

**Membrantransport gefalteter Proteine:  
Untersuchungen zu Struktur, Funktion und Evolution der  
Tat-Translokase pflanzlicher Mitochondrien**

Dissertation

zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Herrn Leander Ehmke  
geb. am 20.02.1994 in Eutin

- |                 |                              |
|-----------------|------------------------------|
| 1. Gutachter:   | Prof. Dr. Ralf Bernd Klösgen |
| 2. Gutachterin: | Prof. Dr. Kristina Kühn      |
| 3. Gutachter:   | Prof. Dr. Roland Lill        |

Datum der Verteidigung: 08.09.2023

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	V
Abkürzungs- und Begriffsverzeichnis .....	VIII
Zusammenfassung .....	X
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Import kerncodierter Vorläuferproteine in die endosymbiontischen Organellen .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2. Proteintransport in die chloroplastidären Thylakoide .....</b>	<b>3</b>
1.2.1. Der Tat-abhängige Proteintransport ( <i>twin-arginine translocation</i> ) .....	4
1.2.1.1. Untereinheiten und Komplex-Zusammensetzung der Tat-Translokase .....	5
1.2.1.2. Aufbau und Funktion Tat-spezifischer Signalpeptide.....	7
1.2.1.3. Postulierte Transportmechanismen der Tat-Translokation.....	8
<b>1.3. Proteintransport in die innere mitochondriale Hüllmembran.....</b>	<b>9</b>
<b>1.4. Membrantransport gefalteter Proteine.....</b>	<b>11</b>
1.4.1. Die Rieske-Fe/S-Proteine .....	12
1.4.1.1. Das mitochondriale Rieske-Fe/S-Protein (mtRieske).....	13
1.4.1. Das mitochondriale Bcs1-Transportsystem ( <i>cytochrome bc<sub>1</sub> synthesis</i> ).....	15
1.4.2. Die mitochondriale Tat-Translokase (mtTat).....	17
<b>1.5. Zielstellung .....</b>	<b>19</b>
<b>2. MATERIAL &amp; METHODEN .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1. Material.....</b>	<b>20</b>
2.1.1. Chemikalien .....	20
2.1.2. Thiol-reaktive Reagenzien.....	20
2.1.3. Größenstandards.....	20
2.1.4. Enzyme und Inhibitoren.....	20
2.1.5. Reaktionskits.....	21
2.1.6. Nukleotide und Aminosäuren.....	21
2.1.7. Oligonukleotide/Primer .....	21
2.1.8. Plasmide.....	23
2.1.9. <i>E. coli</i> -Bakterienstämme .....	25
2.1.10.Kulturmedien .....	25
2.1.11.Inhibitoren und Antibiotika.....	26
2.1.12.Heterolog synthetisierte Proteine.....	26
2.1.13.Antikörper.....	27

2.1.14. Pflanzenmaterial.....	27
<b>2.2. Methoden .....</b>	<b>28</b>
2.2.1. Molekularbiologische Methoden .....	28
a) Standardmethoden.....	28
b) Ortsspezifische Mutagenese .....	28
c) Klonierung rekombinanter Konstrukte.....	29
d) Transformation.....	30
e) Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i> -Kulturen.....	31
f) Plasmidpräparation und Aufreinigung.....	32
g) Plasmid-Linearisierung und Phenol-Chloroform-Extraktion.....	32
h) <i>In vitro</i> -Synthese radioaktiv markierter Proteine .....	32
2.2.2. Methoden zur Arbeit mit pflanzlichem Material .....	32
2.2.2.1. Organellisolierung und Fraktionierung .....	32
a) Mitochondrienisolierung.....	32
b) Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	37
c) Mitoplastenpräparation .....	38
d) Vesikelpräparation.....	38
e) Chloroplastenisolierung.....	39
f) Messung der Chlorophyll-Konzentration .....	41
g) Thylakoidpräparation.....	42
2.2.2.2. Proteinbiochemische Methoden.....	42
a) Extraktion membrangebundener Proteine .....	42
b) <i>In vitro</i> -Proteintransport.....	43
c) Denaturierende Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	46
d) Solubilisierung von Membranprotein-Komplexen.....	47
e) Native Gelelektrophorese (BN-PAGE).....	48
f) Kolloidale Coomassie®-Färbung.....	49
g) Western Blot ( <i>semi-dry</i> ) und Immundetektion.....	50
h) Visualisierung und Quantifizierung radioaktiver Signale .....	53
2.2.2.3. Photometrische Enzymaktivitätsmessungen.....	53
a) Messung der NADH-Oxidation .....	53
b) Messung der ATP-Synthase-Aktivität .....	54
2.2.2.4. Elektronenmikroskopie .....	54
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>56</b>
<b>3.1. Etablierung eines geeigneten Systems zur Untersuchung der mtTat-Translokase.....</b>	<b>56</b>
3.1.1. Präparation invertierter submitochondrialer Vesikel.....	57
3.1.1.1. Charakterisierung präparierter Vesikelfractionen .....	58

a) Membranorientierung.....	58
b) Aktivität.....	60
c) Morphologie (Elektronenmikroskopie).....	72
d) Zusammenfassung zur Präparation und Charakterisierung.....	75
3.1.1.2. Proteintransportversuche mit invertierten submitochondrialen Vesikeln .....	76
3.1.2. Cystein-Modifizierung durch Thiol-reaktive Reagenzien.....	83
3.1.2.1. MalPEG.....	83
a) Modifizierungskontrolle mit <i>in vitro</i> -Translationsprodukten .....	83
b) Kontrollversuche zur Bestimmung der Membrantopologie importierter Proteine.....	85
3.1.2.2. AMS.....	88
a) Modifizierungskontrolle mit <i>in vitro</i> -Translationsprodukten und Optimierungsansätze.....	88
b) Kontrollversuche zur Bestimmung der Membrantopologie importierter Proteine.....	89
3.1.2.3. MCCB.....	92
a) Modifizierungskontrolle mit <i>in vitro</i> -Translationsprodukten .....	92
b) MCCB als Alternative zu AMS: Vor- und Nachteile.....	93
<b>3.2. Charakterisierung der pflanzlichen mtTat-Translokase .....</b>	<b>95</b>
3.2.1. Energetisierung der Translokation.....	95
3.2.2. Re-Export prozessierter Tat-Substrate im zeitlichen Verlauf.....	97
3.2.3. Mitochondrial lokalisiertes Tata .....	99
3.2.3.1. Abwesenheit von mitochondrial lokalisiertem Tata.....	99
3.2.3.2. Überschuss von mitochondrial lokalisiertem Tata.....	101
3.2.4. Gelelektrophoretische und immunologische Analyse pflanzlicher mtTat-Komplexe .....	105
3.2.4.1. Comigration von mtTat-Substraten mit mtTatB.....	106
3.2.4.2. Comigration von mtTat-Substraten mit Cytochrom $c_1$ .....	108
<b>3.3. Charakterisierung potentieller mtTat-Substrate .....</b>	<b>109</b>
3.3.1. Das Erkennungsmotiv.....	110
3.3.1.1. mtRieske: Einfluss von Mutationen im potentiellen Erkennungsmotiv.....	110
3.3.1.2. M/MPC: Einfluss von Mutationen im potentiellen Erkennungsmotiv.....	112
3.3.2. <i>In vitro</i> -Transportversuche mit heterologen Rieske-Proteinen .....	115
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>120</b>
<b>4.1. Die mitochondriale Tat-Translokase in Pflanzen .....</b>	<b>120</b>
4.1.1. Relevanz von mitochondrial lokalisiertem Tata.....	121
4.1.2. Potentielle Assoziation von mtTat mit Komplex III.....	123
4.1.3. Translokation in Abhängigkeit von der PMK und einem KR-Motiv.....	125

