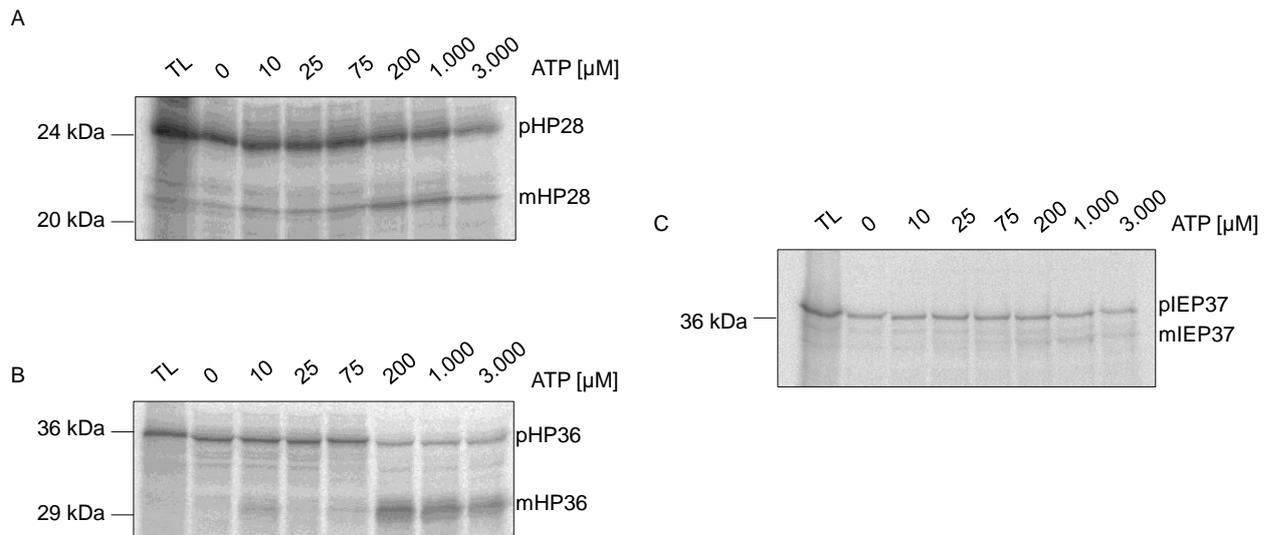


Abbildung 5: ATP-Abhängigkeit der Proteine HP28, HP36 und IEP37 des Imports in *P. sativum* Chloroplasten

Die Vorstufenproteine wurden von internem ATP befreit. Anschließend wurden sie in Gegenwart von 0, 10, 25, 75, 200, 1.000 oder 3.000 μM ATP in isolierte *P. sativum* Chloroplasten für 10 min bei 25 °C importiert. Die verwendeten Vorstufenproteine besitzen ein Erkennungssignal der vorhergesagten Größe (siehe Tabelle 3) und können nach dem Import als matures Protein mittels Autoradiographie detektiert werden. TL: 10 % des eingesetzten Translationsprodukts. p: Vorstufenprotein. m: matures Protein.

Es zeigte sich deutlich, dass der Import aller untersuchten Proteine von ATP abhängig ist. Die maximale Importrate von HP28, HP36 und IEP37 wurde bei 200 μM ATP erreicht, was unter der für den Import von pSSU notwendigen Menge liegt (Waegemann und Soll, 1991). Eine Erhöhung der ATP-Konzentration (bis zu 3 mM) führte nicht zu einer gesteigerten Importrate. Hohe ATP-Konzentrationen werden vor allem für stromale Chaperone, die in den Importprozess involviert sind, benötigt (Kessler und Blobel, 1996). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die untersuchten Proteine nicht vollständig in das Stroma importiert werden, sondern nur kurzfristig in dieses hineinragen, um prozessiert zu werden.

Um zu untersuchen, ob die importierten Proteine in die innere Hüllmembran inseriert werden konnten, wurde eine Harnstoff-Extraktion nach dem Import durchgeführt, wodurch integrale Membranproteine von peripheren unterschieden werden können. Das Kontrollprotein SSU ist ein stromales Protein, welches sich nach dem Import und der Lyse mit Hapes in den löslichen Fraktionen (ÜS) befindet. HP36 und IEP37 jedoch befinden sich nach der Behandlung mit Hapes in den Membranfraktionen und diese wurden daraufhin mit Harnstoff behandelt. Die Proteine liegen nach der Harnstoffextraktion

in den Membranfraktionen (P) vor, was darauf hinweist, dass sie in die Hüllmembran inseriert wurden (Abbildung 6).

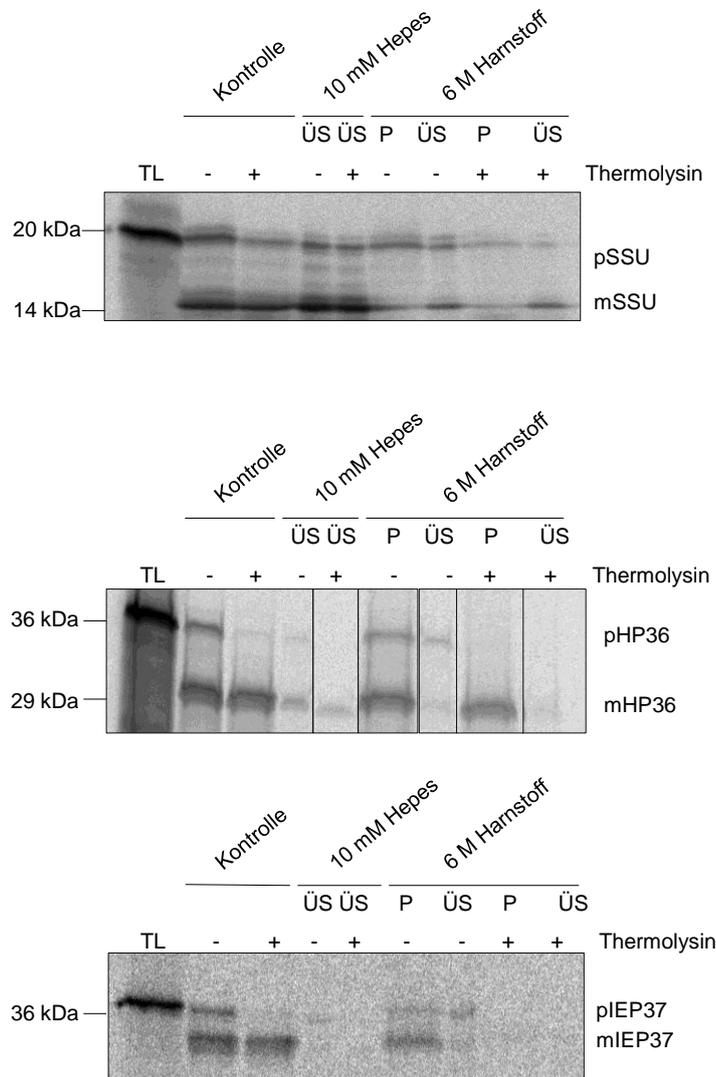


Abbildung 6: Extraktion der Proteine SSU, HP36 und IEP37 von den Hüllmembranen von *P. sativum* Chloroplasten

Die Vorstufenproteine wurden für 10 min bei 25 °C mit isolierten Chloroplasten inkubiert, die Chloroplasten mit 10 mM Hepes für 20 min auf Eis lysiert und die Membranfraktionen mit 6 M Harnstoff für 10 min bei RT behandelt. Es wurde ein Import ohne Harnstoffextraktion als Kontrolle durchgeführt. Zudem wurden die Chloroplasten nach dem Import für 20 min auf Eis ohne (-) oder mit (+) Thermolysin inkubiert. Bei SSU handelt es sich um ein stromales Protein, welches nach der Behandlung mit Hepes im Überstand (ÜS) vorliegt, während HP36 und IEP37 im Präzipitat (P) detektiert werden konnte. Autoradiographie; TL: 10 % des eingesetzten Translationsproduktes, p: Vorstufenprotein, m: matures Protein.

Im nächsten Schritt sollte der Mechanismus der Insertion von HP36 und IEP37 in die innere Hüllmembran weiter untersucht werden, welcher auf zwei Wegen erfolgen kann. Einerseits mittels eines löslichen Intermediats im Stroma, wie es für Tic110 und Tic40

gezeigt wurde (Li und Schnell, 2006; Lübeck *et al.*, 1997; Tripp *et al.*, 2007; Vojta *et al.*, 2007), andererseits über laterale Insertion aus dem Translokationskanal in die Membran („stop-transfer“-Weg), wie es für Arc6 bekannt ist (Tripp *et al.*, 2007). Um zu prüfen, welchen Weg die zu untersuchenden Proteine wählen, wurden Importexperimente unterschiedlicher Dauer ausgeführt, die Chloroplasten anschließend lysiert und in lösliche und Membran-Fraktion getrennt (Abbildung 7). Weder für HP36 noch für IEP37 wurde ein lösliches Intermediat beobachtet, da schon nach 2 min die maturen Proteine ausschließlich in der Membran-Fraktion nachgewiesen wurden. Daraus folgt, dass die Vorstufenproteine mittels des „stop-transfer“-Weges in die innere Hüllmembran inseriert werden.

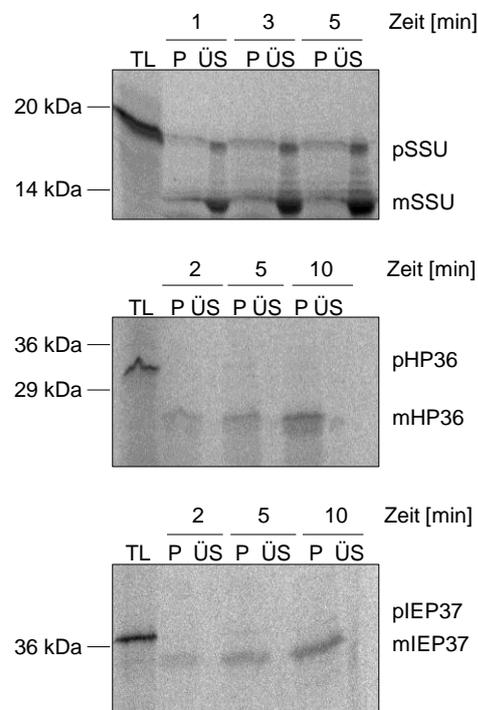


Abbildung 7: „Stop-transfer“ Insertion von pHP36 und pIEP37 in die innere Chloroplastenhüllmembran

Subfraktionierung der *P. sativum* Chloroplasten nach dem Import der Proteine pSSU, pHP36 und pIEP37. pSSU wurde für 1, 3 und 5 min, pHP36 und pIEP37 für 2, 5 und 10 min mit isoliertes *P. sativum* Chloroplasten importiert. Anschließend wurden die Chloroplasten für 20 min auf Eis mit Thermolysin behandelt, mit 10 mM Hepes für 20 min auf Eis lysiert, in Membranfraktionen (P) und lösliche Fraktionen (ÜS) getrennt und mittels Autoradiographie ausgewertet. SSU ist ein stromales Protein und lag in den löslichen Fraktionen vor. HP36 und IEP37 wurde in den Membranfraktionen detektiert. TL: 10 % des eingesetzten Translationsproduktes, p: Vorstufenprotein, m: matures Protein.

Ein weiterer Aspekt des Proteinimports ist die Beteiligung der Rezeptorproteine Toc34 und Toc159 am Importprozess der verschiedenen Vorstufenproteine (Becker *et al.*, 2004b; Cline *et al.*, 1985). Um ihre Notwendigkeit zu untersuchen, wurden Chloroplas-

ten mit Thermolysin inkubiert, bevor sie für den Import eingesetzt wurden, wodurch die cytosolischen Domänen von Toc34 und Toc159 entfernt wurden. Dies führt zu einer drastischen Reduzierung der Importrate von Proteinen, die den Toc-Komplex nutzen (Waegemann und Soll, 1995). Die untersuchten Proteine wurden durch die Protease-Vorbehandlung im Import inhibiert (Abbildung 8), was ein Hinweis darauf sein könnte, dass sie den ersten Schritt der Erkennung durch die Rezeptoren nicht umgehen können.

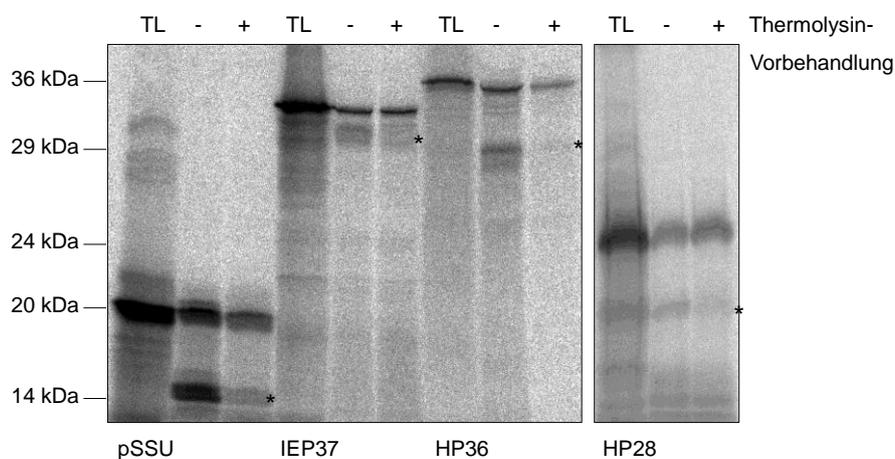


Abbildung 8: Inhibierung des Imports von pSSU, pHP28, pHP36 und pIEP37 durch Vorbehandlung der Chloroplasten mit Thermolysin

Isolierte *P. sativum* Chloroplasten wurden für 30 min auf Eis mit Thermolysin behandelt und anschließend reisoliert. Anschließend wurde ein Import mit den Vorstufenproteinen pSSU, pHP28, pHP36 und pIEP37 durchgeführt und mittels Autoradiographie analysiert. TL: 10 % des eingesetzten Translationsproduktes, *: matures Protein

Aus den Daten kann geschlossen werden, dass die untersuchten Proteine zumindest teilweise die Toc-Maschinerie für die Translokation über die äußere Hüllmembran nutzen. Im weiteren Verlauf ihres Imports werden sie lateral aus dem Importkanal entlassen und prozessiert.

5.1.3 Lokalisierung von DJ-1c in *Pisum sativum*

Eine Ursache für autosomal rezessives Parkinson sind Mutationen oder Fehlfaltungen im PARK7 Protein, welches auch DJ-1 genannt wird (Bonifati *et al.*, 2003). Drei Homologe dieses Proteins wurden in *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) identifiziert. Nach einem Sequenzabgleich zwischen den Pflanzenhomologen DJ-1a, DJ-1b, DJ-1c und dem

humanen DJ-1/PARK7 konnte gezeigt werden, dass das Pflanzengen eine Duplikation des humanen DJ-1/PARK7-Gens representiert. Alle drei Homologe enthalten die funktionell konservierten Aminosäuren und Domänen, welche mit der Parkinson-Krankheit im Zusammenhang stehen (Xu *et al.*, 2010) (siehe Abbildung 9 – Sequenzabgleich DJ-1c und DJ-1/PARK7).