<b>4.2. Gleiches Ziel, anderer Weg – Bcs1 in Opisthokonta.....</b>	<b>127</b>
4.2.1. Zur Herkunft von Bcs1.....	127
4.2.2. Unterschiede in der SAD von mtRieske aus Pflanzen und Opisthokonta.....	128
4.2.3. Kaum mtTat-Transport mit mtRieske-Proteinen aus Opisthokonta.....	133
4.2.4. Weshalb konnte Bcs1 die mitochondriale Tat-Translokase ersetzen?.....	135
<b>5. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>137</b>
<b>PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>159</b>
<b>ANHANG .....</b>	<b>160</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>166</b>
<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>168</b>
<b>EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>169</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. I.1: Schematische Darstellung zur Entstehung der endosymbiontischen Organellen eukaryotischer Zellen.....	1
Abb. I.2: Schematische Darstellung zum Import kerncodierter Organell-Proteine.....	2
Abb. I.3: 3D-Proteinstruktur der Tat-Untereinheiten.....	6
Abb. I.4: Schematische Darstellung zum Aufbau eines klassischen Tat-Signalpeptides. ....	7
Abb. I.5: Schematische Darstellung zum Export bzw. Re-Export mitochondrialer Membranproteine aus der Matrix. ....	10
Abb. I.6: Schematischer Aufbau der Rieske-Fe/S-Proteine (mtRieske bzw. cpRieske) und ihre 3D-Proteinstruktur. ....	13
Abb. I.7: Der Bcs1-Komplex: 3D-Struktur und schematische Darstellung zum vermuteten Proteintransport-Mechanismus.....	16
Abb. I.8: Vergleich der 3D-Proteinstrukturen von <i>E. coli</i> TatB und <i>A. thaliana</i> mtTatB.....	18
Abb. E.1: Schema zur Präparation invertierter submitochondrialer Vesikel. ....	57
Abb. E.2: Schema zur Untersuchung der Membranorientierung (sub)mitochondrialer Fraktionen mittels NaBr-Extraktion.....	59
Abb. E.3: Immundetektion der F <sub>1</sub> β-Untereinheit von Komplex V (AtpB) in (sub)mitochondrialen Fraktionen vor und nach Proteinextraktion mit 2 M NaBr.....	60
Abb. E.4: Schema zur Untersuchung der Komplex I-Aktivität (sub)mitochondrialer Fraktionen.....	62
Abb. E.5: Photometrische Messung der NADH-Oxidation in (sub)mitochondrialen Fraktionen. ....	63
Abb. E.6: Schema zur Untersuchung der Komplex V-Aktivität (sub)mitochondrialer Fraktionen.....	65
Abb. E.7: Photometrische Messung der Komplex V-Aktivität in (sub)mitochondrialen Fraktionen.....	66
Abb. E.8: Photometrische Messung der Komplex V-Aktivität in mitochondrialen Vesikel-Subfraktionen. ....	67
Abb. E.9: Schema zur Untersuchung der MPP-Aktivität (sub)mitochondrialer Fraktionen. ....	69
Abb. E.10: Schematischer Aufbau der Rieske-Fe/S-Proteine (mtRieske bzw. cpRieske) und Darstellung rekombinanter Konstrukte. ....	70
Abb. E.11: Überprüfung der MPP-Aktivität submitochondrialer Vesikel durch Inkubation mit radioaktiv markierten Vorläuferproteinen.....	71
Abb. E.12: Kontrastierte elektronenmikroskopische Aufnahmen submitochondrialer Vesikelfraktionen. ....	73
Abb. E.13: Kontrastierte elektronenmikroskopische Aufnahmen mitochondrialer Vesikel-Subfraktionen. ....	74
Abb. E.14: Proteintransport-Versuche mit Rieske-Proteinvarianten und invertierten submitochondrialen Vesikeln bzw. isolierten Thylakoiden. ....	77
Abb. E.15: Proteintransport-Versuche mit rekombinanten cpRieske-Konstrukten und isolierten Thylakoiden.....	78
Abb. E.16: Proteintransport-Versuche mit rekombinanten mtRieske-Konstrukten und invertierten submitochondrialen Vesikeln.....	79
Abb. E.17: Proteintransport-Versuche mit bakteriellen bzw. plastidären Tat-Substraten und invertierten submitochondrialen Vesikeln.....	80

Abb. E.18: Proteintransport-Versuche mit rekombinanten mtRieske-Konstrukten und invertierten submitochondrialen Vesikeln unter Zugabe von heterolog exprimiertem TatA. ....	81
Abb. E.19: Kontrolle der Cystein-Modifizierung von <i>in vitro</i> -translatierten, rekombinanten mtRieske-Konstrukten und GrpE durch verschiedene MalPEG-Derivate.....	84
Abb. E.20: Überprüfung von MalPEG <sub>750</sub> als geeignetes Reagenz zur Topologie-Bestimmung importierter Proteine.....	86
Abb. E.21: Überprüfung von MalPEG <sub>5.000</sub> als geeignetes Reagenz zur Topologie-Bestimmung importierter Proteine.....	87
Abb. E.22: Kontrolle der Cystein-Modifizierung von <i>in vitro</i> -translatiertem MPC und M/MPC durch AMS, sowie mögliche Anpassungen zur besseren Differenzierbarkeit modifizierter und unmodifizierter Proteine. ....	89
Abb. E.23: Überprüfung von AMS als geeignetes Reagenz zur Topologie-Bestimmung importierter Proteine.....	90
Abb. E.24: Import von mtRieske und anschließende Topologie-Bestimmung mittels Cystein-Modifizierung durch AMS. ....	91
Abb. E.25: Kontrolle der Cystein-Modifizierung von <i>in vitro</i> -translatiertem MPC und M/MPC durch MCCB. ....	93
Abb. E.26: Lyse isolierter Mitochondrien bei steigender MCCB-Konzentration.....	94
Abb. E.27: Überprüfung von MCCB als geeignetes Reagenz zur Topologie-Bestimmung von importiertem M/MPC und Kontrolle der kritischen MCCB-Konzentration. ....	94
Abb. E.28: Einfluss von Valinomycin und CCCP auf den mitochondrialen Re-Export von zuvor importiertem M/MPC. ....	96
Abb. E.29: Proteintransport-Zeitreihe und Cystein-Modifizierung zur Untersuchung des Re-Exportes von M/MPC im zeitlichen Verlauf. ....	98
Abb. E.30: Immundetektion von mtRieske und Cytochrom <i>c</i> <sub>1</sub> in mitochondrialen Proteinkomplexen aus Wildtyp und <i>TatA</i> -Deletionsmutanten von <i>A. thaliana</i> . ....	100
Abb. E.31: Proteintransport-Versuche mit TatA bzw. rekombinanten TatA-Konstrukten und isolierten Mitochondrien.....	102
Abb. E.32: Konsekutive Proteintransport-Versuche mit isolierten Mitochondrien. ....	103
Abb. E.33: Konsekutiver Proteintransport zur initialen Vorbeladung isolierter Mitochondrien mit TatA und einer anschließenden Untersuchung des Re-Exportes von M/MPC im zeitlichen Verlauf..	104
Abb. E.34: Comigration von mtTatB und dem importierten mtTat-Substrat M/MPC in mitochondrialen Membrankomplexen aus <i>S. oleracea</i> .....	107
Abb. E.35: Comigration von Cytochrom <i>c</i> <sub>1</sub> und importierten mtTat-Substraten in mitochondrialen Membrankomplexen aus <i>P. sativum</i> . ....	109
Abb. E.36: Interaktionsrate zwischen mtRieske bzw. dessen Erkennungsmotiv-Mutanten und Komplex III.....	111
Abb. E.37: Import und Re-Export von M/MPC und dessen Erkennungsmotiv-Mutanten.....	113
Abb. E.38: Interaktionsrate zwischen M/MPC bzw. dessen Erkennungsmotiv-Mutanten und Komplex III.....	114
Abb. E.39: Proteintransport-Versuche mit isolierten Mitochondrien aus <i>P. sativum</i> und pflanzlichen, sowie nicht-pflanzlichen mtRieske-Proteinen. ....	116
Abb. E.40: Interaktionsrate zwischen mtRieske-Proteinen verschiedener Spezies und pflanzlichem Komplex III.....	117
Abb. E.41: Interaktionsrate zwischen cpRieske und Komplex III.....	118

Abb. D.1: Sequenzlogos der Signalankerdomänen von Rieske-Proteinen aus Pflanzen und Säugetieren.....	130
Abb. D.2: Hydropathie der Rieske-Signalankerdomänen verschiedener Organismen. ....	131
Abb. A.1: Kontrolle der Transport-Rekonstitution anti-TatA-blockierter Thylakoide mit aufgereinigtem TatA.....	160
Abb. A.2: Kontrolle der Immundetektion von mtRieske und der Reinheit isolierter Organellen aus <i>A. thaliana</i> . ....	160
Abb. A.3: Immundetektion von mtTatB in isolierten Mitochondrien aus <i>S. oleracea</i> . ....	161
Abb. A.4: Immundetektion von Cytochrom $c_1$ in isolierten Mitochondrien aus <i>P. sativum</i> . ....	161
Abb. A.5: Multiples Sequenzalignment der mtRieske-Proteine verschiedener Organismen.....	162
Abb. A.6: Verwandtschaftsanalyse der Rieske-Proteine mittels <i>maximum likelihood</i> -Methode. ....	163

**Abkürzungs- und Begriffsverzeichnis**

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Massenprozent
AAA	<i>ATPases Associated with diverse cellular Activities</i>
AMS	4-Acetamido-4'-Maleimidylstilben-2,2'-disulfonsäure
AO	Acridinorange
APH	amphipathische Helix
ATP/ADP/GTP	Adenosintriphosphat/Adenosindiphosphat/Guanosintriphosphat
AtpB	F <sub>1</sub> β-Untereinheit der ATP-Synthase
Bcs1	<i>cytochrome bc1 synthase</i>
BN-PAGE	<i>Blue Native</i> -Polyacrylamidgelelektrophorese
BSA	Bovines Serumalbumin
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon
C-Domäne	kurze, polare Domäne am C-Terminus von Sec- und Tat-Signalpeptiden
cis-	diesseits der Biomembran (von Transportrichtung aus gesehen)
cpRieske	chloroplastidäres Rieske-Fe/S-Protein
C <sub>P</sub>	Proteinkonzentration
C-Terminus bzw. -terminal	Carboxy-Terminus bzw. -terminal
CTR	C-terminale Region
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Reticulum
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
GTV	submitochondriale Vesikel, präpariert mittels wiederholter Gefrier-Tau-Zyklen
H-Domäne	zentraler, hydrophober Abschnitt in Sec- und Tat-Signalpeptiden
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
ISC	<i>iron-sulfur cluster</i> -Maschinerie
KR-Motiv	Lysin-Arginin-Motiv
LB	<i>lysogeny broth</i>
MalPEG	Methoxypolyethylenglycol-maleimid
MCCB	4-(N-Maleinimidomethyl)-cyclohexan-1-carbonsäurebradykininester
MIP	mitochondriale Intermediat-Peptidase
MPP	mitochondriale Prozessierungspeptidase
mtRieske	mitochondriales Rieske-Fe/S-Protein
mtTat	mitochondriales Tat-System
NADH	Nicotinamadenindinukleotid
N-Domäne	kurze, positiv geladene Domäne am N-Terminus von Sec- und Tat-Signalpeptiden
NHS	N-Hydroxysuccinimid, N-Hydroxysuccinimid
NMR	Kernspinresonanz
NPC	Kernporenkomplex
N-Terminus bzw. -terminal	Amino-Terminus bzw. -terminal
OXA	<i>oxidase assembly complex</i>
PA	<i>Polyacrylamid</i>
PEG	Polyethylenglycol
PIM	peroxisomale Importmaschinerie
PMK	protonenmotorische Kraft

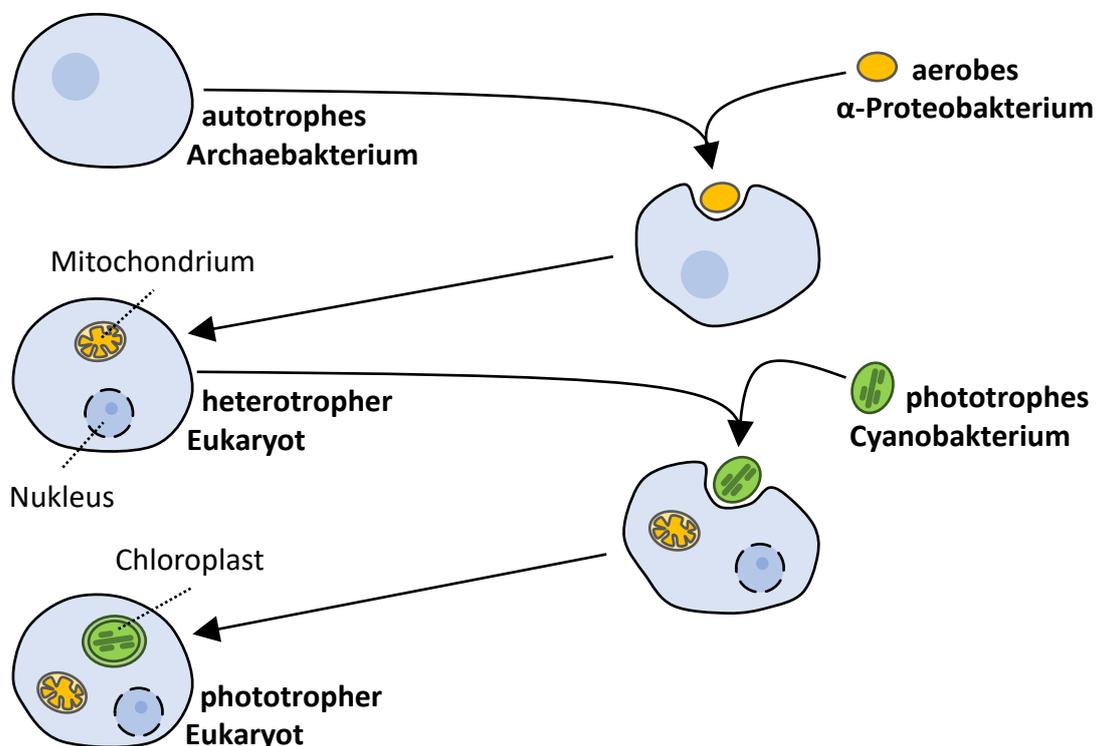
PMSF.....	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF.....	Polyvinylidenfluorid
PVP.....	Polyvinylpyrrolidon
RR-Motiv.....	<i>twin arginine motif</i> / Zwillingsarginin-Motiv
SAD.....	Signalankerdomäne
SDS.....	Natriumdodecylsulfat
Sec.....	<i>secretory pathway</i>
SOC.....	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
SPP.....	stromale Prozessierungspeptidase
SRP.....	<i>signal recognition particle</i>
STD.....	<i>stroma targeting domain</i>
SUF.....	<i>sulfur mobilization</i> -Maschinerie
Sulfo-SMCC.....	Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat
TEM.....	Transmissionselektronenmikroskopie
TIC.....	<i>translocase of the inner chloroplast membrane</i>
TIM.....	<i>translocase of the inner mitochondrial membrane</i>
TMD.....	Transmembrandomäne
TMH.....	Transmembranhelix
TOC.....	<i>translocase of the outer chloroplast membrane</i>
TOM.....	<i>translocase of the outer mitochondrial membrane</i>
TPP.....	thylakoidäre Prozessierungspeptidase
TPR.....	<i>tetratricopeptide repeat</i>
<i>trans</i> -.....	jenseits der Biomembran (von Transportrichtung aus gesehen)
TTD.....	<i>thylakoid targeting domain</i>
UPS.....	<i>unconventional protein secretion</i>
USV.....	submitochondriale Vesikel, präpariert mittels Ultraschallbehandlung
$\Delta\text{pH}$ .....	transmembraner Protonengradient
$\Delta\Psi$ .....	elektrochemisches Membranpotential