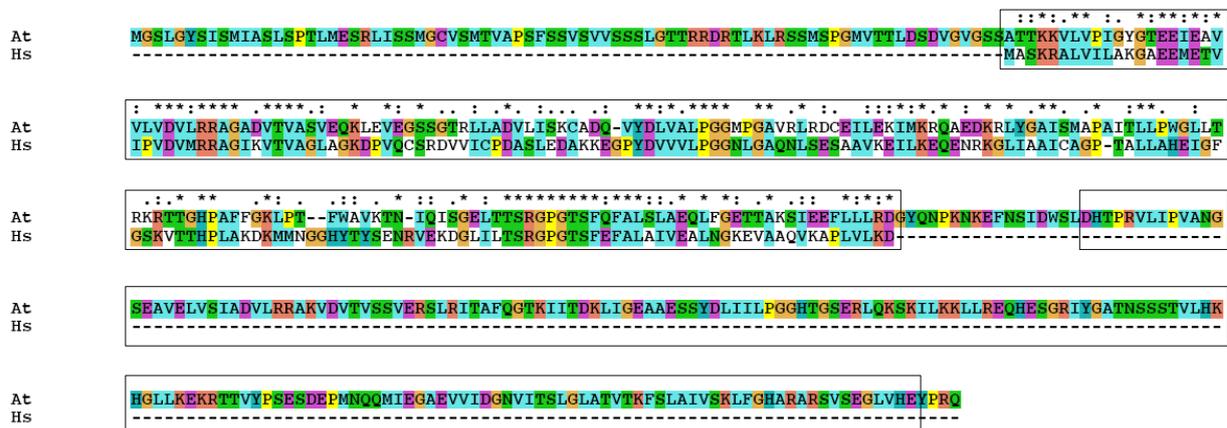


Abbildung 9: Sequenzabgleich zwischen DJ-1c aus *A. thaliana* und DJ-1 aus *H. sapiens*.

Sequenzabgleich zwischen Dj-1c aus *A. thaliana* (At) und DJ-1/PARK7 aus *H. sapiens* (Hs) zeigt, dass eine Genduplikation (Kasten) stattgefunden hat.

Über die Funktion von At4g34020 (DJ-1c) in Pflanzen ist nichts bekannt. In dieser Arbeit wurde im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Møller, Universität Starvanger, die intrazelluläre Lokalisation von DJ-1c untersucht.

```

MGSLGYSISMIALSPTLMESRLISSMGCVSMTVAPSFSSVSVVSSS
LGTTTRDRTLKLRSSMSPGMVTTLSDVGVGSSATTKKVLVPIGYG
TEEIEAVLVLDVLRAGADVTVASVEQKLEVEGSSGTRLLADVLISKCA
DQVYDLVALPGMMPGAVRLRDCEILEKIMKRAEDKRLYGAIAPAI
TLLPWGLLTRKRTTGHFAFFGKLPFWAVKTNIQISGELTTSRGPPTS
FQFALSALAEQLFGETTAKSIEEFLLRDGYQNPKNKEFNIDWSDHT
PRVLI PVANGSEAVELVSIADVLRRAKVDVTVSSVERSRLRITAFQGTKI
ITDKLIGEAAESSYDLIILPGGHTGSERLQSKILKLLREQHESGRIYG
ATNSSSTVLHKHGLLKEKRTTVYPSESDEPMNQMIEGAEEVVIDGNV
ITSLGLATVTKFSLAIVSKLFGHARARSVSEGLVHEYPRQ*

```

Abbildung 10: Aminosäuresequenz DJ-1c aus *A. thaliana*

Hervorgehoben: Erkennungssignal des Vorstufenproteins laut Vorhersageprogramm ChloroP (www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP)

Laut den Vorhersageprogrammen TargetP (www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/) und ChloroP (www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/) befindet sich DJ-1c in Chloroplasten und besitzt ein chloroplastidäres Erkennungssignal (Abbildung 10). Um die Vorhersage zu überprüfen, wurde ein dualer Import durchgeführt (Abbildung 11). Dafür wurde das Vorstufenprotein pDJ-1c mit isolierten *P. sativum* Chloroplasten und Mitochondrien inkubiert. Nach anschließender Reisolierung beider Organellen befand sich das mature Protein fast ausschließlich in Chloroplasten.



Abbildung 11: DJ-1c ist ein chloroplastidäres Protein

pDJ-1c wurde in isolierte *P. sativum* Chloroplasten und Mitochondrien für 20 min bei 25 °C importiert. Anschließend wurden die Proben ohne (-) oder mit (+) Thermolysin für 30 min auf Eis nachbehandelt und reisoliert. Während das Vorstufenprotein pDJ-1c sowohl an Chloroplasten wie auch an Mitochondrien anbindet (siehe Höhe pDJ-1c ohne Thermolysin-Nachbehandlung), kann das mature Protein mDJ-1c nur in Chloroplasten detektiert werden. Autoradiographie; TL: 10 % des eingesetzten Translationsproduktes, p: Vorstufenprotein, m: matures Protein, *: Vorstufenprotein, dass aufgrund chloroplastidärer Proteine ein anderes Laufverhalten aufweist.

Anschließend wurde die Lokalisierung von DJ-1c innerhalb des Chloroplasten untersucht. Dafür wurde ein Import von DJ-1c in *Pisum sativum* Chloroplasten durchgeführt. Nach dem Import wurden die Chloroplasten mit 10 mM Hepes lysiert, um Membranproteine von den löslichen Fraktionen der Chloroplasten zu trennen. Das mature Protein lag zu etwa gleichen Teilen Membran-gebunden sowie im Überstand vor (Abbildung 12). Da es allerdings mittels 6 M Harnstoff von der Membran teilweise gelöst werden konnte, kann gefolgert werden, dass es nicht fest in der Membran verankert, sondern nur assoziiert ist.

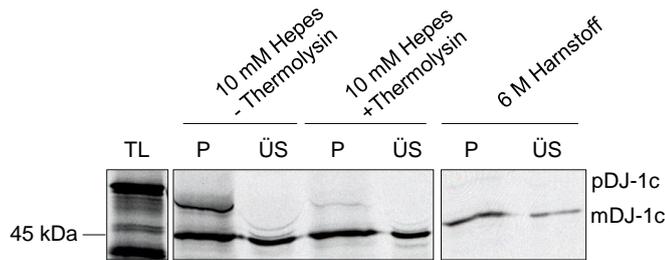


Abbildung 12: Lokalisierung von Dj-1c in Chloroplasten

Autoradiographie der Subfraktionierung der *P. sativum* Chloroplasten nach Import von DJ-1c in Membran- und lösliche Fraktionen und anschließender Harnstoffextraktion der Membranfraktionen. Das Vorstufenprotein wurde für 10 min bei 25 °C mit isolierten Chloroplasten inkubiert. Anschließend wurden die Chloroplasten mit 10 mM Hepes für 20 min auf Eis lysiert, um die Membranen (P) von löslichen Fraktionen (ÜS) zu trennen. Die Membranfraktionen wurden daraufhin mit 6 M Harnstoff für 10 min bei RT behandelt, damit hydrophobe Bindungen an der Membran gelöst werden können. Zudem wurden die Chloroplasten nach dem Import für 20 min auf Eis ohne (-) oder mit (+) Thermolysin behandelt. TL: 10 % des eingesetzten Translationsproduktes, p: Vorstufenprotein, m: matures Protein.

Um die Lokalisation des Proteins weiter untersuchen zu können, wurden die Kompartimente der Chloroplasten nach dem Import von DJ-1c voneinander getrennt (Abbildung 13). Dadurch konnte das Protein deutlich im Stroma der Chloroplasten detektiert werden.

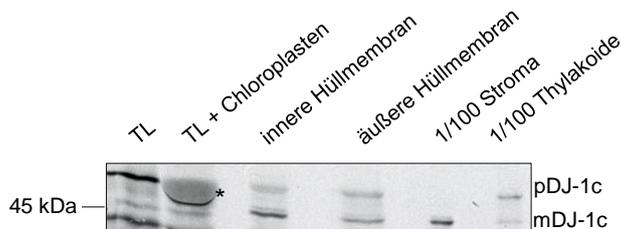


Abbildung 13: Dj-1c befindet sich größtenteils im Stroma

Autoradiographie des Imports von pDJ-1c in isolierte *P. sativum* Chloroplasten und anschließender Trennung der Chloroplasten-Kompartimente. Nach dem Import für 10 min wurden die Chloroplasten mit 10 mM Hepes für 30 min auf Eis lysiert und mittels Sucrose-Gradienten in innere und äußere Hüllmembran, sowie Stroma und Thylakoide getrennt. TL: 10 % des eingesetzten Translationsproduktes, p: Vorstufenprotein, m: matures Protein, *: Vorstufenprotein, dass aufgrund chloroplastidärer Proteine ein anderes Laufverhalten aufweist.

Zusammen genommen deuten die Ergebnisse darauf hin, dass sich Dj-1c im Stroma der Chloroplasten befindet.

5.2 Struktur von Tic110

Das Strukturmodell von Tic110 beinhaltet zwei N-terminale hydrophobe, sowie vier amphipatische Transmembrandomänen (Abbildung 14). Die vier amphipatischen Transmembrandomänen bilden wahrscheinlich einen Kanal in der inneren Hüllmembran von Chloroplasten (Balsera *et al.*, 2009; Heins *et al.*, 2002). Die hydrophoben Transmembrandomänen dagegen scheinen für die Verankerung des Proteins in die Membran verantwortlich zu sein, da eine Studie zeigte, dass die Aminosäuren 1-235 der *P. sativum* Sequenz ausreichen, um Tic110 fest in die innere Hüllmembran zu verankern (Lübeck *et al.*, 1996; Lübeck *et al.*, 1997).

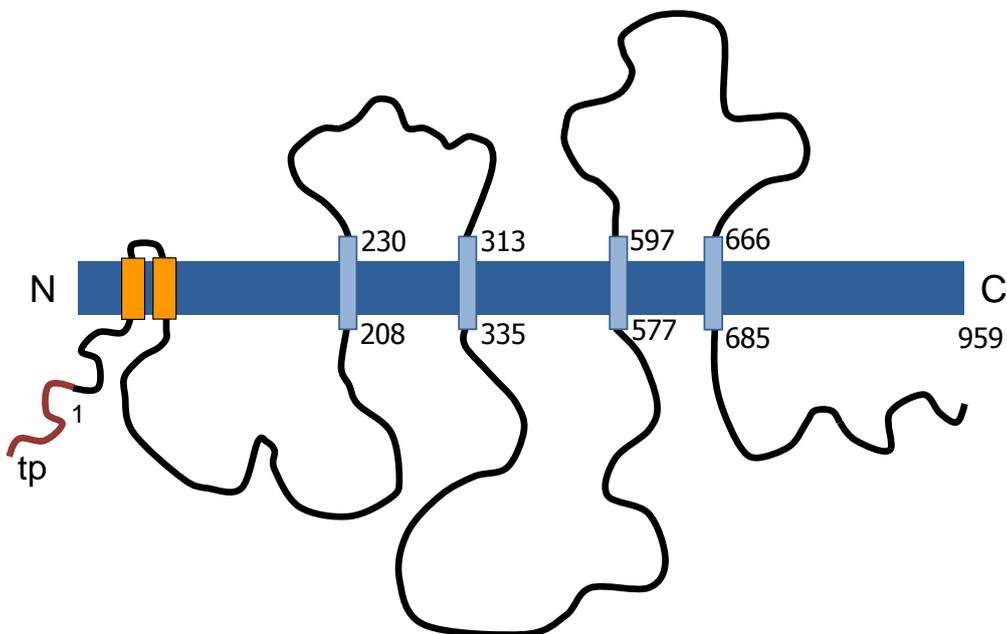


Abbildung 14: Strukturmodell von Tic110

Tic110 enthält zwei hydrophobe Transmembrandomänen am N-Terminus (N), sowie vier amphipatische Transmembrandomänen. Die Zahlen stellen die jeweilige Aminosäureposition des matten Proteins (*P. sativum* Sequenz) dar. tp: Erkennungssignal, C: C-Terminus (nach Balsera *et al.*, 2009)

Sequenzanalysen von Tic110 ergaben, dass es hoch konservierte Aminosäuren und Regionen besitzt (Abbildung 15).

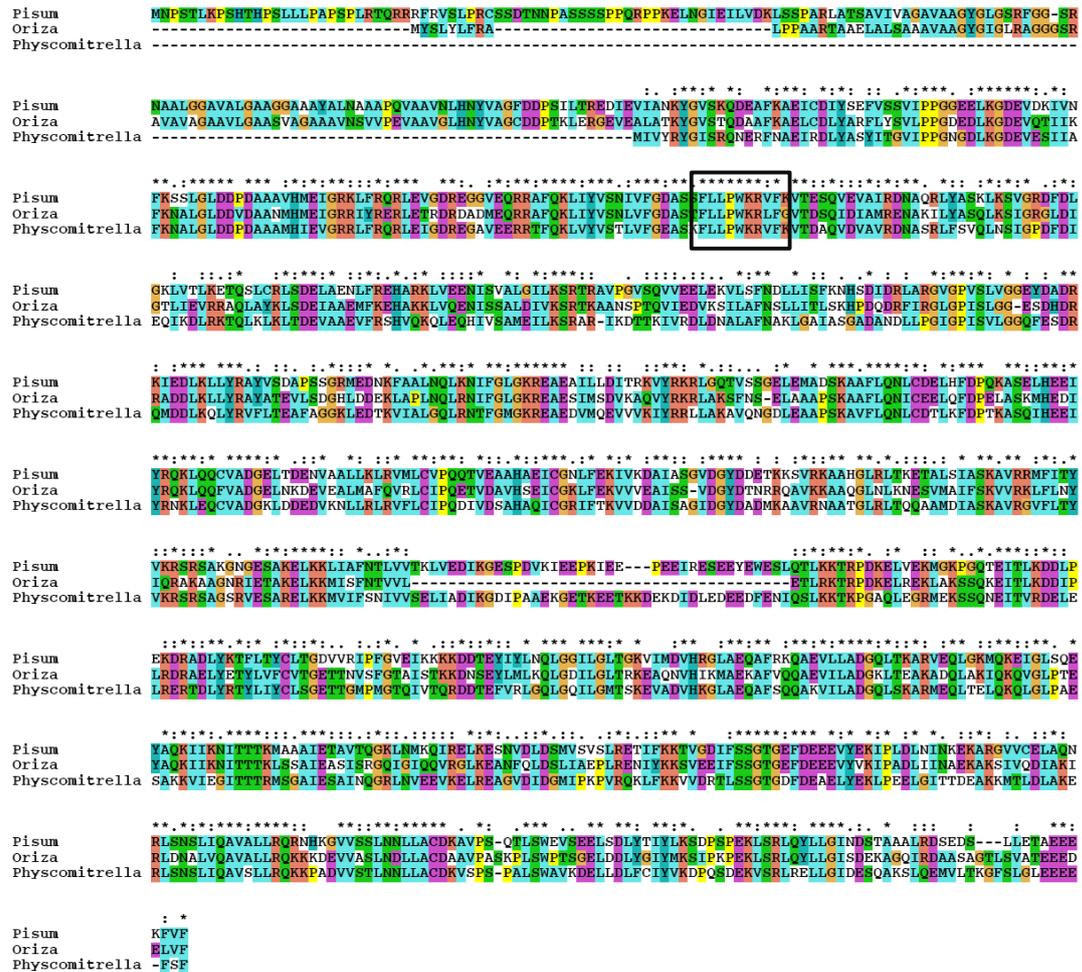


Abbildung 15: Sequenzabgleich für Tic110 in *P. sativum*, *O. sativa* und *P. patens*.

Tic110 besitzt verschiedene hoch konservierte Aminosäuren und Domänen. Die in dieser Arbeit näher untersuchte FxxxWxxxF-Domäne wurde mit einem schwarzen Kasten markiert.

In dieser Arbeit wurde das Motiv FxxxWxxxF aus folgenden Gründen näher untersucht:

- (I) Phenylalanin (F) und Tryptophan (W) sind ungeladene, hydrophobe, aromatische Aminosäuren, weshalb sie oft in hydrophoben Interaktionen eine wichtige Rolle spielen und für eine Interaktion von Protein mit Lipiden sowie die Proteininsertion in die Membran verantwortlich sein könnten (White, 2007; White und von Heijne, 2005; White und Wimley, 1999).
- (II) Die konservierte Domäne liegt direkt am Ende der ersten amphipatischen Helix.
- (III) Die konservierte Domäne liegt zwischen AS 328-334 und somit innerhalb der Region, die für die Verankerung in die innere Hüllmembran verantwortlich ist. Für diese Strukturanalyse wurde ein 46 kDa großes Hybrid aus dem N-Terminus von Tic110 und dem stromalen Protein SSU kloniert (Abbildung 16 A und C,

wurde von der Arbeitsgruppe Soll zur Verfügung gestellt). Zur Analyse wurde die FxxxWxxxF Domäne des Translationsklons tpSSU-110N-mSSU mittels Mutagenese in LxxxIxxxL, bzw. GxxxSxxxG umgewandelt (Abbildung 16 B). Die Aminosäuren Leucin (L) und Isoleucin (I) wurden gewählt, da sie ebenfalls hydrophob sind und eine ähnliche Größe besitzen und so der Unterschied zu den aromatischen Aminosäuren relativ gering ist. Die Aminosäuren Glycin (G) und Serin (S) wurden gewählt, da sie sehr klein und nicht hydrophob sind und somit einen großen Unterschied zu den aromatischen Aminosäuren darstellen.