## Zusammenfassung

Für ihre Funktion sind Mitochondrien und Chloroplasten auf den effizienten Import kerncodierter Proteine aus dem Zytosol und deren Weitertransport in bzw. durch verschiedene Biomembranen angewiesen. Der Transport gefalteter, beispielsweise Cofaktor-tragender, Proteine stellt hierbei eine besondere Herausforderung dar und ist für die Organellfunktion essentiell. In der Thylakoidmembran von Chloroplasten wird diese Funktion von der Tat-Translokase übernommen, während in den Mitochondrien von Opisthokonta (mehrzellige Tiere, Pilze und nahverwandte Einzeller) die ursprünglich vorhandene Tat-Translokase durch das Bcs1-System funktional ersetzt wurde. Bemerkenswerterweise besitzen pflanzliche Mitochondrien kein Bcs1-System und sind für den Transport (Export) gefalteter Proteine von der Matrix in den Intermembranraum weiterhin auf die mitochondriale Tat-Translokase (mtTat) angewiesen. Für die Charakterisierung der mtTat-Translokase in Pflanzen wurde zunächst ein geeignetes Verfahren zur Untersuchung des intra-mitochondrialen Proteintransportes etabliert. Aus isolierten Mitochondrien konnten mittels wiederholter Gefrier-Tau-Zyklen submitochondriale Vesikel der inneren Hüllmembran präpariert werden, welche anhand elektronenmikroskopischer und immunologischer Analysen mehrheitlich als invertierte Vesikel mit einzelner Membran identifiziert wurden. Enzymatische Messungen haben zudem ergeben, dass die präparierten Vesikel über ein intaktes Membransystem und physiologisch aktive Proteinkomplexe verfügen. Ein Proteintransport konnte anhand dieser Vesikel bisher jedoch nicht detektiert werden. Über einen weiteren Ansatz, welcher auf der Cystein-Modifizierung mitochondrial importierter mtTat-Substrate beruht, konnte jedoch deren Re-Export im zeitlichen Verlauf bestätigt werden und eine Charakterisierung des mtTat-Systems erfolgen. Diese Untersuchungen haben ergeben, dass die mitochondriale Tat-Translokase, wie andere Tat-Systeme auch, für ihre Funktion von der protonenmotorischen Kraft abhängig ist. Allerdings ist die üblicherweise für den Transportprozess erforderliche TatA-Untereinheit in pflanzlichen Mitochondrien nicht essentiell, besitzt jedoch eine effizienzsteigernde Wirkung. Zudem ist der Transport von mtRieske trotz Mutationen im potentiellen Tat-Erkennungsmotiv weiterhin möglich, was eine Relevanz dieses Motivs für den mitochondrialen Tat-Transport infrage stellen könnte. Die mtRieske-Proteine aus Opisthokonta (Bcs1-Substrate) können, eventuell aufgrund ihrer vergleichsweise hydrophilen Signalankerdomäne, nicht effizient vom pflanzlichen mtTat-System transportiert werden. Des Weiteren deuten immunologische und autoradiographische Analysen nativer Proteinkomplexe auf eine Assoziation von mtTat mit Komplex III bzw. Komplex III-beinhaltenen Superkomplexen hin. All diese neuen Erkenntnisse tragen zu einem besseren Verständnis der pflanzlichen mtTat-Translokase bei. Dennoch bleiben viele entscheidende Fragen, insbesondere nach dem auch in Thylakoiden und Bakterien weiterhin enigmatischen Translokationsmechanismus, ungeklärt und erfordern auch in Zukunft unsere Aufmerksamkeit.

# 1. Einleitung

Der intrazelluläre Transport kerncodierter Organell-Proteine ist von essentieller Bedeutung für die Funktion und Vitalität eukaryotischer Zellen. Denn im Zuge der Endosymbiose, durch welche aus einem Alphaproteobakterium die Mitochondrien und aus einem Cyanobakterium die Chloroplasten hervorgegangen sind (Schema siehe Abb. I.1, zusammengefasst in Eme *et al.*, 2017), kam es zu einem massiven Transfer von Genen aus den jeweiligen Organell-Genomen in das Kerngenom der Wirtszelle (Bock und Timmis, 2008, Ueda und Kadowaki, 2012). Es mussten Importmaschinerien in den Hüllmembranen der Organellen (Ghifari *et al.*, 2018, Rochaix, 2022) und Transportsignale zur Sortierung und Translokation der nun zytosolisch synthetisierten Organell-Proteine etabliert werden (Wollman, 2016). Doch eine Vielzahl der importierten Proteine durchlaufen einen weiteren Transportschritt innerhalb der Organellen, um letztendlich ihre finale Position zu erreichen.

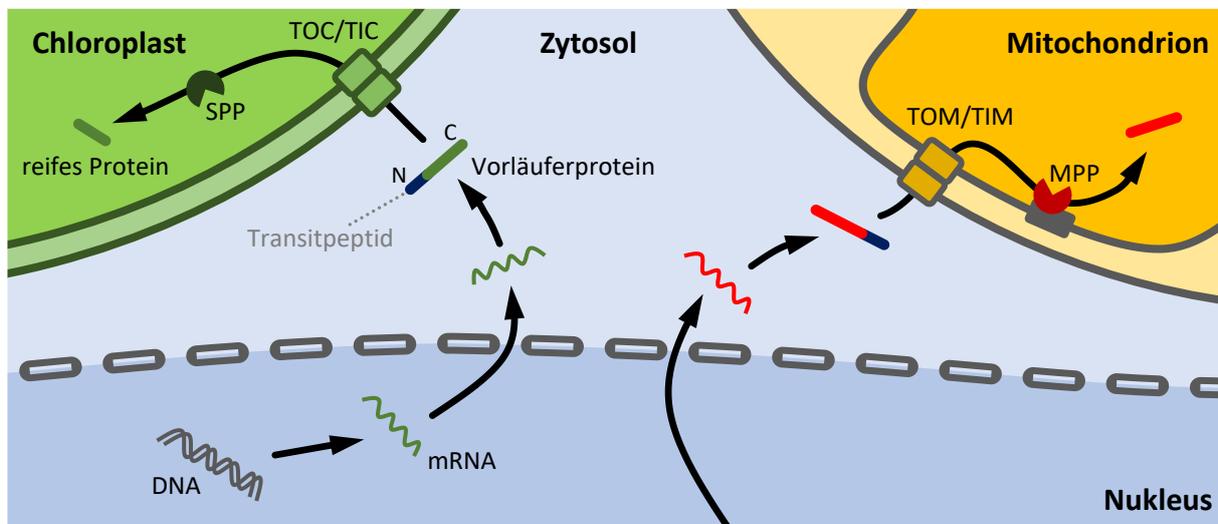


**Abb. I.1: Schematische Darstellung zur Entstehung der endosymbiontischen Organellen eukaryotischer Zellen.**

Die endosymbiontischen Organellen, Mitochondrien und Chloroplasten, gehen auf ein aerob lebendes Alphaproteobakterium bzw. ein phototroph lebendes Cyanobakterium zurück. Ein autotrophes Archaeobakterium bildet hierbei vermutlich die ursprüngliche Wirtszelle, in welcher sich das aufgenommene Proteobakterium zum Mitochondrium entwickeln konnte. In diesem nun heterotroph lebenden Eukaryoten etablierte sich das in einem zweiten, unabhängigen Ereignis aufgenommene Cyanobakterium zum Chloroplasten, woraufhin sich der Eukaryot phototroph ernähren konnte.

## 1.1. Import kerncodierter Vorläuferproteine in die endosymbiontischen Organellen

Mitochondrien und Chloroplasten sind darauf angewiesen, den größten Teil der für ihre Funktion erforderlichen Proteine zu importieren. Zwar verfügen beide Organellen über eine eigene Transkriptions- bzw. Translationsmaschinerie sowie ein (stark reduziertes) Organellgenom (Glöckner *et al.*, 2000, Burger *et al.*, 2013), allerdings wurden die meisten proteincodierenden Gene während der Organellentwicklung in das Kerngenom der Wirtszelle transferiert (Bock und Timmis, 2008, Ueda und Kadowaki, 2012). Die nun kerncodierten Proteine werden im Zytoplasma zunächst in Form von Vorläuferproteinen synthetisiert und anschließend in das jeweilige Zielorganell importiert (Schema siehe Abb. 1.2, Schenk, 1997, Martin und Herrmann, 1998).



**Abb. 1.2: Schematische Darstellung zum Import kerncodierter Organell-Proteine.**

Jeweils etwa 2.000 – 3.000 Proteine der Chloroplasten und Mitochondrien von Pflanzenzellen sind im Kern codiert, werden im Zytoplasma als Vorläuferproteine inklusive N-terminalem Transitpeptid synthetisiert und anschließend über die *translocase of the outer/inner chloroplast membrane* (TOC/TIC) bzw. *translocase of the outer/inner mitochondrial membrane* (TOM/TIM) importiert. Die Prozessierung zum reifen Protein erfolgt in Chloroplasten über die stromale Prozessierungspeptidase (SPP) und in Mitochondrien über die membrangebundene mitochondriale Prozessierungspeptidase (MPP).

In Pflanzenzellen werden etwa 2.000 – 3.000 kerncodierte Proteine mittels TOC/TIC-Importmaschinerie (*translocase of the outer/inner chloroplast membrane*) in das chloroplastidäre Stroma importiert (Rochaix, 2022). Dies erfordert ein meist N-terminales Transitpeptid, welches die Sortierung, den zytoplastischen Kontakt mit Chaperon-Proteinen und letztendlich den Import des Vorläuferproteins vermittelt (Perry und Keegstra, 1994, Schatz und Dobberstein, 1996). Nach erfolgreichem Transport wird das Transitpeptid durch die stromale Prozessierungspeptidase (SPP) abgetrennt (= Prozessierung) und anschließend degradiert (Richter und Lamppa, 1998,

Kmiec *et al.*, 2014). Analog zu Chloroplasten werden ebenfalls etwa 2.000 – 3.000 kerncodierte Proteine in die Mitochondrien höherer Pflanzen importiert (Rao *et al.*, 2017), und auch hier dient ein N-terminales Transitpeptid (für mitochondriale Proteine auch Präsequenz genannt) zunächst der Sortierung, Erkennung und Translokation (Esaki *et al.*, 2004). Die meisten Proteine werden über die TOM/TIM-Importmaschinerie (*translocase of the outer/inner mitochondrial membrane*) zunächst in die Matrix importiert, während einige Proteine des Intermembranraumes sowie der äußeren und inneren Hüllmembran nach dem Passieren des TOM-Komplexes über verschiedene Transporter und Mechanismen direkt „umgeleitet“ werden, ohne zuvor in die Matrix zu gelangen (zusammengefasst in Ghifari *et al.*, 2018). Im Anschluss an den Import matrixlokalisierter Proteine wird die Präsequenz in der Regel durch die mitochondriale Prozessierungspeptidase (MPP) abgetrennt, welche in Pflanzenzellen fester Bestandteil von Komplex III ist (Glaser und Dessi, 1999).

## **1.2. Proteintransport in die chloroplastidären Thylakoide**

Nicht alle Proteine verbleiben als reifes Protein im Stroma, sondern werden zum Großteil innerhalb der Chloroplasten in die Thylakoide „exportiert“. Theoretisch lässt sich dieser intra-plastidäre Transport als „Export“ bezeichnen, da die entsprechenden Translokasen zum Transport frisch importierter (aber auch stromal synthetisierter) Proteine in oder durch die Thylakoidmembran aus den prokaryotischen Exportmaschinerien der chloroplastidären Vorläufer entstanden sind (Frain *et al.*, 2016). Dies sind der Tat- (*twin-arginine translocation*), Sec- (*secretory pathway*) und SRP-abhängige (*signal recognition particle*) sowie der „spontan“ ablaufende Transportweg, welche sich einerseits durch das spezifische Transportsignal, die erforderliche Energetisierung, den Transportmechanismus und auch das Substratspektrum unterscheiden. Im Folgenden werden diese Proteintransportwege kurz vorgestellt, wobei insbesondere auf die im Fokus dieser Arbeit stehende Tat-Translokase detaillierter eingegangen wird.