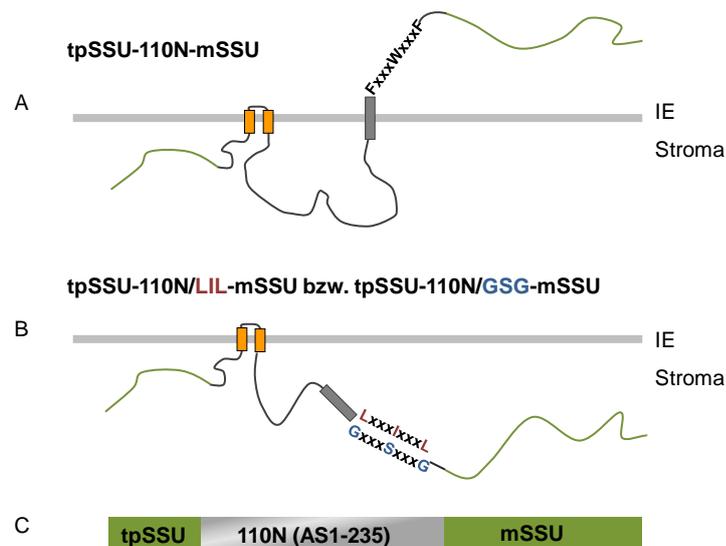


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Tic110/SSU-Hybride

A. Zusammensetzung und mögliche Verankerung des Hybrids aus dem Erkennungssignal (tp) von SSU der *Nicotiana tabacum* Sequenz, den Aminosäuren 1-235 vom N-Terminus von Tic110 der *Pisum sativum* Sequenz, sowie dem murenen SSU der *Glycine max* Sequenz.

B. Möglicher Einfluss der Mutation der FxxWxxF-Domäne zwischen AS 228 und 334 zu LxxIxxL bzw. GxxxSxxxG auf Verankerung in der Membran.

C. Schema des Tic110/SSU-Hybrids

Nicht dargestellt: (I) zwischen dem Erkennungssignal von SSU und dem N-Terminale Teil von Tic110 befinden sich die Aminosäuren 1-6 des murenen SSU, (II) am C-Terminus befinden sich 6 Methionine zur Erhöhung des radioaktiven Signals.

Zunächst wurde mittels Import und anschließender Subfraktionierung untersucht, ob das Protein auch ohne die FxxxWxxxF-Domäne in die innere Hüllmembran inseriert wird (Abbildung 17). Dazu wurden die Proteine tpSSU-110N-mSSU, tpSSU-110N/LIL-mSSU, sowie tpSSU-110N/GSG-mSSU in isolierte *P. sativum* Chloroplasten für 15 min bei 25 °C importiert, die Chloroplasten mittels 10 mM Hepes pH 8 lysiert und anschließend wurden die Membranfraktionen von den löslichen Proteinen getrennt.

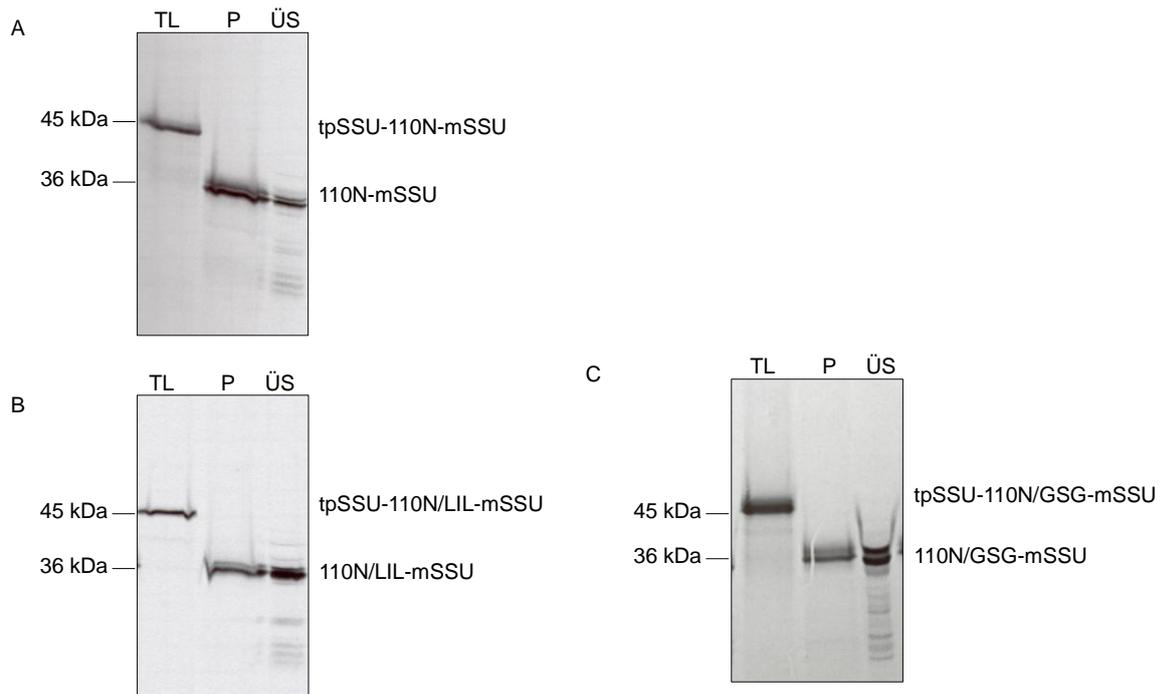


Abbildung 17: Das FxxxWxxxF-Motiv erhöht die Insertionsrate in die innere Hüllmembran

Die Proteine tpSSU-110N-mSSU (A), tpSSU-110N/LIL-mSSU (B), sowie tpSSU-110N/GSG-mSSU (C) wurden in isolierte *P. sativum* Chloroplasten für 15 min bei 25 °C importiert und anschließend die Membranfraktionen (P) von den löslichen Fraktionen (ÜS) getrennt und mittels Autoradiographie ausgewertet. TL: 10 % des eingesetzten Translationsproduktes.

Das Protein tpSSU-110N-mSSU mit der FxxxWxxxF-Domäne wurde größtenteils in der Membranfraktion detektiert. Die Proteine tpSSU-110N/LIL-mSSU bzw. tpSSU-110N/GSG-mSSU mit der LxxxLxxxL- bzw. GxxxSxxxG-Domäne befanden sich nach dem Import hauptsächlich in der löslichen Fraktion. Daraus lässt sich folgern, dass durch die eingefügten Mutationen die Insertionsrate in die innere Hüllmembran gesenkt wurde.

Eine weitere Möglichkeit der Untersuchung der Topologie von Proteinen ist eine Nachbehandlung der Chloroplasten mit der Protease Trypsin. Die Proteine wurden für 15 min bei 25 °C in die isolierten *P. sativum* Chloroplasten importiert und anschließend für 1 h auf Eis mit Trypsin (1 µg pro 1 µg Chlorophyll) inkubiert (Abbildung 18). Unter diesen kontrollierten Bedingungen penetriert die Protease die äußere Hüllmembran der Chloroplasten ohne die innere Hüllmembran zu beschädigen.

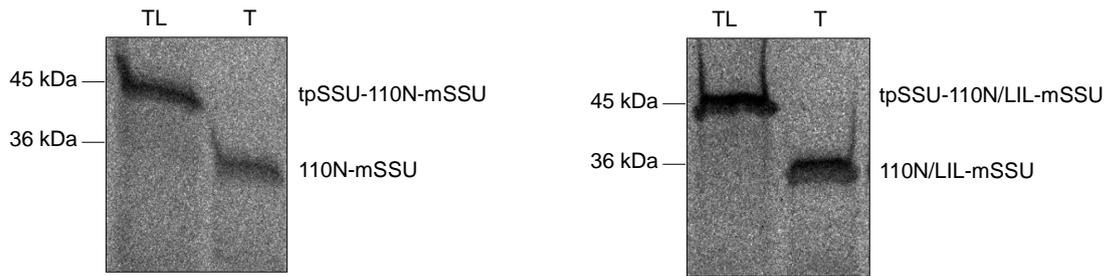


Abbildung 18: Nach Behandlung der Chloroplasten mit der Protease Trypsin wurden für die verwendeten Proteine eine intakte mature Bande der richtigen Größe detektiert

Die Proteine tpSSU-110N-mSSU und tpSSU-110N/LIL-mSSU wurden für 15 min bei 25 °C in isolierte *P. sativum* Chloroplasten importiert. Anschließend wurden die Chloroplasten mit der Protease Trypsin inkubiert. Autoradiographie, TL:10 % des eingesetzten Translationsproduktes, T: mit Trypsin behandelte Proben.

Das Protein 110N-mSSU mit der FxxxWxxxF-Domäne wurde durch die Behandlung mit der Protease Trypsin gering dezimiert, während das Protein 110N/LIL-mSSU nicht beeinflusst wurde. Das deutet darauf hin, dass die Verankerung in die innere Hüllmembran dem Topologie-Modell in Abbildung 16 entspricht.

Um die Topologie der Hybride und somit die Funktion der FxxxWxxxF-Domäne weiter zu analysieren wurden Überexpressionsklone erstellt. Dafür wurden die Aminosäuren 1-235 von Tic110 *P. sativum*, sowie die AS 1-32 des muren SSU *Glycine max* in den pET21d-Vektor (Novagen/Merck) kloniert. Die Proteine wurden mittels des C-terminalen Histidin-Anhangs und einer Nickel-Säule aufgereinigt (Abbildung 19). Für den folgenden Versuch wurde das Protein mit 100 mM Imidazol von der Säule eluiert.

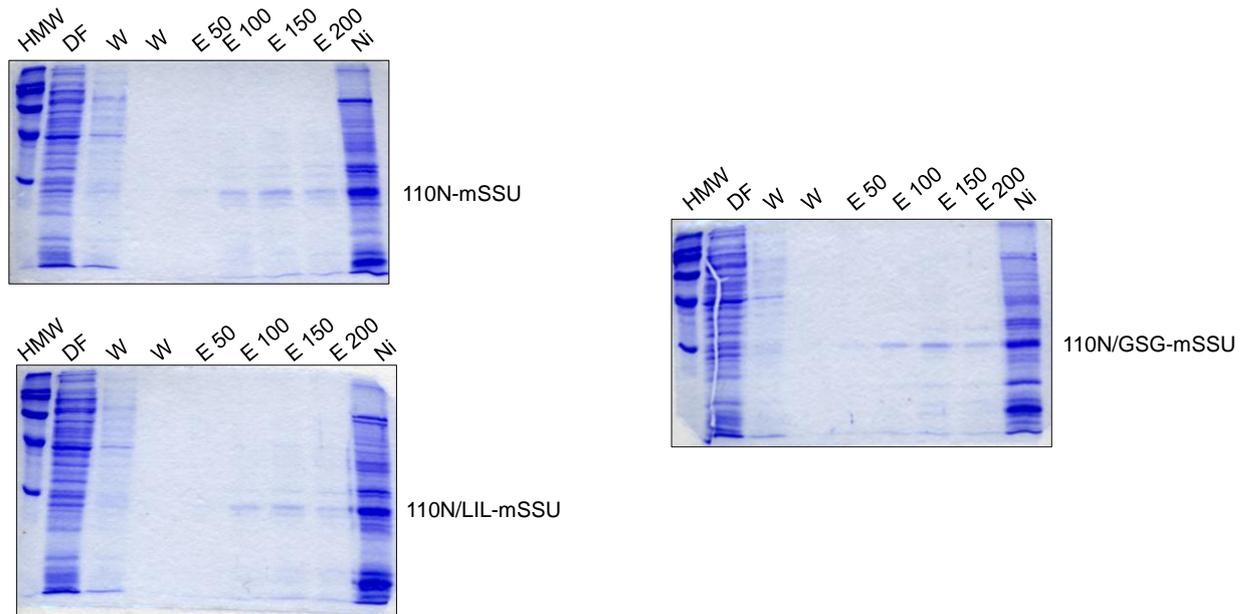


Abbildung 19: Proteinaufreinigung

Die Proteine 110N-mSSU, 110N/LIL-mSSU und 110N/GSG-mSSU wurden mittels einem C-terminalen Histidin-Anhangs über eine Nickel-Säule aufgereinigt. Coomassie-Färbung, HMW: High molecular weight marker, DF: Durchfluss nach Bindung des Proteins an die Nickel-Säule, W: Waschschritte, E: Elution mit 50, 100, 150 und 200 mM Imidazol, Ni: nach der Elution an Nickel verbliebenes Protein.

Die Proteine wurden anschließend in Liposomen rekonstituiert und mit Hilfe von Dichtegradientenzentrifugation wurde überprüft, ob das Protein in die Liposomen inseriert hatte (Abbildung 20).

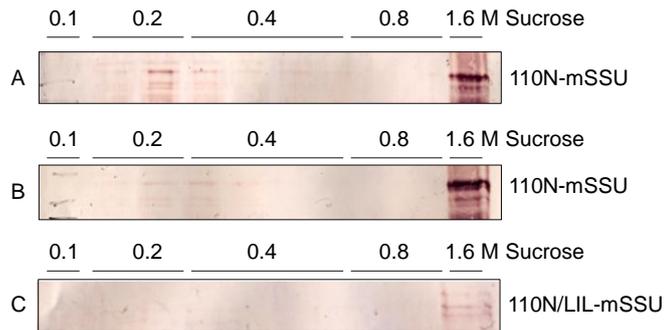


Abbildung 20: Stabile Rekonstitution von 110N-mSSU in Liposomen

Die Proteine 110N-mSSU und 110N/LIL-mSSU wurden überexprimiert, aufgereinigt und in Liposomen rekonstituiert. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei RT in 20 mM Tris pH 8 (A und C) bzw. 6 M Harnstoff (B) gewaschen und dann unter einen Sucrose-Gradienten geschichtet. Die Proben wurden mit TCA gefällt, mittels SDS-PAGE und anschließender Immunodetektion ausgewertet.

Das Protein 110N-mSSU, welches die FxxxWxxxF-Domäne enthält, wurde in die Liposomen inseriert (Abbildung 20 A). Es konnte nach der Behandlung mit 6 M Harnstoff nicht aus den Liposomen entfernt werden, was dem Verhalten eines integralen Membranproteins entspricht (Abbildung 20 B). Obwohl die gleiche Proteinmenge 110N/LIL-mSSU, welches die LxxxLxxxL-Domäne enthält, für die Rekonstitution eingesetzt wurde, konnte nur ein schwaches Signal bei einer Dichte von 1,6 M Sucrose und keine Rekonstitution in Liposomen detektiert werden (Abbildung 20 C). Daraus lässt sich ableiten, dass die FxxxWxxxF-Domäne einen Einfluss auf die Verankerung hat.

Die Rekonstitution der Proteine in den Lipidbilayer kann auf zwei Arten erfolgen: (I) „Right side out“ oder (II) „Wrong side out“ (Abbildung 21). Inseriert das Protein „Right side out“, befände sich die zum Stroma gerichtete Seite innerhalb des Liposoms, die Rekonstitution erfolgte also wie im nativen Zustand. Im zweiten Fall erfolgt die Insertion so, als ob sich das Stroma außerhalb des Lipidrings befände.