Über den SRP-abhängigen und „spontanen“ Translokationsweg werden ausschließlich Membranproteine transportiert. Einige bitopische Membranproteine sind dazu in der Lage, ohne Energiezufuhr und weitere Faktoren (daher „spontan“) in die Thylakoidmembran zu inserieren (Michl *et al.*, 1994, Schleiff und Klösgen, 2001). Einzige Anforderung für diesen Transportmechanismus ist das Vorhandensein zweier stark hydrophober Proteinabschnitte, welche sich jeweils am C-Terminus des Transitpeptids und am N-Terminus des reifen Proteins befinden (Michl *et al.*, 1999). Beide Domänen flankieren einen kleinen hydrophilen Proteinabschnitt, welcher als einziger die Membran passieren

muss. Erst im Anschluss wird das gesamte Transitpeptid auf lumenaler Seite durch die thylakoidäre Prozessierungspeptidase (TPP) abgetrennt.

Über den SRP-vermittelten Transportweg werden insbesondere polytopische Membranproteine in die Thylakoidmembran inseriert. Nach erfolgter Prozessierung werden diese Proteine anhand spezifischer Motive im reifen Teil des Proteins durch einen im Stroma gelösten cpSRP54/cpSRP43-Heterodimer erkannt und zum membranintegralen Rezeptor cpFtsY und dem zum bakteriellen YidC orthologen Transporterprotein Alb3 dirigiert (zusammengefasst in Ziehe *et al.*, 2018). Die Rezeptorbindung, Aktivierung und Dissoziation des Transportkomplexes erfordern zur Energetisierung die Hydrolyse von GTP (Hoffman und Franklin, 1994, Jaru-Ampornpan *et al.*, 2009).

Für den Transport hydrophiler Proteine ins Thylakoidlumen sind zwei weitere Translokasen verantwortlich: Sec und Tat (früher auch als  $\Delta$ pH-abgängiger Transportweg bezeichnet). Allerdings umfasst das Substratspektrum beider Translokasen auch eine geringe Zahl membranständiger Proteine (Karnauchov *et al.*, 1994, Summer *et al.*, 2000, Molik *et al.*, 2001). Über das Sec-System werden ausschließlich ungefaltete Proteine transportiert, welche zur Erkennung ein zusammengesetztes Transitpeptid besitzen (Robinson *et al.*, 2000). Dieses besteht aus einem Importsignal (auch *stroma targeting domain*, STD) sowie einem zusätzlichen Signalpeptid, auch *thylakoid targeting domain*, TTD) und wird meist in zwei Schritten prozessiert: zunächst im Stroma (durch die SPP) und anschließend im Lumen (durch die TPP). Üblicherweise besitzt die TTD einen positiv geladenen N-Terminus, einen zentralgelegenen hydrophoben Bereich (H-Domäne) und einen polaren C-Terminus inklusive TPP-Schnittstelle (von Heijne, 1985, von Heijne *et al.*, 1989). Am Transport von Sec-Substraten sind die stromale Untereinheit SecA und die membrangebundenen Proteine SecY und SecE beteiligt (Nakai *et al.*, 1994, Laidler *et al.*, 1995, Schünemann *et al.*, 1999), wobei die Translokation durch die ATPase-Aktivität von SecA vorangetrieben wird (Haward *et al.*, 1997).

### **1.2.1. Der Tat-abhängige Proteintransport (*twin-arginine translocation*)**

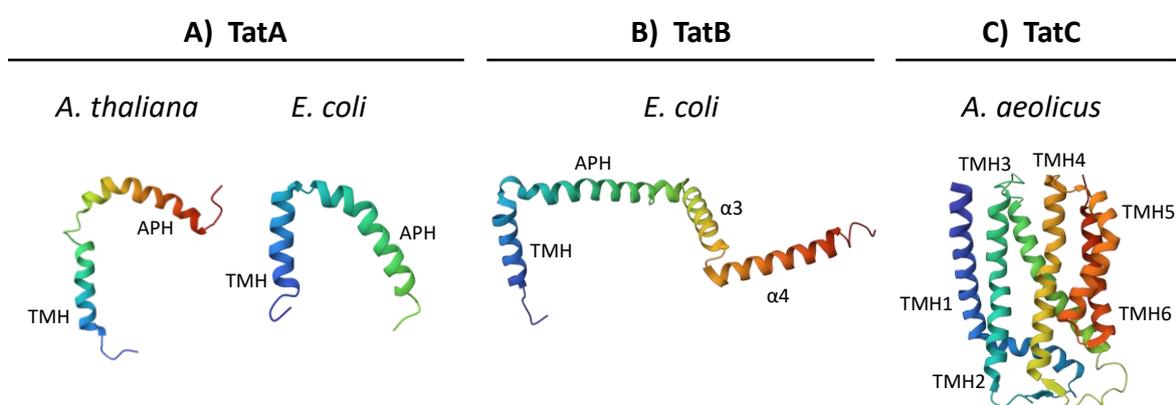
Die Tat-Translokase wurde erstmals in der plastidären Thylakoidmembran beschrieben und aufgrund ihrer Abhängigkeit von einem transmembranen Protonengradient als  $\Delta$ pH-abhängiger Transport bezeichnet (Klöggen *et al.*, 1992). Mit der Identifizierung eines hochkonservierten und vermeintlich unverzichtbaren Zwillingsarginin-Erkennungsmotivs (RR) erfolgte eine Umbenennung zum *twin arginine translocation pathway* (Tat) (Chaddock *et al.*, 1995). Die herausragende Besonderheit der Tat-Translokase ist ihre Fähigkeit, Proteine verschiedenster Größe im komplett gefalteten Zustand (auch inklusive inserierter Cofaktoren) durch die Membran zu transportieren, ohne dabei die

Membranintegrität ausschlaggebend zu beeinträchtigen (Clark und Theg, 1997, Marques *et al.*, 2004). Die Aktivität von Tat beschränkt sich hierbei jedoch nicht nur auf gefaltete Proteine, denn grundsätzlich können auch ungefaltete und artifizielle Substrate (sofern ein Tat-Signalpeptid vorhanden ist) mittels Tat-System transportiert werden (Roffey und Theg, 1996, Dittmar *et al.*, 2014, Schlesier und Klösigen, 2015). Tat-Translokasen konnten bereits in Bakterien, Archaeen und den endosymbiontischen Organellen eukaryotischer Zellen nachgewiesen werden (Klösigen *et al.*, 1992, Sargent *et al.*, 1999, Rose *et al.*, 2002, Jacob *et al.*, 2004). In Prokaryoten dient es dem Export zytoplasmatischer Proteine in das Periplasma, bzw. die Zellumgebung, und wurde vor allem an *Escherichia coli* eingehend studiert (Frain *et al.*, 2019b). Cyanobakterien besitzen zudem ein weiteres Tat-System in der Thylakoidmembran (Aldridge *et al.*, 2008, Barnett *et al.*, 2011), aus welchem vermutlich die thylakoidäre Tat-Translokase der Chloroplasten hervorgegangen ist. Auch die Mitochondrien von Jakobiden und höheren Pflanzen verfügen über ein funktionales Tat-System, welches vermutlich auf das entsprechende Exportsystem der Alphaproteobakterien zurückgeht (Jacob *et al.*, 2004, Schäfer *et al.*, 2020).