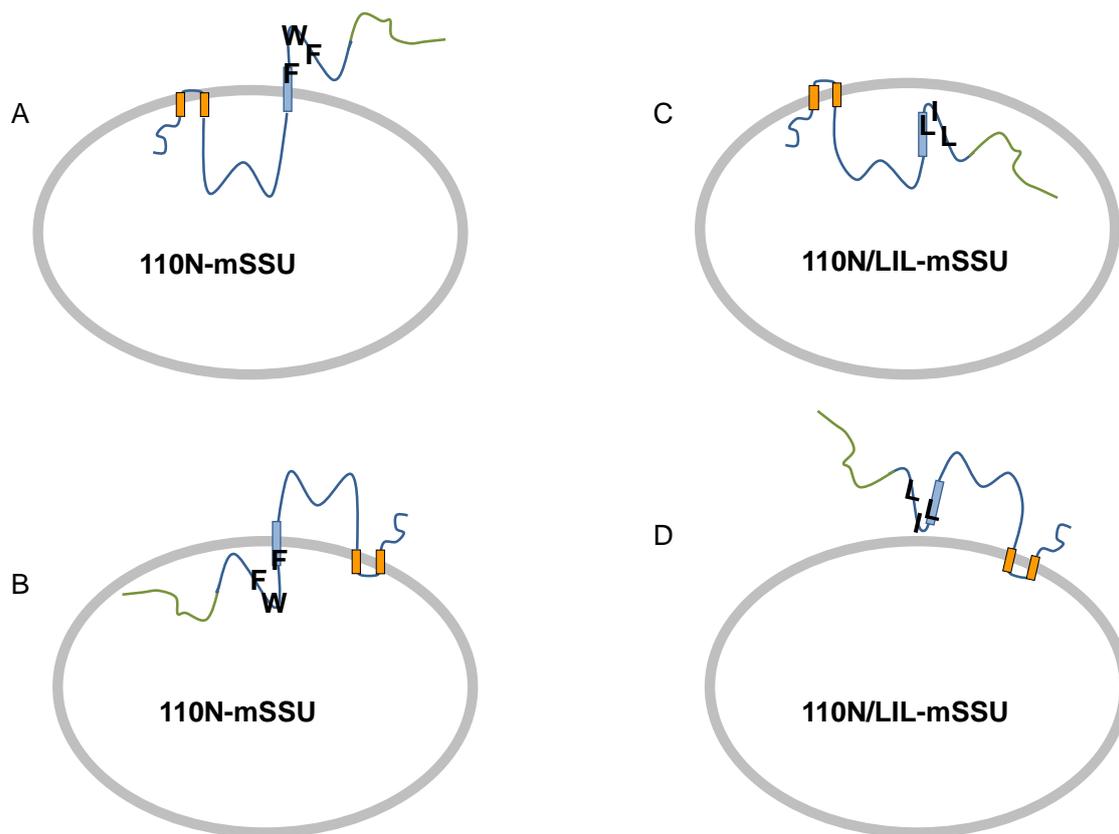


Abbildung 21: Model der Rekonstitution der Proteine in die Liposomen

Die Proteine 110N-mSSU und 110N/LIL-mSSU besitzen möglicherweise eine unterschiedliche Topologie aufgrund der Mutation der Domäne. Die Rekonstitution von Membranproteinen in die Liposomen kann auf zwei Arten geschehen: (I) Right side out (siehe A und C), wobei sich das Protein so in die Liposomen inseriert, als ob es sich um die Hüllmembran der Chloroplasten handelt. (II) Wrong side out (siehe B und D), was bedeutet, dass das Protein sich so verhält, als ob es von der stromalen Seite aus in die Hüllmembran der Chloroplasten inseriert wird. Das Protein 110N/GSG-mSSU würde sich nach dieser Hypothese wie 110N/LIL-mSSU verhalten und wurde deshalb nicht weiter untersucht.

Das Modell in Abbildung 21 macht deutlich, dass sich unabhängig von der Insertionsart ein unterschiedliches Verhalten nach Proteasebehandlung zeigen sollte, falls die FxxxWxxxF-Domäne einen Einfluss auf die Topologie ausübt.

Die Proteine 110N-mSSU, 110N/LIL-mSSU sowie 110N/GSG-mSSU wurden überexprimiert, aufgereinigt, in Liposomen rekonstituiert und anschließend für 2, 5 und 10 min einer Inkubation mit der Protease Thermolysin unterzogen (Abbildung 22). Da die Proteinkonzentration nicht genau bestimmt werden konnte, wurde zur Kontrolle 5 µl Protein, sowie nicht mit Protease behandelte Proteoliposomen aufgetragen.

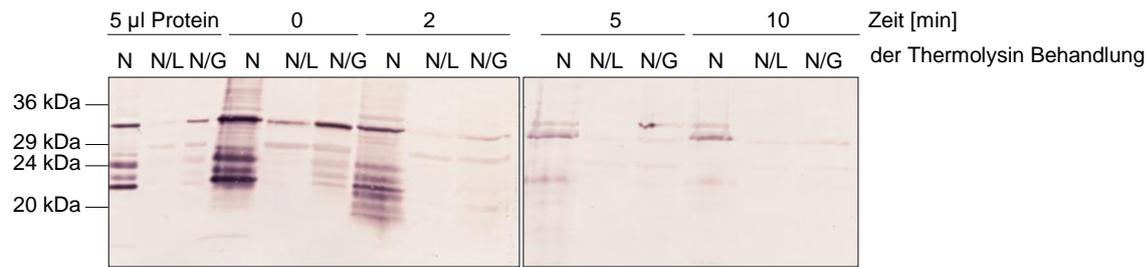


Abbildung 22: Unterschiedliche Insertion von 110N-mSSU und 110N/LIL-mSSU, 110N/GSG-mSSU in Liposomen

Die Proteine 110N-mSSU (N), 110N/LIL-mSSU (N/L) und 110N/GSG-mSSU (N/G) wurden überexprimiert, aufgereinigt und anschließend in Liposomen rekonstituiert. Die Proteoliposomen wurden daraufhin für 0, 2, 5 und 10 min mit der Protease Thermolysin auf Eis inkubiert und mittels Immunodetektion analysiert. Es wurden unterschiedliche Proteinmengen aufgetragen, weshalb zur Kontrolle 5 µl des aufgereinigten Proteins, sowie eine nicht behandelte Probe aufgetragen wurde.

Das Protein 110N-mSSU wurde durch die Behandlung mit der Protease Thermolysin kaum beeinträchtigt, während die Proteine 110N/LIL-mSSU und 110N/GSG-mSSU proteolytisch abgebaut wurden. Das deutet darauf hin, dass (I) ein großer Teil der Proteine „Wrong side out“ in die Liposomen inseriert wird und, dass (II) die FxxWxxF-Domäne auf die Topologie der Proteine einen Einfluss hat.

5.3 Funktion von Tic110

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Tic110 in der Lage ist Vorstufenprotein zu binden und für die Translokation von Proteinen durch die innere Hüllmembran verantwortlich ist. Zunächst wurde psTic110ΔN (Aminosäure 96-959, *P. sativum*) überexprimiert und aufgereinigt (Balsera *et al.*, 2009). Dieses Konstrukt wurde verwendet, da elektrophysiologische Messungen ergaben, dass dieser Teil von Tic110 ausreicht, um Kanalaktivität nachzuweisen (Balsera *et al.*, 2009). Anschließend wurde das aufgereinigte Protein in Lipide rekonstituiert. Das Vorstufenprotein pSSU wurde transkribiert und translatiert und anschließend mit den psTic110ΔN-Proteoliposomen für 15 min bei 25 °C inkubiert. Zur Kontrolle wurde das Vorstufenprotein auch mit Liposomen (ohne psTic110ΔN) inkubiert. Die Proben wurden unter einen Sucrose-Gradienten geschichtet. Um die Rekonstitution von psTic110ΔN in die Liposomen zu kontrollieren wurde eine Immunodetektion mit α-Tic110 durchgeführt. Die Proteoliposomen und Liposomen, sowie gebundenes Vorstufenprotein pSSU befanden sich nach der

Zentrifugation in den Fraktionen mit 0.4 M Sucrose. Ungebundenes Vorstufenprotein konnte bei einer Dichte von 1.6 M Sucrose detektiert werden (Abbildung 23).

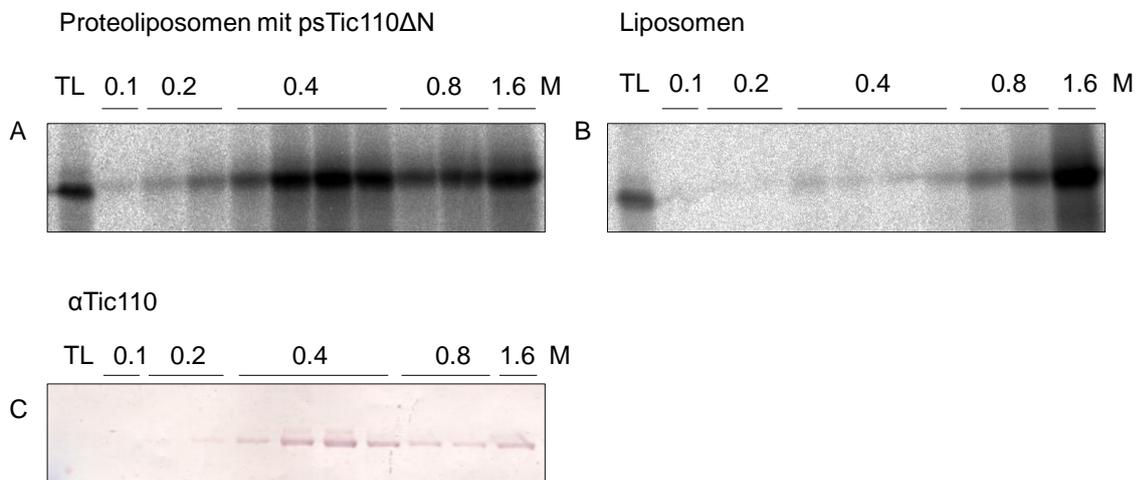


Abbildung 23: Das Protein pSSU bindet an Proteoliposomen mit rekonstituiertem psTic110ΔN

Das Translationsprodukt von pSSU wurde mit den Proteoliposomen (A) oder mit Liposomen (B) für 15 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde die Probe unter einen Gradienten mit 1.6, 0.8, 0.4, 0.2 und 0.1 M Sucrose geschichtet und bei 100.000 g und 4 °C über Nacht zentrifugiert. Proteoliposomen (A), Liposomen (B) und das an die Proteoliposomen gebundene Protein pSSU (A) befand sich danach in den Fraktionen bei 0.4 M Sucrose, während sich ungebundenes pSSU in den Fraktionen bei 1.6 M Sucrose befand (B). Die Lokalisation des Proteins pSSU wurde mittels Autoradiographie analysiert, eine Immunodetektion mit α-Tic110 wurde durchgeführt (C), um sicher zu stellen, dass psTic110ΔN in die Liposomen rekonstituiert wurde.

Die Quantifizierung der in Abbildung 23 gezeigten Banden erfolgte mittels der Aida Software (Abbildung 24). Das Ergebnis deutet darauf hin, dass pSSU von psTic110ΔN erkannt und gebunden wird, da pSSU eindeutig bei 0.4 M Sucrose akkumuliert.

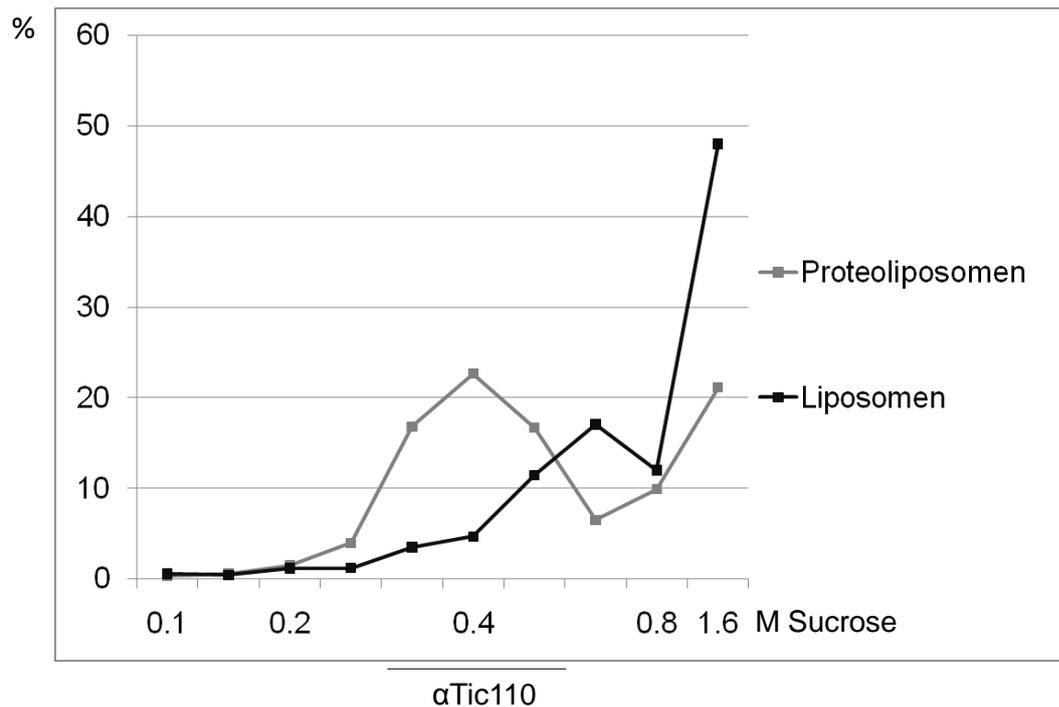


Abbildung 24: Das Protein pSSU bindet an in Liposomen rekonstituiertes psTic110 Δ N
Quantifizierung der Abbildung 23 A und B.

Um unspezifische Bindung an die Liposomen auszuschließen wurden die Proben außerdem vor der Zentrifugation mit 10 mM Mops, sowie 1 M Mops gewaschen (Abbildung 25). Das Waschen mit hoher Ionenkonzentration konnte die Bindung von pSSU an die Proteoliposomen allerdings nicht lösen.

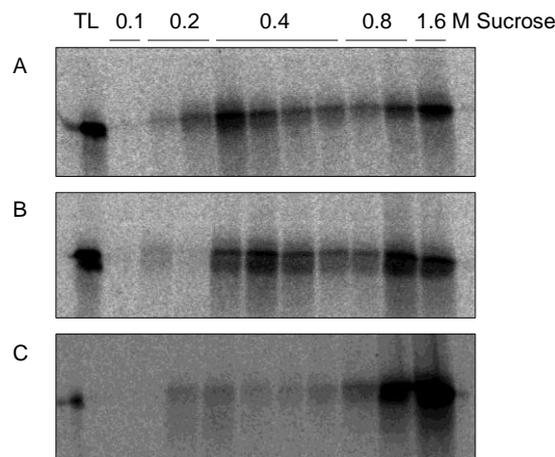


Abbildung 25: Die Anbindung von pSSU an Proteoliposomen (psTic110ΔN) ist auch bei hoher Ionenkonzentration stabil

A. und B. Gereinigte psTic110ΔN wurde in Proteoliposomen rekonstituiert und mit pSSU für 15 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben A. mit 10 mM Mops bzw. B. mit 1 M Mops gewaschen und unter einen Gradienten mit 1.6, 0.8, 0.4, 0.2 und 0.1 M Sucrose geschichtet. Durch die darauf folgende Zentrifugation bei 100.000 g und 4 °C über Nacht befanden die Proteoliposomen in den Fraktionen von 0.4 M Sucrose. Das mittels Autoradiographie detektierte, an die Proteoliposomen gebundene Protein pSSU befand sich ebenfalls in den Fraktionen von 0.4 M Sucrose und lässt sich auch nach dem Waschen mit hoher Salzkonzentration von den Proteoliposomen lösen. C. Kontrolle mit Liposomen, gewaschen mit 10 mM Mops.

Daraus kann geschlossen werden, dass Tic110 spezifisch Vorstufenproteine bindet.

Anschließend sollte gezeigt werden, dass Tic110 nicht nur in der Lage ist pSSU zu binden, sondern auch in Proteoliposomen zu transportieren. Zunächst wurde Stroma aus Chloroplasten von *P. sativum* isoliert. Um die Aktivität des Stromas zu kontrollieren wurde eine stromale Prozessierungsreaktion durchgeführt. Danach wurden 20 mg Lipide in 1 ml Stroma gelöst, wodurch das Stroma in die Liposomen eingeschlossen wurde (Abbildung 26 B). Gereinigtes psTic110ΔN wurde in Liposomen rekonstituiert, diese Proteoliposomen wurden dann mit pSSU für 15 min bei 25 °C unter Zugabe von 3 mM ATP inkubiert und anschließend mit oder ohne 1 µl der Protease Thermolysin (1 mg/ml) für 2 min bei RT behandelt. Nach Zentrifugation bei 100.000 g für 1 h und 4 °C befinden sich im Präzipitat (P) die Proteoliposomen, in diese eingeschlossenes Stroma, angebundenes Vorstufenprotein pSSU und wie in Abbildung 26 zu erkennen matures Protein mSSU (Bande bei 14 kDa). Dieses ist auch nach der Behandlung mit Thermolysin noch gut erkennbar.

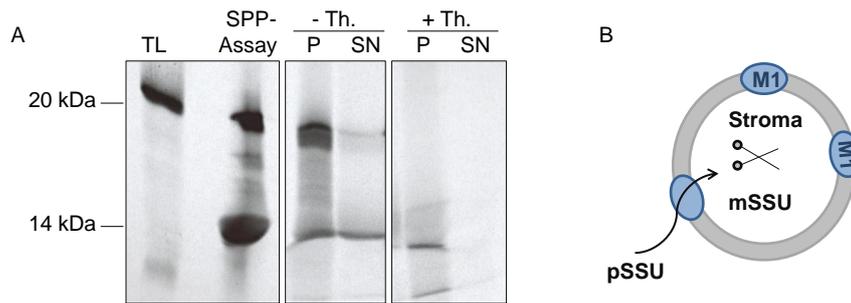


Abbildung 26: Import und Prozessierung von pSSU in psTic110ΔN-Proteoliposomen (I)

A. psTic110ΔN wurde überexprimiert, aufgereinigt und in Liposomen, welche in isoliertem Stroma aus *P. sativum* gelöst wurden, rekonstituiert. Das Protein pSSU wurde mit M1-Proteoliposomen für 15 min bei 25 °C inkubiert und anschließend ohne oder mit 1 µg Thermolysin für 2 min bei 25 °C behandelt. Das Vorstufenprotein pSSU (Bande bei 20 kDa) wurde an die Proteoliposomen gebunden und durch die stromale Prozessierungs Peptidase (SPP) zum matures SSU (Bande bei 14 kDa). Zur Kontrolle wurde eine stromale Prozessierungsreaktion durchgeführt (SPP-Assay) in dem 1 µl pSSU in 15 µl Stroma für 15 min bei 25 °C und 20 mM Hepes/KOH pH 8 inkubiert wurden. TL: 10 % des eingesetzten Translationsproduktes, M1: psTic110ΔN, P: Präzipitat, SN: Überstand.

B. Schematische Darstellung des Imports und der Prozessierung von pSSU. M1: psTic110ΔN

Im Überstand (SN) wurde ebenfalls eine Bande des matures Proteins mSSU gefunden. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass psTic110ΔN sowohl „right side out“, als auch „wrong side out“ in die Liposomen rekonstituiert wurde, was bedeutet, dass pSSU auch aus den Proteoliposomen heraus transloziert werden kann. Eine andere Möglichkeit wäre, dass sich Reste des eingeschlossenen Stomas außerhalb der Lipidvesikel befinden und somit außerhalb der Proteoliposomen das Vorstufenprotein prozessiert werden kann.

Die Translokation von Vorstufenproteinen durch Tic110 sollte nun genauer untersucht werden. Deshalb wurden nun Liposomen mit oder ohne eingeschlossenes Stroma erstellt, in welche dann anschließend psTic110ΔN rekonstituiert wurde oder nicht (Abbildung 27).

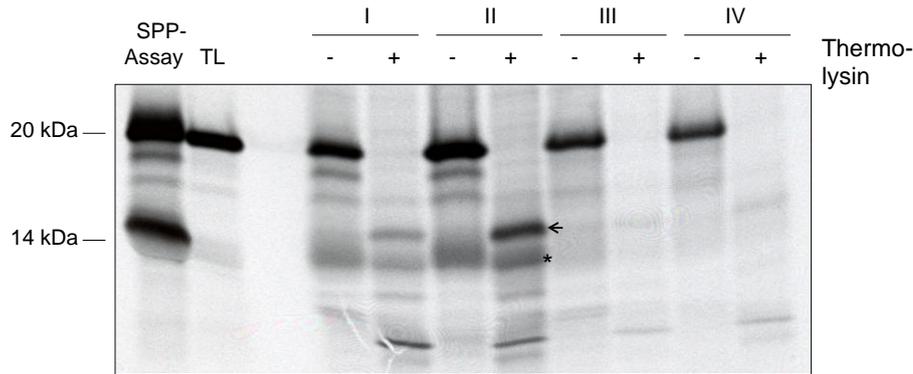


Abbildung 27: Import und Prozessierung von pSSU in psTic110 Δ N-Proteoliposomen (II)

I) und II) Liposomen enthalten Stroma, 3 mM ATP und 0,5 mM MgCl₂. III) und IV) Liposomen enthalten 20 mM HEPES pH 8, 3 mM ATP und 0,5 mM MgCl₂. In die Liposomen der Spuren II) und III) wurde psTic110 Δ N rekonstituiert. Das Protein pSSU wurde mit den Liposomen und Proteoliposomen für 15 min bei 25 °C inkubiert und anschließend ohne oder mit 1 μ g Thermolysin für 2 min bei 25 °C behandelt. Das Vorstufenprotein pSSU (Bande bei 20 kDa) wurde durch die stromale Prozessierungs Peptidase (SPP) zum murenen SSU (Bande bei 14 kDa). Zur Kontrolle wurde eine stromale Prozessierungsreaktion durchgeführt (SPP-Assay) in dem 1 μ l pSSU in 15 μ l Stroma für 15 min bei 25 °C und 20 mM HEPES/KOH pH 8 inkubiert wurden. Autoradiographie; TL: 10 % des eingesetzten Translationsproduktes.

Das Vorstufenprotein pSSU wurde zu den Liposomen und den Proteoliposomen gegeben, für 15 min bei 25 °C inkubiert, und anschließend wurden die Proben ohne oder mit Thermolysin nachbehandelt. Die Liposomen und Proteoliposomen, sowie in diese transportiertes Protein wurden mittels Zentrifugation vom Überstand getrennt. Um eine bessere Trennung der Proteine zu erhalten wurden die Präzipitate mittels eines Tricine-Gels ausgewertet. Es ist deutlich zu erkennen, dass das Vorstufenprotein, welches in Proteoliposomen mit eingeschlossenem Stroma importiert wurde nicht nur zu maturem Protein prozessiert wurde (Stern Abbildung 27 II), sondern auch, dass es Protease-resistent in einem Kanal integriert wurde (Pfeil Abbildung 27 II). Weder eine Prozessierung zum maturen Protein, noch eine Protease-resistente Bande konnte in den Spuren III (ohne Stroma, mit rekonstituiertem psTic110 Δ N) und IV (ohne Stroma, ohne rekonstituiertem psTic110 Δ N) der Abbildung 27 detektiert werden. Lediglich in Spur I (mit Stroma, ohne rekonstituiertem psTic110 Δ N) kann eine schwache Prozessierung und vor Protease-geschützte Bande erkannt werden. Allerdings ist die Effizienz in Spur II deutlich erhöht.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass es sich bei Tic110 um einen Proteintranslokationskanal handelt, der jedoch einige Komponenten des Stromas benötigt um eine vollständige Translokation zu gewährleisten.

Proteine verwendet, die nach dem Import in der inneren Hüllmembran (HP36 und IEP37), im Stroma (Vipp1) oder in den Thylakoiden (OE33) lokalisiert sind (Abbildung 2). Alle Vorstufenproteine konnten erfolgreich in Chloroplasten importiert werden. Sie wurden nach dem Import zu maturen Proteinen prozessiert, was auf das Vorhandensein einer Stromalen Prozessierungspeptidase (SPP) hindeutet. Das Erkennungssignal entsprach dabei der vorhergesagten Größe (ChloroP), was darauf hindeutet, dass die SPP in *P. patens* die gleiche Erkennungssequenz besitzt wie in Gefäßpflanzen. Mit dem Vorstufenprotein Vipp1 wurde zusätzlich eine Kinetik durchgeführt (Abbildung 3), die ergab, dass im Vergleich zu *Pisum sativum* (*P. sativum*) das Protein in *P. patens* zwar langsamer, jedoch ebenfalls in Abhängigkeit von der Inkubationszeit importiert wird. Für die Translokation des untersuchten Proteins wurde ATP benötigt (Abbildung 4). Das ist ein Hinweis darauf, dass stromale Chaperone am Importprozess beteiligt sind. Zusammengefasst zeigen die Daten, dass der Import in *P. patens* wahrscheinlich über den Toc- und Tic-Komplex erfolgt, da die Proteine ein ähnliches Importverhalten wie in *P. sativum* aufweisen. Es wäre interessant in weiteren Studien die Importmaschinerien in *P. patens* zu analysieren. Offen bleibt die Frage nach der Beteiligung von Rezeptorproteinen (wie Toc159, Toc34 und Toc64). Besonders interessant wäre vor allem die Rolle von Toc64, da es sich erst mit der Entstehung der Grünalgen entwickelte. Ein weiterer Aspekt wäre die Frage nach den regulatorischen Komponenten in der inneren Hüllmembran, bzw. im Stroma. Tic62 mit der FNR-Bindedomäne hat sich erst in Landpflanzen entwickelt, Tic32, oder zumindest Mitglieder der SDR-Familie, sowie Tic55 dagegen sind bereits in *P. patens* vorhanden. In weiteren Studien sollte darauf eingegangen werden, ob Tic32 und Tic55 bereits in Moosen eine redox-regulatorische Funktion besitzen, oder ob sich diese erst mit den Landpflanzen entwickelt. In Chloroplasten von Landpflanzen wird die Redox-Regulierung durch Sauerstoff oder/und Licht beeinflusst. Der Redox-Status einer Pflanzenzelle regelt nicht nur Transkription und Translation, sondern nimmt auch Einfluss auf die Translokation von Importsubstraten (Chigri *et al.*, 2006; Hörmann *et al.*, 2004; Kuchler *et al.*, 2002; Stengel *et al.*, 2008). Es wäre möglich, dass eine Redox-Regulation erst mit Besiedlung des Landes nötig wurde. Das interessanteste an *P. patens* als Modellpflanze ist jedoch die Möglichkeit mittels homologer Rekombination auf das Genom Einfluss zu nehmen. So könnten in weiteren Studien nicht nur einzelne Gene ausgeknockt werden, es könnten auch Domänen oder sogar einzelne Aminosäuren ausgetauscht werden. Es wäre zum Beispiel möglich, über einen Austausch der FxxxWxxxF-Domäne des Translokationskanal der inneren Hüll-

membran Tic110 Rückschluss auf die Bedeutung dieser Domäne zu ziehen, oder durch Entfernung der konservierten Cysteine von Tic110 eine mögliche Reduktion im Proteinimport zu beobachten. Vor allem im Hinblick auf Gene, die als essentiell gelten, da sie bei einem knock out in *A. thaliana* lethal waren, könnten nun durch die gerichtete Mutation einzelner Domänen genauer untersucht werden.

6.1.2 In vitro Import und Insertion in die innere Hüllmembran von Chloroplasten von *Pisum sativum*

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde das Importverhalten von α -helikalen, hydrophoben Proteinen der inneren Hüllmembran der Chloroplasten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Translokation von Proteinen in die innere Hüllmembran ein komplexer Prozess ist, der hauptsächlich auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen kann: dem „conservative-sorting“ und dem „stop-transfer-Weg“ (Abbildung 29). Um das Importverhalten systematisch zu charakterisieren wurden anhand von Proteomstudien (Ferro *et al.*, 2002; Froehlich *et al.*, 2003; Rolland *et al.*, 2003), dem Vorhandensein eines Erkennungssignals (ChloroP), sowie guter Transkriptions- und Translationsraten *in vitro* (Firlej-Kwoka *et al.*, 2008) die drei Proteine HP28, HP36 und IEP37 ausgewählt. Für die Translokation der untersuchten Proteine in das Organell wurden lediglich 200 μ M ATP benötigt (Abbildung 5), der Import des stromalen Vorstufenproteins pSSU braucht jedoch mehr als 200 μ M ATP (Friedman und Keegstra, 1989; Inoue und Akita, 2008; Waegemann und Soll, 1995). Dies lässt vermuten, dass die Proteine nicht vollständig in das Stroma gelangen. Da die untersuchten Proteine jedoch ein Erkennungssignal haben, welches während des Importprozesses prozessiert wurde, liegt die Vermutung nahe, dass der N-Terminus der Proteine in das Stroma hineinragt, wo die Prozessierung mittels SPP stattfindet. Außerdem scheinen die in dieser Arbeit untersuchten Proteine kein lösliches Intermediat zu besitzen (Abbildung 7), sondern höchstwahrscheinlich direkt von dem Translokationskanal in die innere Hüllmembran integriert zu werden.