#### **1.2.1.1. Untereinheiten und Komplex-Zusammensetzung der Tat-Translokase**

Die meisten Tat-Systeme nutzen zwei Vertreter der TatAB-Proteinfamilie sowie einen essentiellen Vertreter der TatC-Familie (Yen *et al.*, 2002, Wu *et al.*, 2000). Eine derartige Konstellation besitzen auch die thylakoidären Tat-Systeme, welche aus den kerncodierten Untereinheiten TatA (Tha4), TatB (Hcf106) und TatC (cpTatC) zusammengesetzt sind (Walker *et al.*, 1999, Settles *et al.*, 1997, Motohashi *et al.*, 2001). Das minimale Tat-System, bestehend aus TatA und TatC, wurde in Archaea, Grampositiven Bakterien und den Mitochondrien von Jakobiden identifiziert (Pohlschröder *et al.*, 2005, Barnett *et al.*, 2008, Petrů *et al.*, 2018), wohingegen *E. coli* sogar über ein weiteres Protein der TatAB-Familie verfügt (ein zu TatA funktional ähnliches TatE-Protein) (Chanal *et al.*, 1998, Baglieri *et al.*, 2012). Proteine der TatAB-Familie haben grundsätzlich einen ähnlichen Aufbau und lassen sich in verschiedene charakteristische Abschnitte gliedern: ein kurzer N-terminaler Bereich, gefolgt von einer Transmembranhelix (TMH), welche über eine Gelenk-Region mit der amphipathischen Helix (APH) und einer daran anschließenden, wenig konservierten C-terminalen Region (CTR) verbunden ist (Schema siehe Abb. I.3 A/B, De Leeuw *et al.*, 2001, Zhang *et al.*, 2014b, Zhang *et al.*, 2014c). Im Vergleich zu TatA besitzt TatB eine längere APH und eine CTR mit zwei zusätzlichen Helices, was strukturell das eindeutigste Unterscheidungsmerkmal darstellt (Walker *et al.*, 1999, Zhang *et al.*, 2014c). Aus dem Aufbau von TatAB-Proteinen ergibt sich nach der Membraninsertion eine etwa „L“-förmige Struktur mit dem N-Terminus auf der *trans*-Seite, also in Transportrichtung gewandt, und dem C-Terminus dementsprechend auf der *cis*-Seite der Membran (Lee *et al.*, 2006, Koch *et al.*, 2012).

TatC ist ein polytopisches Membranprotein mit insgesamt sechs TMHs, welche über *cis*- und *trans*-gelegene Brücken-Regionen miteinander verbunden sind (Schema siehe Abb. I.3 C, Rollauer *et al.*, 2012). Sowohl N- als auch C-Terminus befinden sich auf der *cis*-Seite der Membran (Punginelli *et al.*, 2007). Im Ruhezustand der Tat-Translokase liegen Heterooligomere aus TatB und TatC vor, welche den stabilen TatBC-Rezeptorkomplex ausbilden (Cline und Mori, 2001, Fincher *et al.*, 2003). TatB und TatC liegen hier in einem äquimolaren Verhältnis mit vermutlich jeweils sechs Molekülen vor (Bolhuis *et al.*, 2001, Dissertation Reimers, 2020). Das Molekulargewicht dieser Komplexe bewegt sich, je nach verwendetem Detergens, in *E. coli* zwischen 350 – 600 kDa (siehe z. B. McDevitt *et al.*, 2006, Cléon *et al.*, 2015, Wojnowska *et al.*, 2018) und in Chloroplasten zwischen 550 – 700 kDa (siehe z. B. Berghöfer und Klösigen, 1999, Fincher *et al.*, 2003, Jakob *et al.*, 2009). Losgelöst vom Rezeptorkomplex kann TatA in Form von Homooligomeren in der Membran verankert vorliegen oder zusätzlich in einer löslichen Fraktion nachgewiesen werden, wobei die Funktion und Relevanz beider Fraktionen weiterhin diskutiert wird (Gohlke *et al.*, 2005, Rodriguez *et al.*, 2013, Frielingsdorf *et al.*, 2008, Hauer *et al.*, 2017). Nach erfolgter Substratbindung an den Rezeptorkomplex wird TatA aus einer oder mehreren der genannten Fraktionen rekrutiert und assoziiert mit dem Rezeptor-Substrat-Komplex, um die Proteintranslokation letztlich auszulösen (Mori und Cline, 2002, Alami *et al.*, 2003). Vermutlich liegt hierbei ein TatA:TatB:TatC-Verhältnis von 1:1:1 vor (Hauer *et al.*, 2013, Zinecker *et al.*, 2020). Allerdings lassen sich die aktiven Translokasen, aufgrund der wohl nur sehr schwachen Assoziation von TatA an den Rezeptorkomplex und dessen Tendenz während der Präparation zu dissoziieren, strukturell und funktional kaum untersuchen.

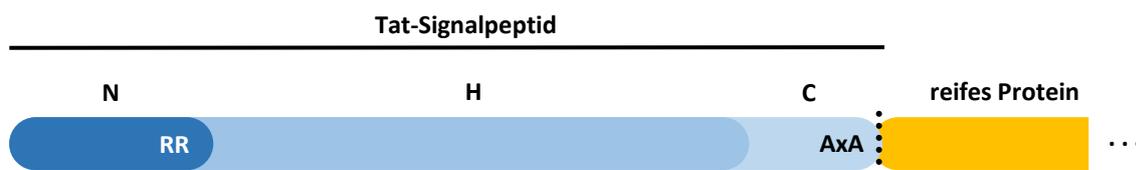


**Abb. I.3: 3D-Proteinstruktur der Tat-Untereinheiten.**

**A** Darstellung von TatA aus *Arabidopsis thaliana* (PDB: 7B7O) und *E. coli* (PDB: 2MN7) nach NMR-Strukturdaten von Pettersson *et al.* (2018) und Zhang *et al.* (2014b). **B** Darstellung von TatB aus *E. coli* (PDB: 2MI2) nach NMR-Strukturdaten von Zhang *et al.* (2014c). **C** Darstellung von TatC aus *Aquifex aeolicus* (PDB: 4B4A) nach Röntgenkristallographie-Daten von Rollauer *et al.* (2012). Die Daten enthalten keine löslichen N- und C-terminalen Regionen. Gekennzeichnet sind Transmembranhelices (TMH) und amphipathische Helices (APH,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ).