Auch in Hefemitochondrien, welche ebenfalls einen Großteil ihrer Proteine posttranslational aus dem Zytosol über Translokationsmaschinerien importieren, konnte gezeigt werden, dass der Import in die innere Hüllmembran nicht nur über einen Weg erfolgen kann. Die äußere Hüllmembran enthält den Tom-Komplex, der für die Translokation von nahezu allen Proteinen der Mitochondrien verantwortlich ist (Neupert und Herrmann,

2007). Die Importwege teilen sich allerdings darauffolgend im Intermembranraum: der Sam-Komplex vermittelt die Insertion von β -barrel Proteinen und manchen α -helikalen Tom-Komponenten in die äußere Hüllmembran (Otera *et al.*, 2007), während Mia40 und Erv1 für den Import und die Faltung von kleinen Intermembranraum Komponenten verantwortlich sind. Die innere Hüllmembran besitzt für den Import von Matrixproteinen und Proteinen der inneren Hüllmembran zwei Tim-Translokationsmaschinerien: den Tim22- und den Tim23-Komplex (Neupert und Herrmann, 2007). Proteine der inneren Hüllmembran mit mehreren Transmembrandomänen und Proteine mit oder ohne Signalpeptid, wie z.B. die mitochondrielle Carrier Familie, werden mittels des Tim22 Komplexes inseriert. Die physiko-chemischen Eigenschaften Transmembrandomänen, sowie die Ladung der Aminosäuren dieser Proteine sind für die Zielsteuerung der Proteine zu dem Tim22-Weg verantwortlich. Im Gegensatz dazu ist Tim23 für die Translokation von zwei verschiedenen Proteingruppen verantwortlich: (I) Proteine der Matrix mit Signalpeptid, (II) Proteine der inneren Hüllmembran mit Signalpeptid oder mit einer einzelnen Transmembranhelix (Neupert und Herrmann, 2007). Dabei dient die Transmembrandomäne als hydrophobes Sortierungssignal, was dazu führt, dass das Protein auf Höhe des Translokons lateral in die innere Hüllmembran inseriert wird. In Chloroplasten wurden bisher noch keine unterschiedlichen Subkomplexe in der inneren Hüllmembran entdeckt. Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit und ihres bakteriellen Ursprungs könnte man jedoch von einem entsprechenden Importmechanismus für Proteine der inneren Hüllmembran ausgehen. Die untersuchten Proteine weisen allerdings gemischte Eigenschaften auf: auf der einen Seite besitzen sie ein Erkennungssignal, ähnlich dem der Tim23 Import-Substrate, während sie auf der anderen Seite hydrophob sind und ihre vorhergesagte Struktur in der inneren Hüllmembran α -helikal ist, was eine Ähnlichkeit zu den Import-Substraten des Tim22-Weges darstellt. Deshalb ist eine klare Trennung in zwei Importwege nicht möglich. Vielmehr scheint es, als ob Chloroplasten einer Vielzahl an Importwegen besitzen. Eine interessante Aufgabe ist es in Zukunft zu untersuchen, wie Chloroplasten ihre Proteine der inneren Hüllmembran zu ihren verschiedenen Importwegen leiten. Da ein typisches chloroplastidäres Erkennungssignal vorhanden ist, sind wahrscheinlich Teile des Toc-Translocons am Import beteiligt. Durch eine Thermolysin-Vorbehandlung der Chloroplasten wurden die Rezeptorproteine der äußeren Hüllmembran entfernt. Beim anschließenden Import der Proteine konnte keine Translokation in Chloroplasten detektiert werden (Abbildung 8). Zudem wurde in

weiteren Studien eine Konkurrenz des Imports mit überexprimierten pOE33 durchgeführt. Dabei wird der Toc75-Kanal des Toc-Komplexes durch pOE33 blockiert, wodurch eine Translokation für Vorstufenproteine durch Toc75 gehemmt wird. Die Proteine pHP28, pHP36 und pLEP37 konnten unter diesen Bedingungen nicht importiert werden, was auf die Beteiligung des Toc-Komplexes an der Translokation hindeutet (Firlej-Kwoka *et al.*, 2008). Aus der aktuellen Literatur und den Daten dieser Arbeit erschließt sich eine große Diversität an Importwegen in die innere Hüllmembran (Abbildung 29): (1) Tic32 und QORH können ohne Energieverbrauch und die Hilfe von Komponenten des Toc- oder Tic-Komplexes in die Chloroplasten importiert werden (Miras *et al.*, 2002; Nada und Soll, 2004). (2) Tic110 hat ein typisches chloroplastidäres Erkennungssignal und wird über den „conservative-sorting“-Importweg über Toc und Tic in die Chloroplasten importiert. Das Erkennungssignal wird im Stroma durch die SPP abgetrennt und das lösliche mature Protein wird dann mit der Hilfe von Hsp93 zur inneren Hüllmembran gebracht (Lübeck *et al.*, 1997; Vojta *et al.*, 2007), während (3) Tic40 nicht nur ein lösliches Intermediat im Stroma hat, sondern auch zweimal prozessiert wird (Li und Schnell, 2006; Tripp *et al.*, 2007). (4) Die in dieser Arbeit untersuchten Proteine werden über Toc zu Tic transportiert. Während die Proteine auf Höhe des Tic-Komplexes stagnieren, ragt der N-Terminus ins Stroma, wo das Erkennungssignal von der SPP prozessiert wird. Das Importsubstrat wird lateral in die innere Hüllmembran inseriert. (5) Eine andere Klasse von Proteinen der inneren Hüllmembran besitzt ein zweigeteiltes Erkennungssignal. Sie werden ebenfalls über Toc zu Tic transportiert, der N-Terminus wird zweimal geschnitten und anschließend werden sie lateral in die innere Hüllmembran inseriert (Firlej-Kwoka *et al.*, 2008).

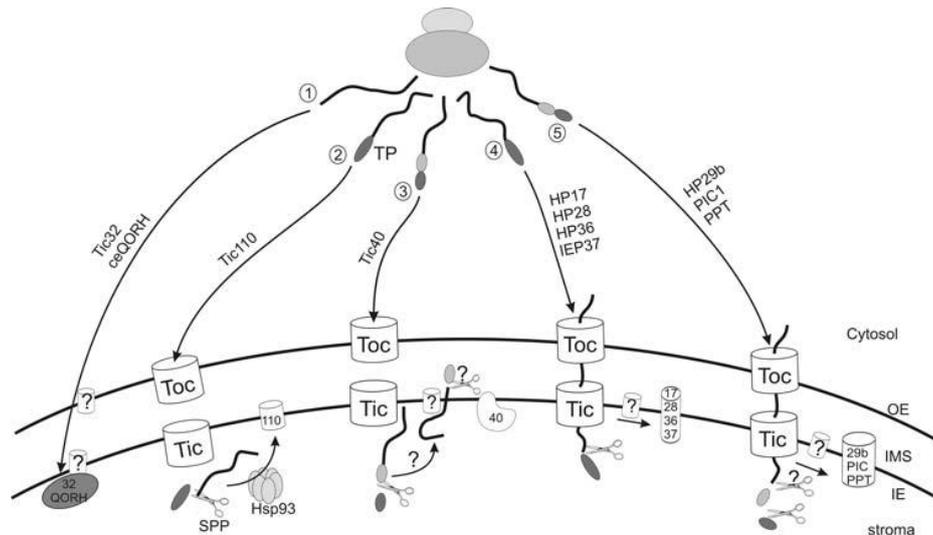


Abbildung 29: Verschiedene Wege des Imports in die innere Hüllmembran von Chloroplasten (Firlej-Kwoka et al., 2008):

Fünf Proteinklassen sind bekannt, die verschiedenen Wege in die innere Hüllmembran von Chloroplasten folgen. Erläuterungen: siehe Text. 32 = Tic32; 110 = Tic110; 40 = Tic40; 17, 28, 36, 37 = HP17, HP28, HP36, IEP37; 29b = HP29b

Ausgehend von den unterschiedlichen Importwegen von Proteinen der inneren Hüllmembran von Chloroplasten wäre es in Zukunft interessant zu untersuchen, ob zwei getrennte Translokationskomplexe in der inneren Hüllmembran existieren, ob die Tic-Komponenten unterschiedlich assembliert werden, oder ob hydrophobe Membranproteine generell einen anderen, bislang unentdeckten Importweg in die Membran nutzen.

6.1.3 Lokalisierung von DJ-1c in *Pisum sativum*

Eine Mutation oder eine Fehlfaltung im Protein Parkinson Disease 7 (PARK7), auch bekannt unter dem Namen DJ-1, wird als Ursache für eine autosomal rezessive Form der Parkinson-Erkrankung gesehen (Bonifati et al., 2003). Umstritten ist die Lokalisation von DJ-1 in der Zelle. Während in der Literatur eine Co-Lokalisation von DJ-1 mit Mitochondrien beschrieben wurde (Canet-Avilés et al., 2004; Zhang et al., 2005), konnte kürzlich mittels Immunofluoreszenzstudien gezeigt werden, dass DJ-1 im Zytoplasma der Zellen lokalisiert ist, jedoch keinerlei Co-Lokalisation zu Mitochondrien besteht (Goerner, 2006). Drei Homologe des Proteins DJ-1 wurden in *A. thaliana* identifiziert (DJ-1a, DJ-1b, DJ-1c). In dieser Arbeit wurde die intrazelluläre Lokalisation von DJ-1c untersucht. Über die Funktion von At4g34020 (DJ-1c) in Pflanzen ist bislang nichts bekannt.

Da DJ-1c ein typisch plastidäres Erkennungssignal (ChloroP und TargetP) am N-Terminus besitzt, wurde zunächst überprüft, ob DJ-1c in Chloroplasten oder Mitochondrien importiert werden kann (Abbildung 11). Es zeigte sich eindeutig, dass es sich bei DJ-1c um ein chloroplastidäres Protein handelt. Das beim Import prozessierte Erkennungssignal entspricht der vorhergesagten Größe. In weiteren Experimenten konnte das Protein etwa zu gleichen Teilen als membrangebundenes und lösliches Protein detektiert werden (Abbildung 12). Da DJ-1c während des Imports durch die Membranen transportiert wird, ist es möglich, dass es sich bei dem membrangebundenen Proteinanteil jedoch um gerade transportiertes Protein handelt. Dieses Verhalten könnte außerdem durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der Membran erklärt werden. Auch andere stromale Proteine, wie zum Beispiel SSU weisen diese Eigenschaft auf. Deshalb wurden nach der Subfraktionierung die membrangebundenen Proteine mit Harnstoff extrahiert, wodurch sich DJ-1c teilweise, jedoch nicht vollständig von der Membran lösen ließ (Abbildung 12). Zur genaueren Untersuchung wurde nun nach dem Import von DJ-1c in isolierte *P. sativum* Chloroplasten eine Trennung der Chloroplastenkompartimente vorgenommen (Abbildung 13). Das Protein ließ sich zwar noch zu geringen Teilen in der inneren Hüllmembran detektieren, jedoch befand es sich größtenteils im Stroma. Laut Vorhersageprogramm Aramemnon (www.aramemnon.botanik.uni-koeln.de/) ist die Existenz von Transmembrandomänen unwahrscheinlich. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass Dj-1c im Stroma lokalisiert ist. Über seine Funktion ist noch nichts bekannt. Bei dem humanen Homolog handelt es sich um ein H₂O₂-sensitives Protein, welches ein Sensormolekül für oxidativen Stress darstellt (Blackinton *et al.*, 2005; Mitumoto und Nakagawa, 2001), sowie um einen Regulator verschiedenster Zellvorgänge (Yokota *et al.*, 2003). Auch für das pflanzliche Homolog DJ-1a konnte bereits gezeigt werden, dass es sich um ein Sensor für oxidativen Stress handelt (Xu *et al.*, 2010), weshalb die Vermutung nahe liegt, dass DJ-1c im Stroma der Pflanzen eine ähnliche Rolle erfüllt. DJ-1c könnte beispielsweise an der Regulation der „Reactive Oxygen Species“ (ROS) beteiligt sein. Nicht nur für den reibungslosen Ablauf der Elektronentransportkette, welche in einer aeroben Umgebung stattfindet, sondern auch für den permanenten Abbau von ROS, sind regulatorische Systeme für die Minimierung der ROS Produktion notwendig. Aufgrund der Homologie von Dj-1c zu dem humanen DJ-1 ist die Aufklärung der Funktion von Dj-1c besonders interessant, da evt. Rückschlüsse auf die Funktion des humanen DJ-1 geschlossen werden können.

6.2 Struktur von Tic110

Über die Struktur von Tic110 wurde in den letzten Jahren kontrovers diskutiert. Während zwei unterschiedliche Modelle über die Topologie des C-terminalen Teils von Tic110 postuliert wurden, war die Struktur des hydrophoben N-terminalen Teils von Tic110 unumstritten. Dieser Teil enthält zwei hydrophobe Transmembrandomänen und wichtige Informationen für die Integration von Tic110 in die innere Hüllmembran (Lübeck *et al.*, 1996). In dieser Arbeit wurde die Struktur und Funktion des N-Terminus von Tic110 (Aminosäuren (AS) 1-235 der *P. sativum*-Sequenz, im Folgenden 110N genannt) näher untersucht. 110N umfasst nicht nur die ersten beiden hydrophoben Transmembrandomänen, sondern auch die erste amphipatische Helix von Tic110 (Abbildung 14). Es wurde gezeigt, dass 110N für die Steuerung von Tic110 zur inneren Hüllmembran ausreichend ist (Lübeck *et al.*, 1996). Zudem beinhaltet 110N eine hoch konservierte Region (Abbildung 15) am Ende der ersten amphipatischen Helix (AS 228 und 234). Diese Region beinhaltet 3 aromatische Aminosäuren, zwei Phenylalanine (F) und ein Tryptophan (W) in der Abfolge FxxxWxxxF. Da es sich bei diesen Aminosäuren um unpolare, ungeladene, hydrophobe Aminosäuren handelt, die oft an hydrophoben Interaktionen beteiligt sind, können sie für viele Interaktionen zwischen Proteinen und Lipiden, einschließlich der Insertion von Proteinen in Membranen verantwortlich sein (White, 2007; White und von Heijne, 2005; White und Wimley, 1999). Die Funktion dieser hoch konservierten Region sollte in dieser Arbeit mittels Mutagenese genauer untersucht werden (Abbildung 16). Um die biochemischen Eigenschaften möglichst ähnlich zu halten, wurden die Aminosäuren Phenylalanin (F) und Tryptophan (W) durch die Aminosäuren Leucin (L) und Isoleucin (I) ersetzt. Zum Anderen wurden die beiden Aminosäuren durch Glycin (G) und Serin (S) substituiert, da sie sehr klein und nicht hydrophob sind und somit einen großen Unterschied zu den aromatischen Aminosäuren darstellen. Importexperimente mit anschließender Subfraktionierung zeigten, dass das Konstrukt tpSSU-110N-mSSU (mit der FxxxWxxxF Domäne) zum größten Teil in der membrangebundenen Fraktion gefunden werden konnte, während die Konstrukte mit den mutierten Aminosäuren hauptsächlich in der löslichen Fraktion detektiert werden konnten. Das deutet darauf hin, dass die Proteine zwar in die innere Hüllmembran transloziert werden, ihre Verankerung in der Membran aber durch den Austausch der konservierten Region verlangsamt wurde. Weitere Experimente, in denen die Konstrukte in Liposomen rekonstituiert wurden, machten deutlich, dass die FxxxWxxxF-Domäne

für die stabile Integration von Tic110 in die Membranen benötigt wird (Abbildung 13). Die Region FxxxWxxxF scheint somit eine Rolle bei der Integration der Proteine in die Lipide zu spielen. Durch die Mutation der Region FxxxWxxxF könnte nicht nur die Stabilität der Verankerung in der inneren Hüllmembran, sondern auch die Topologie der Konstrukte verändert werden. Bei fehlerhafter Insertion würde die erste amphipatische Helix somit in das Stroma der Chloroplasten ragen. Dies konnte auch mittels Proteasebehandlungen von sowohl Chloroplasten nach erfolgtem Import der Konstrukte, als auch von Proteoliposomen bestätigt werden (Abbildung 17, Abbildung 18, Abbildung 20).

In einer früheren Studie wurde der N-Terminus von Tic110 (AS 1-235) in zwei Teile geteilt (Lübeck *et al.*, 1997). Zunächst wurden die AS 1-111 (N1) mit den zwei hydrophoben Transmembrandomänen, anschließend die AS 112-235 (N2) mit der ersten amphipatischen Helix von Tic110 auf ihre Zielsteuerung in die innere Hüllmembran von Chloroplasten untersucht (Übersicht über Nomenklatur: Abbildung 30). Dabei konnte gezeigt werden, dass N1 zwar für die Steuerung in die innere Hüllmembran ausreichend ist, jedoch nur etwa 10 % des translozierten Proteins stabil in der Membran verankert waren. N2 alleine konnte nicht in die innere Hüllmembran inseriert werden. Wurde jedoch ein Konstrukt aus N1 und N2 importiert, wurde nahezu das ganze Protein stabil in die Membran inseriert.

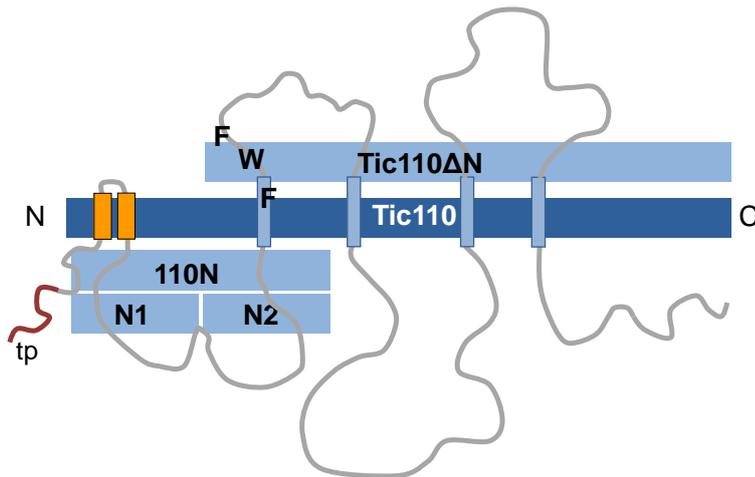


Abbildung 30: Übersicht über die Nomenklatur der einzelnen Regionen von Tic110 aus *P. sativum*: 110N beinhaltet die Aminosäuren (AS) 1-235, mit den zwei hydrophoben Transmembrandomänen, sowie der ersten amphipatischen Helix, mit der Region FxxxWxxxF; N1 enthält AS 1-111, mit den zwei hydrophoben Transmembrandomänen; N2 umfasst AS 112-235 mit der ersten amphipatischen Transmembrandomäne und der Region FxxxWxxxF (Lübeck *et al.*, 1997); Tic110ΔN besteht aus AS 96-959, was bedeutet, dass das Konstrukt die zwei hydrophoben Transmembrandomänen nicht enthält (Balsera *et al.*, 2009).

Die Autoren interpretierten ihre Ergebnisse dahingehend, dass N2, welches die FxxxWxxxF-Domäne enthält, gemeinsam mit N1 die Integration in die innere Hüllmembran erhöht. Zusammen mit den Daten dieser Arbeit deutet alles darauf hin, dass N1 tatsächlich für die Zielsteuerung verantwortlich ist, die Verankerung und Festigung von Tic110 in der Membran jedoch auf die FxxxWxxxF-Domäne in N2 zurückzuführen ist. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die FxxxWxxxF-Domäne bei der Topologie von Tic110 eine entscheidende Rolle spielt. Untermauert wird diese Hypothese von den Kenntnissen, dass diese Domäne in fast allen Landpflanzen konserviert ist (Abbildung 15) und aromatischen Aminosäuren für die Interaktion mit Lipiden von großer Bedeutung sind (White, 2007; White und von Heijne, 2005; White und Wimley, 1999).

6.3 Funktion von Tic110

Die Zusammensetzung und Stöchiometrie des Tic-Komplexes, sowie die Funktion der einzelnen Komponenten sind bis heute nicht vollständig geklärt. Tic110 und Tic20 wurden beide als putativer Translokationskanal beschrieben (Chen *et al.*, 2002; Heins *et*

al., 2002; Lübeck *et al.*, 1997). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Tic110 Vorstufenproteine binden kann und anschließend in der Lage ist diese zu translozieren. Dafür müsste ein System entwickelt werden, das es erlaubt, die Translokation Schritt für Schritt zu verfolgen und mögliche Komponenten der Translokation beliebig hinzuzufügen oder zu entfernen. Zunächst wurde psTic110ΔN in Liposomen rekonstituiert um zu untersuchen, ob Tic110 in der Lage ist, Vorstufenprotein zu binden. Das Vorstufenprotein pSSU assoziierte mit den Proteoliposomen und konnte auch durch hohe Ionenkonzentration nicht entfernt werden (Abbildung 25). Diese Beobachtung wird dadurch gestützt, dass in der Literatur ebenfalls eine Bindung von Tic110 zu Vorstufenproteinen beschrieben wird (Lübeck *et al.*, 1996; Nielsen *et al.*, 1997). Es sollte jedoch nicht nur gezeigt werden, dass Tic110 Vorstufenproteine binden kann, sondern auch, dass Tic110 in der Lage ist diese zu translozieren. Dazu wurde psTic110ΔN in Liposomen rekonstituiert, in welche bereits Stroma eingeschlossen wurde. Anschließend wurde Vorstufenprotein zu den Proteoliposomen gegeben. Deutlich sichtbar ist eine Bande der Größe des maturen Proteins innerhalb der Proteoliposomen, was bedeutet, dass pSSU in die Proteoliposomen importiert und anschließend prozessiert wurde (Abbildung 26). Das mature Protein SSU ist auch durch eine anschließende Behandlung mit der Protease Thermolysin nicht abbaubar, weshalb anzunehmen ist, dass das Protein vollständig in die Liposomen transloziert wurde und sich innerhalb der Liposomen befindet. Da bei der Rekonstitution von psTic110ΔN das Protein in zwei Orientierungen in einem Verhältnis von etwa 1:1 (Goetze, 2009) in Liposomen inserieren kann, ergibt sich daraus die Möglichkeit, dass das Vorstufenprotein nicht nur in die Proteoliposomen hinein, sondern auch hinaus transloziert werden kann. Das könnte das prozessierte mSSU außerhalb der Proteoliposomen erklären. Zudem wäre es denkbar, dass nicht entferntes Stroma im Überstand in der Lage war, das Vorstufenprotein zu prozessieren. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Tic110 in Zusammenarbeit mit den Komponenten des Stomas in der Lage ist, Vorstufenprotein in den Translokationskanal aufzunehmen, wodurch es vor dem Abbau durch die Protease Thermolysin geschützt wird (Abbildung 27 II, Pfeil). Man kann deutlich erkennen, dass pSSU gerade durch den Translokationskanal hindurch transportiert wird, da es erst nach der Behandlung mit der Protease Thermolysin entsteht. Zusammengefasst machen die Daten deutlich, dass Tic110 nicht nur in der Lage ist, Vorstufenproteine zu binden, sondern dass es auch in der Lage ist diese vollständig zu translozieren, was bislang nicht gezeigt werden konnte. Mit dem System des rekonstituierten aktiven Proteins kann nun nicht nur die Trans-

lokation von Vorstufenproteinen, sondern auch die Regulation, sowie das Zusammenspiel mit verschiedenen Komponenten des Tic-Komplexes und des Stromas ausführlich untersucht werden.

7 Literatur:

- Arnon D** (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* 42-45
- Balsera M, Goetze TA, Kovács-Bogdán E, Schürmann P, Wagner R, Buchanan BB, Soll J, Bölter B** (2009) Characterization of Tic110, a channel-forming protein at the inner envelope membrane of chloroplasts, unveils a response to Ca²⁺ and a stromal regulatory disulfide bridge. *J. Biol. Chem.* 284: 2603-2616
- Balsera M, Stengel A, Soll J, Bölter B** (2007) Tic62: a protein family from metabolism to protein translocation. *BMC. Evol. Biol.* 7: 43-
- Bartsch S, Monnet J, Selbach K, Quigley F, Gray J, von Wettstein D, Reinbothe S, Reinbothe C** (2008) Three thioredoxin targets in the inner envelope membrane of chloroplasts function in protein import and chlorophyll metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 105: 4933-4938
- Becker T, Hritz J, Vogel M, Caliebe A, Bukau B, Soll J, Schleiff E** (2004a) Toc12, a novel subunit of the intermembrane space preprotein translocator of chloroplasts. *Mol. Biol. Cell* 15: 5130-5144
- Becker T, Jelic M, Vojta A, Radunz A, Soll J, Schleiff E** (2004b) Preprotein recognition by the Toc complex. *EMBO J.* 23: 520-530
- Blackinton J, Ahmad R, Miller DW, van der Brug MP, Canet-Avilés RM, Haque SM, Kaleem M, Cookson MR** (2005) Effects of DJ-1 mutations and polymorphism on protein stability and subcellular localisation. *Brain Res Mol Brain Res.* 24: 76-83
- Bölter B, Soll J, Hill K, Hemmler R, Wagner R** (1999) A rectifying ATP-regulated solute channel in the chloroplastic outer envelope from pea. *EMBO J.* 18: 5505-5516
- Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Oostra BA, Heutink P** (2003) Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299: 256-259
- Caliebe A, Grimm R, Kaiser G, Lubeck J, Soll J, Heins L** (1997) The chloroplastic protein import machinery contains a Rieske-type iron-sulfur cluster and a mononuclear iron-binding protein. *EMBO J.* 16: 7342-7350
- Canet-Avilés RM, Wilson MA, Miller DW, Ahmad R, McLendon C, Bandyopadhyay S, Baptista MJ, Ringe D, Petsko GA, Cookson MR** (2004) The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101: 9103-9108
- Chen X, Smith MD, Fitzpatrick L, Schnell DJ** (2002) In vivo analysis of the role of at-Tic20 in protein import into chloroplasts. *Plant Cell* 14: 641-654

- Chigri F, Hormann F, Stamp A, Stammers DK, Bölter B, Soll J, Vothknecht UC** (2006) Calcium regulation of chloroplast protein translocation is mediated by calmodulin binding to Tic32. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103: 16051-16056
- Chigri F, Soll J, Vothknecht UC** (2005) Calcium regulation of chloroplast protein import. *Plant J.* 42: 821-831
- Chou ML, Fitzpatrick L, Tu SL, Budziszewski G, Potter-Lewis S, Akita M, Lewin JZ, Keegstra K** (2003) Tic40, a membrane-anchored co-chaperone homolog in the chloroplast protein translocon. *EMBO J.* 22: 2970-2980
- Cline K, Henry R** (1996) Import and routing of nucleus-encoded chloroplast proteins. *Annu.Rev.Cell.Dev.Biol.* 12: 1-26
- Cline K, Werner-Washbourne M, Lubbe TH, Keegstra K** (1985) Precursors to two nuclear-encoded chloroplast proteins bind to the outer envelope membrane before being imported into the chloroplasts. *J.Biol.Chem.* 260: 3691-3696
- Cove DJ, Knight CD, Lamparter TL** (1997) Mosses as model system. *Trends in Plant Science* 2: 99-105
- Ding H, Hidalgo E, Demple B** (1996) The redox-state of the [2Fe-2S] clusters in SoxR protein regulates its activity as a transcription factor. *J.Biol.Chem.* 271: 33173-33175
- Fellerer C, Schweiger R, Schöngruber K, Soll J, Schwenkert S** (2011) Cytosolic Hsp90 Cochaperones HOP and FKBP interact with freshly synthesized chloroplast preprotein in Arabidopsis. *Mol.Plant* 1-13
- Ferro M, Salvi D, Riviere-Rolland H, Vermat T, Seigneurin-Berny D, Grunwald D, Garin J, Joyard J, Rolland N** (2002) Integral membrane proteins of the chloroplast envelope: Identification and subcellular localization of new transporters. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99: 11487-11492
- Ferro M, Salvi D, Brugiere S, Miras S, Kowalski S, Louwagie M** (2011) Proteomics of the chloroplast envelope membranes from *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cell Proteomics* 2: 325-345
- Firlej-Kwoka E, Strittmatter P, Soll J, Bölter B** (2008) Import of preproteins into the chloroplast inner envelope membrane. *Plant Mol.Biol.* 68: 505-519
- Flügge UI, Hinz G** (1986) Energy dependence of protein translocation into chloroplasts. *Eur.J.Biochem.* 160: 563-570
- Friedman A, Keegstra K** (1989) Chloroplast protein import. *Plant Physiol* 89: 993-999
- Froehlich JE, Wilkerson CG, Ray WK, McAndrew, Osteryoung KW, Gage DA, Phinney BS** (2003) Proteomic study of the *Arabidopsis thaliana* chloroplast envelope membrane utilizing alternatives to traditional two-dimensional electrophoresis. *J.Proteome Research* 2: 413-425

- Frydman J, Hohfeld J** (1997) Chaperones get in touch: the Hip-Hop connection. *Trends Biochem.Sci.* 22: 87-92
- Goerner K** (2006) Strukturelle und Funktionelle Untersuchungen des PARK7 Parkinsonsprodukts DJ-1. *Dissertation LMU Chemie und Pharmazie*
- Goetze TA** (2009) Identifikation und Charakterisierung von porenbildenden Proteinen der inneren Chloroplastenmembran. *Dissertation Universität Osnabrück*
- Gutensohn M, Fan E, Frielingsdorf S, Hanner P, Hou B, Hust B, Klösgen RB** (2006) Toc, Tic, Tat et al.: structure and function of protein transport machinery in chloroplasts. *J.Plant Physiol.* 163: 333-345
- Hanahan D** (1985) Techniques for transformation of E. coli. *DNA cloning I, a practical approach* 109-135
- Heins L, Mehrle A, Hemmler R, Wagner R, Kuchler M, Hörmann F, Sveshnikov D, Soll J** (2002) The preprotein conducting channel at the inner envelope membrane of plastids. *EMBO J.* 21: 2616-2625
- Hinnah SC, Wagner R, Sveshnikova N, Harrer R, Soll J** (2002) The chloroplast protein import channel Toc75: pore properties and interaction with transit peptides. *Biophys.J.* 83: 899-911
- Hirsch S, Muckel E, Heemeyer F, von Heijne G, Soll J** (1994) A receptor component of the chloroplast protein translocation machinery. *Science* 266: 1989-1992
- Hohe A, Decker EL, Gorr G, Schween G, Reski R** (2002) Tight control of growth and cell differentiation photoautotrophically growing moss *Physcomitrella patens* bio-reactor cultures. *Plant Cell Reports* 20: 1135-1140
- Hörmann F, Kuchler M, Sveshnikov D, Oppermann U, Li Y, Soll J** (2004) Tic32, an essential component in chloroplast biogenesis. *J.Biol.Chem.* 279: 34756-34762
- Inaba T, Alvarez-Huerta M, Li M, Bauer J, Ewers C, Kessler F, Schnell DJ** (2005) Arabidopsis tic110 is essential for the assembly and function of the protein import machinery of plastids. *Plant Cell* 17: 1482-1496
- Inaba T, Li M, Alvarez-Huerta M, Kessler F, Schnell DJ** (2003) atTic110 functions as a scaffold for coordinating the stromal events of protein import into chloroplasts. *J.Biol.Chem.* 278: 38617-38627
- Inoue K, Akita M** (2008) Three sets of intermediates are formed during the early stage of protein import into chloroplasts. *J.Biol.Chem.* 283: 7491-7502
- Kalanon M, McFadden GI** (2008) The chloroplast protein translocation complexes of *Chlamydomonas reinhardtii*: a bioinformatic comparison of Toc and Tic components in plants, green algae and red algae. *Genetics* 179: 95-112
- Keegstra K, Cline K** (1999) Protein import and routing systems of chloroplasts. *Plant Cell* 11: 557-570

- Kessler F, Blobel G** (1996) Interaction of the protein import and folding machineries of the chloroplast. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93: 7684-7689
- Kessler F, Blobel G, Patel HA, Schnell DJ** (1994) Identification of two GTP-binding proteins in the chloroplast import machinery. *Science* 266: 1035-1039
- Kovacheva S, Bedard J, Patel R, Dudley P, Twell D, Rios G, Koncz C, Jarvis P** (2007) In vivo studies on the roles of Tic110, Tic40 and Hsp93 during chloroplast protein import. *J.Biol.Chem.* 282: 21404-21414
- Küchler M, Decker S, Hörmann F, Soll J, Heins L** (2002) Protein import into chloroplasts involves redox-regulated proteins. *EMBO J.* 21: 6136-6145
- Kyhse-Anderson J** (1984) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose: simple and efficient method for immunoblotting. *Methods* 203-209
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lamb JR, Tegenreich S, Hieter P** (1995) Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *Trends Biochem.Sci.* 20: 257-259
- Leister D** (2003) Chloroplast research in the genomic age. *Trends Genet.* 19: 47-56
- Li HM, Chen LJ** (1996) Protein targeting and integration signal for the chloroplastic outer envelope membrane. *Plant Cell* 8: 2117-2126
- Li M, Schnell DJ** (2006) Reconstitution of protein targeting into the inner envelope membrane of chloroplasts. *J Cell Biol* 175: 249-259
- Lübeck J, Heins L, Soll J** (1997) A nuclear-coded chloroplastic inner envelope membrane protein uses a soluble sorting intermediate upon import into the organelle. *J.Cell Biol.* 137: 1279-1286
- Lübeck J, Soll J, Akita M, Nielsen E, Keegstra K** (1996) Topology of IEP110, a component of the chloroplastic protein import machinery present in the inner envelope membrane. *EMBO J.* 15: 4230-4238
- Margulis L** (1970) Origin of eukaryotic cells. *New Haven, CT, USA: Yale University Press*
- Martin T, Sharma R, Sippel C, Waegemann K, Soll J, Vothknecht UC** (2006) A protein kinase family in Arabidopsis phosphorylates chloroplast precursor proteins. *J.Biol.Chem.* 281: 40216-40223
- May T, 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, Rolland N** (2002) Non canonical transit peptide for import into the chloroplast. *J.Biol.Chem.* 277: 47770-47778

- Miras S, Salvi D, Piette L, Seigneurin-Berny D, Grunwald D, Reinbothe C, Joyard J, Reinbothe S, Rolland N** (2007) TOC159- and TOC75- independent import of a transit sequence-less precursor into the inner envelope of chloroplasts. *J.Biol.Chem.* 282: 29482-29492
- Mitsumoto A, Nakagawa Y** (2001) DJ-1 is an indicator for endogenous reactive oxygen species elicited by endotoxin. *Free Radic Res.* 35: 885-893
- Nada A, Soll J** (2004) Inner envelope protein 32 is imported into chloroplasts by a novel pathway. *J.Cell Sci.* 117: 3975-3982
- Neupert W, Herrmann JM** (2007) Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76: 723-749
- Nielsen E, Akita M, Dávila-Aponte JA, Keegstra K** (1997) Stable association of chloroplastic precursor with protein translocation complexes that contain proteins from both envelope membranes and a stromal Hsp100 molecular chaperone. *EMBO J.* 16: 935-946
- Otera H, Taira Y, Horie C, Suzuki Y, Suzuki H, Setoguchi K** (2007) A novel insertion pathway for mitochondrial outer membrane proteins with multiple transmembrane segments. *J Cell Biol* 179: 1355-1363
- Pohlmeyer K, Soll J, Grimm R, Hill K, Wagner R** (1998) A high-conductance solute channel in the chloroplastic outer envelope from Pea. *Plant Cell* 10: 1207-1216
- Pohlmeyer K, Soll J, Steinkamp T, Hinnah S, Wagner R** (1997) Isolation and characterization of an amino acid-selective channel protein present in the chloroplastic outer envelope membrane. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94: 9504-9509
- Qbadou S, Becker T, Bionda T, Reger K, Ruprecht M, Soll J, Schleiff E** (2007) Toc64--a preprotein-receptor at the outer membrane with bipartite function. *J.Mol.Biol.* 367: 1330-1346
- Qbadou S, Becker T, Mirus O, Tews I, Soll J, Schleiff E** (2006) The molecular chaperone Hsp90 delivers precursor proteins to the chloroplast import receptor Toc64. *EMBO J.* 25: 1836-1847
- Rassow J, Dekker PJ, van Wilpe S, Meijer M, Soll J** (1999) The preprotein translocation of the mitochondrial inner membrane: function and evolution. *J.Mol.Biol.* 286: 105-120
- Rensing S, Lang D, Zimmer AD, Quatrano RS, Boore JL** (2008) The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* 319: 64-69
- Reski R, Abel WO** (1985) Induction of budding in chloronemata and caulonemata of the moss *Physcomitrella patens* using isopentenyladenine. *Planta* 165: 354-358
- Reski R, Cove DJ** (2004) A quick guide: *Physcomitrella patens*. *Curr.Biol.* 14: 261-262

- Reumann S, Inoue K, Keegstra K** (2005) Evolution of the general protein import pathway of plastids (review). *Mol.Membr.Biol.* 22: 73-86
- Reutter K, Reski R** (1996) Production of a heterologous protein in bioreactor cultures of fully differentiated moss plants. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 2: 142-147
- Richter S, Lamppa GK** (1998) A chloroplast processing enzyme functions as the general stromal processing peptidase. *PNAS* 95: 7463-7468
- Rolland N, Ferro M, Seigneurin-Berny D, Garin J, Douce R, Joyard J** (2003) Proteomics of chloroplast envelope membranes. *Photosynthesis Research* 78: 205-210
- Ruprecht M, Bionda T, Sato T, Sommer MS, Endo T, Schleiff E** (2010) On the impact of precursor unfolding during protein import in chloroplasts. *Mol.Plant* 3: 499-508
- Saiki R, Gelfand D, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn G, Mullis K, Erlich H** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491
- Salomon M, Fischer K, Flugge UI, Soll J** (1990) Sequence analysis and protein import studies of an outer chloroplast envelope polypeptide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87: 5778-5782
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Schein AI, Kissinger JC, Ungar LH** (2001) Chloroplast transit peptide prediction: a peek inside the black box. *Nucleic Acids Res.* 29: 82-82
- Schindler C, Soll J** (1986) Protein transport in intact, purified pea etioplasts. *Arch.Biochem.Biophys.* 247: 211-220
- Schleiff E, Jelic M, 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** (2000) Travelling of proteins through membranes: translocation into chloroplasts. *Planta* 211: 449-456
- Schleiff E, Soll J, Sveshnikova N, Tien R, Wright S, Dabney-Smith C, Subramanian C, Bruce BD** (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
- Schnell DJ, Kessler F, Blobel G** (1994) Isolation of components of the chloroplast protein import machinery. *Science* 266: 1007-1012
- Seedorf M, Waegemann K, Soll J** (1995) A constituent of the chloroplast import complex represents a new type of GTP-binding protein. *Plant J.* 7: 401-411

- Sohrt K, Soll J** (2000) Toc64, a new component of the protein translocon of chloroplasts. *J.Cell Biol.* 148: 1213-1221
- Soll J, Schleiff E** (2004) Protein import into chloroplasts. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 5: 198-208
- Stengel A, Benz JP, Soll J, Bölter B** (2010) Redox-regulation of protein import into chloroplasts and mitochondria: Similarities and differences. *Plant Signal.Behav.* 5:
- Stengel A, Benz P, Balsera M, Soll J, Bölter B** (2008) TIC62 redox-regulated translocon composition and dynamics. *J.Biol.Chem.* 283: 6656-6667
- Stengel A, Soll J, Bölter B** (2007) Protein import into chloroplasts: new aspects of a well-known topic. *Biol.Chem.* 388: 765-772
- Strittmatter P, Soll J, Bölter B** (2010) Chloroplast protein import machinery. *Springer Verlag, Protein Sekretion 2*: 307-321
- Sveshnikova N, Soll J, Schleiff E** (2000) Toc34 is a preprotein receptor regulated by GTP and phosphorylation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97: 4973-4978
- Theg SM, Scott SV** (1993) Protein import into chloroplasts. *Trends Cell Biol.* 3: 186-190
- Tripp J, Inoue K, Keegstra K, Froehlich JE** (2007) A novel prolin/serin-rich domain in combination with a transmembrane domain is required for the insertion of At-Tic40 into the inner envelope membrane of chloroplasts. *Plant J.* 52: 824-832
- Vojta A, Alavi M, Becker T, Hormann F, Kuchler M, Soll J, Thomson R, Schleiff E** (2004) The protein translocon of the plastid envelopes. *J.Biol.Chem.* 279: 21401-21405
- Vojta L, Soll J, Bölter B** (2007) Requirements for a conservative protein translocation pathway in chloroplasts. *FEBS Lett.* 581: 2621-2624
- von Heijne G, Streppuhn J, Herrmann RG** (1989) Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *J.Biochem.* 180: 535-545
- Vothknecht UC, Soll J** (2000) Protein import: the hitchhikers guide into chloroplasts. *Biol.Chem.* 381: 887-897
- Waagemann K, Soll J** (1991) Characterization of the protein import apparatus in isolated outer envelopes of chloroplasts. *Plant J.* 1: 149-158
- Waagemann K, Soll J** (1995) Characterization and isolation of the chloroplast protein import machinery. *Methods Cell Biol.* 50: 255-267
- Waagemann K, Soll J** (1996) Phosphorylation of the transit sequence of chloroplast precursor proteins. *J.Biol.Chem.* 271: 6545-6554
- Whelan J, O'Mahony P, Harmey MA** (1990) Processing of Precursor Proteins by Plant Mitochondria. *Arch.Biochem.Biophys.* 279: 281-285

-
- Whelan J, Tanudji MR, Smith MK, Day DA** (1996) Evidence for a link between translocation and processing during protein import into soybean mitochondria. *Biochim.Biophys.Acta* 1312: 48-54
- White SH** (2007) Membrane protein insertion: The biology-physics nexus. *J.Gen Physiol* 129: 363-369
- White SH, von Heijne G** (2005) Transmembrane helices before, during and after insertion. *Curr Opin Struct Biol* 15: 378-386
- White SH, Wimley WC** (1999) Membrane protein folding and stability. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 28: 319-365
- Wu C, Seibert FS, Ko K** (1994) Identification of chloroplast envelope proteins in close physical proximity to a partially translocated chimeric precursor protein. *J.Biol.Chem.* 269: 32264-32271
- Xu XM, Lin H, Maple J, Björkblom B, Alves G, Larsen JP, Møller SG** (2010) The Arabidopsis DJ-1a protein confers stressprotection through cytosolic SOD activation. *J.Cell Sci.* 123: 1644-1651
- Yokota T, Sugawara K, Ito K, Takahashi R, Ariga H, Mizusawa H** (2003) Down regulation of DJ-1 enhances cell death by oxidative stress, ER stress, and proteasome inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 26: 1342-1348
- Zang XP, Glaser E** (2002) Interaction of plant mitochondrial and chloroplast signal peptides with the Hsp70 molecular chaperone. *Trends Plant Sci.* 7: 14-21
- Zhang L, Shimoji M, Thomas B, Moore DJ, Yu SW, Marupudi NI, Torp R, Torgner IA, Ottersen OP, Dawson TM, Dawson VL** (2005) Mitochondrial localization of the Parkinson's disease related protein DJ-1: implications for pathogenesis. *Hum Mol Genet.* 14: 2063-2073
- Zhou C, Yang Y, Jong A** (1990) Miniprep in 10 Minuten. *Biotechniques* 8: 172-173

8 Lebenslauf

Beruflicher Werdegang:

Aug. 1990	–	Juli 1997	Realschule Tiengen
Aug. 1997	–	Juli 2000	Wirtschaftsgymnasium Waldshut
Okt. 2000	–	April 2001	Abgebrochene Lehre zur Steuerfachangestellten
Mai 2001	–	Aug. 2001	Berufsbezogenes Praktikum Reitstall Wolfsgrube
Okt. 2001	–	Juli 2003	Grundstudium Biologie an der Universität Hohenheim, Stuttgart
Sept. 2003	–	März 2004	Auslandssemester an der Universidad de La Laguna, Teneriffa, Spanien
April 2004	–	Sept. 2006	Hauptstudium an der Universität Hohenheim, Stuttgart; Abschluss: Diplom Biologin (1,5), mit den Vertiefungsrichtungen Zoologie, Zelluläre Mikrobiologie und Agrarökologie der Tropen und Subtropen; Diplomarbeit: „Isolierung und Charakterisierung der p34-Untereinheit des VacA-Toxins von <i>Helicobacter pylori</i> “ (1,3)
Nov. 2006	–	Juni 2007	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Klinikum rechts der Isar (Neurochemie und Neurogenetik) zu dem Thema: „Antikaline, ein therapeutischer Ansatz um Alzheimer zu behandeln“
Juli 2007	–	Sept. 2011	Promotion an der LMU München, unter Prof. Jürgen Soll, in der Biochemie und Physiologie der Pflanzen mit dem Thema „Proteinimport in Chloroplasten“ mit den Modellpflanzen <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Pisum sativum</i> und <i>Physcomitrella patens</i>

Zusatzqualifikationen:

Nov. 2007	–	Sept. 2011	Mitglied im Elitenetzwerk Bayern „Protein Dynamics in Health and Disease“
Febr. 2008	–	Febr. 2009	Sprecher des Programms „Protein Dynamics in Health and Disease“ beim Elitenetzwerk Bayern
Dez. 2008	–	Aug. 2009	Betreuung Diplomarbeit Natalie Schuck (Dipl. Biologe)
Jan. 2010	–	Sept. 2010	Betreuung Masterarbeit Laura Delphino (Master Biologie)
Febr. 2010	–	Dez. 2010	Pressesprecher des Programms „Protein Dynamics in Health and Disease“ beim Elitenetzwerk Bayern
Juni 2010	–	Nov. 2010	Betreuung Zulassungsarbeit Felix Leitenberger (Lehramt Biologie und Chemie)

Weiterbildungen:

Nov. 2007 (4 Tage)	Entrepreneurship (Graduate Center, LMU)
März 2009 (3 Tage)	Statistics for the life sciences (Graduate Center, LMU)
Juni 2009 (3 Tage)	Advanced Scientific Writing (Ruth Willnot, Munich)
Aug. 2009 (3 Tage)	Getting Funded (Ruth Willnot, Wien)
Febr. 2010 (1 Tag)	Literature Research (MPI Biochemistry, Martinsried)
Aug. 2010 (3 Tage)	Presenting Professionally (Andrea Roos, Munich)
Sept. 2010 (1 Tag)	Bioinformatical Tools (MPI Biochemistry, Martinsried)

Konferenzen:

Aug. 2008	MOSS and FESPB, Tampere, Finnland (Posterpräsentation)
Nov. 2008	SFB 594 – Jahresversammlung, MPI Biochemistry, Martinsried
Sept. 2009	Leopoldina Symposium „Molecular Genetics of Chloroplasts and Mitochondria“, Berlin (Posterpräsentation)
Nov. 2009	SFB 594 – Jahresversammlung, MPI Biochemistry, Martinsried
Mai 2010	SFB 594 – Jahresversammlung, Kloster Banz

Sprachen:

Deutsch	–	Muttersprache
Englisch	–	sehr gute Kenntnisse
Spanisch	–	gute Kenntnisse
Französisch	–	Grundkenntnisse

9 Veröffentlichungen

9.1 Publikationen

“Import of preprotein into the chloroplast inner envelope membrane”
Firlej-Kwoka, E., **Strittmatter, P.**, Soll, J., Bölter, B.
Plant Mol Biol. 2008 Nov; 68 (4-5): 505-19.

9.2 Reviews

“The chloroplast protein import machinery: a review”
Strittmatter, P., Soll, J., Bölter, B.
Methods Mol Biol. 2010; 619: 307-21. Review

9.3 Poster

MOSS and FESPB, Tampere, Finland : “Mechanistic and regulatory properties of chloroplast protein import in *Physcomitrella patens*.”
Strittmatter, P., Stengel, A., Balsera, M., Rensing, S., Decker, E., Reski, R., Wiedemann, G., Soll, J., Bölter, B.

Leopoldina Symposium Molecular Genetics of Chloroplasts and Mitochondria, Berlin: “Exploring mechanistic and regulatory properties of chloroplast protein import using the moss *Physcomitrella patens*.”
Strittmatter, P., Decker, E., Reski, R., Soll, J., Bölter, B.

10 Danksagung

Mein allergrößter Dank gilt Prof. Jürgen Soll. Danke, dass Sie es mir ermöglicht haben meine Doktorarbeit in Ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen. Ihre ständige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft haben diese Arbeit stets vorangetrieben.

Einen großen Dank auch an meine Betreuerin PD Dr. Bettina Bölter. Du hast mich während meiner Doktorarbeit immer unterstützt und meine endlosen Fragen mit viel Geduld beantwortet.

Ein Riesendankeschön an all meine Laborkollegen (und Freunde). Erika, du hast mich von Anfang bis Ende durch die Doktorarbeit begleitet-ich hätte mir keine bessere Banknachbarin wünschen können. Philipp und Anna, ihr habt mir so viel beigebracht, ich weiß gar nicht wie ich euch dafür danken soll. Danke, dem „207c“-Team Ewa und Mónica. Ich hab noch nie so viel auf drei unterschiedlichen Sprachen gleichzeitig gelacht. Andi, Carsten, Eike, Katja, Natalie und WaiLing-ihr seid ein tolles Team.

Vielen Dank allen, die mich beim Schreiben dieser Arbeit unterstützt haben, besonders Bettina, Anna, Katja und Sabrina für ihre zügigen und sehr hilfreichen Korrekturen.

Danke auch an das Elitenetzwerk Bayern und den Mitgliedern des Programms „Protein Dynamics in Health and Disease“. Der Austausch mit anderen Doktoranden hat mir zu neuen Blickwinkeln verholfen und zu vielen Anregungen für meine Doktorarbeit geführt. Auch ein herzliches Dankeschön an unseren Koordinator PD Dr. Kai Hell.