### 1.2.1.2. Aufbau und Funktion Tat-spezifischer Signalpeptide

Grundsätzlich besitzen Tat-Signalpeptide einen sehr ähnlichen Aufbau wie die Sec-spezifischen Signalpeptide und treten in der Regel als helikale, N-terminal gelegene Verlängerung des reifen Proteins auf, welche die Protein-Translokation über mehrere Teilschritte vermitteln (San Miguel *et al.*, 2003, Kerth *et al.*, 2012). Tat-Signalpeptide besitzen in der Regel ebenfalls die typische dreiteilige (N-H-C)-Struktur prokaryotischer Signalpeptide und lassen sich grob in folgende Abschnitte gliedern: eine positiv geladene N-Domäne am N-Terminus, eine hydrophobe H-Domäne im Zentrum und eine polare C-Domäne am C-Terminus (Schema siehe Abb. I.4, von Heijne, 1990, Hou und Brüser, 2011). Trotz der großen Ähnlichkeiten von Sec- und Tat-Signalpeptiden können dennoch beide Substratgruppen effizient differenziert werden (Robinson *et al.*, 1994), was insbesondere durch ein N-terminales Zwillingsarginin-Motiv (RR) und zusätzliche, positiv geladene Reste im Signalpeptid (auch als *Sec-avoidance motif* bezeichnet) von Tat-Substraten gewährleistet wird (Chaddock *et al.*, 1995, Bogsch *et al.*, 1997). Die namensgebenden Zwillingsarginin-Reste (RR) der Tat-Signalpeptide befinden sich in der N-Domäne und sind Teil der Konsensussequenzen von bakteriellen Tat-Signalpeptiden (SRRxFLK, mit einer polaren Aminosäure oder G anstelle von x) und plastidären Tat-Signalpeptiden (RRxX[L/M], mit einer polaren Aminosäure oder G anstelle von x und einer hydrophoben Aminosäure anstelle von X) (Stanley *et al.*, 2000, Peltier *et al.*, 2000). Mit Ausnahme der Rieske-Proteine (KR) besitzen alle bisher bekannten Tat-Substrate ein RR-Motiv, welches wohl maßgeblich an einer spezifischen und effizienten Erkennung durch den Tat-Rezeptorkomplex beteiligt ist (Stanley *et al.*, 2000, McDevitt *et al.*, 2006). Allerdings scheint auch die direkt an das RR-Motiv anschließende H-Domäne von entscheidender Bedeutung zu sein, da artifizielle Proteine mit ausreichend hoher Hydrophobizität der H-Domäne auch ohne ein RR-Motiv mittels Tat transportiert werden können (Huang und Palmer, 2017, Ulfing *et al.*, 2017). Tatsächlich scheint eine Vielzahl von Motiven und Eigenschaften an der Translokation von Tat-Substraten beteiligt zu sein, wobei vermutlich die Gesamtheit und weniger ein spezifischer Faktor ausschlaggebend ist (Cristóbal *et al.*, 1999, Hou *et al.*, 2006, Schünemann, 2007). Die polare C-Domäne enthält in der Regel eine Prozessierungsstelle, an



**Abb. I.4: Schematische Darstellung zum Aufbau eines klassischen Tat-Signalpeptides.**

Tat-Signalpeptide setzen sich aus einer insgesamt positiv geladenen N-Domäne (N) am Amino-Terminus, einer zentral gelegenen hydrophoben H-Domäne (H) sowie einer C-terminalen und insgesamt polaren C-Domäne (C) zusammen. Gekennzeichnet sind das Tat-charakteristische RR-Motiv in der N-Domäne sowie das Erkennungsmotiv (AxA) und die Schnittstelle (schwarz gepunktet) der Prozessierungspeptidase.

deren Position das Signalpeptid nach erfolgtem Proteintransport abgetrennt wird, woraufhin das reife Protein freigesetzt auf der *trans*-Membranseite vorliegt (Frielingsdorf und Klösigen, 2007, Lüke *et al.*, 2009). Das Signalpeptid verbleibt hierbei zunächst in der Membran und wird anschließend degradiert (Dissertation Fan, 2008). In einigen Ausnahmefällen kann das Tat-Signal allerdings, wie beispielsweise an den Rieske-Proteinen zu sehen, fester Bestandteil des funktionellen Proteins sein und zusätzlich zum Transportsignal eine Funktion als Membrananker besitzen (Molik *et al.*, 2001, Hatzixanthis *et al.*, 2003). Proteine mit einer solchen Signalankerdomäne (SAD) werden nach ihrer Translokation vermutlich lateral aus dem Komplex entlassen und so in der Membran verankert (Dissertation Kungel, 2020).

### **1.2.1.3. Postulierte Transportmechanismen der Tat-Translokation**

Als Energiequelle wird zur Proteintranslokation mittels Tat-System lediglich die protonenmotorische Kraft (PMK) entlang der Membran benötigt, wohingegen beispielsweise die Hydrolyse von Nucleosidtriphosphaten wie ATP oder GTP nicht erforderlich ist (Mould und Robinson, 1991, Cline *et al.*, 1992). Wie bereits erwähnt, wurde hierbei zu Beginn besonders der  $\Delta\text{pH}$  als ausschlaggebende Komponente der PMK angesehen, allerdings konnte später auch das elektrochemische Membranpotential, also  $\Delta\Psi$ , als mögliche Energiequelle aufgezeigt werden (Finazzi *et al.*, 2003, Braun *et al.*, 2007). Für eine ablaufende Translokation sind bereits geringe Differenzen im pH-Wert zwischen 0,7 und 2 Einheiten ausreichend, um eine Protein-Translokation voranzutreiben (Alder und Theg, 2003). Die PMK wird über den gesamten Translokations-Prozess hinweg benötigt, allerdings lassen sich im Energiebedarf zwei Phasen unterscheiden, welche möglicherweise die Substratbindung bzw. Einleitung des Transportes (ein kurzer und substratunabhängiger Bedarf) und den eigentlichen Translokationsvorgang (ein längerer und substratabhängiger Bedarf) repräsentieren könnten (Alder und Theg, 2003, Bageshwar und Musser, 2007). Da es während der Membranpassage des Substrates zu keinem Zeitpunkt zum unkontrollierten Ausstrom von Protonen kommen darf, kann eine stabile Translokationspore im Falle der Tat-Translokation ausgeschlossen werden (Teter und Theg, 1998, Teter und Klionsky, 1999). Wie genau jedoch der Transport mittels Tat-System abläuft, ist bislang nicht abschließend geklärt, sodass zu diesem Zeitpunkt lediglich Hypothesen und potentielle Modelle vorgestellt werden können:

#### **Die Ausbildung einer transienten TatA-Pore**

Eine vergleichsweise frühe Theorie sieht die Rolle von TatA in der Ausbildung einer transienten Translokationspore, welche durch die Anzahl an beteiligten TatA-Molekülen flexibel an das jeweilige Substrat angepasst werden kann (Berks *et al.*, 2000, Gohlke *et al.*, 2005). Besonders die in *E. coli* bis zu

25-fach höhere Menge an TatA (im Vergleich zu TatB/TatC) scheint diese Hypothese zu stützen (Sargent *et al.*, 2001, Celedon und Cline, 2012). Da ein derartiges Mengenverhältnis jedoch nicht für alle Organismen zutrifft und auch der aktive Tat-Komplex vermutlich äquimolare Mengen TatA, TatB und TatC enthält, scheint dieses Transport-Modell jedoch eher unwahrscheinlich (Jakob *et al.*, 2009, Hauer *et al.*, 2013, Zinecker *et al.*, 2020). Tatsächlich konnte zudem bislang kein Einfluss der Substratgröße auf die erforderliche Menge TatA gezeigt werden (Leake *et al.*, 2008).

### **Eine lokale Schwächung der Membran**

Da die TMH von TatA zu kurz ist, um Biomembranen komplett zu durchspannen, liegt auch die Gelenk-Region und ein Teil der APH innerhalb der Membran (Rodriguez *et al.*, 2013, Pettersson *et al.*, 2018). Die Bindung eines Substrates an den TatBC-Rezeptorkomplex führt zu einem „Anheben“ der APH von TatA, sodass auch dessen TMH tiefer in die Membran gezogen und diese an entsprechender Position verjüngt wird (Aldridge *et al.*, 2012, Hou *et al.*, 2018). Daraus ergibt sich die Möglichkeit, dass eine lokale Schwächung der Membran den Durchtritt des Substrates erlaubt (Hou *et al.*, 2018, Brüser und Sanders, 2003).

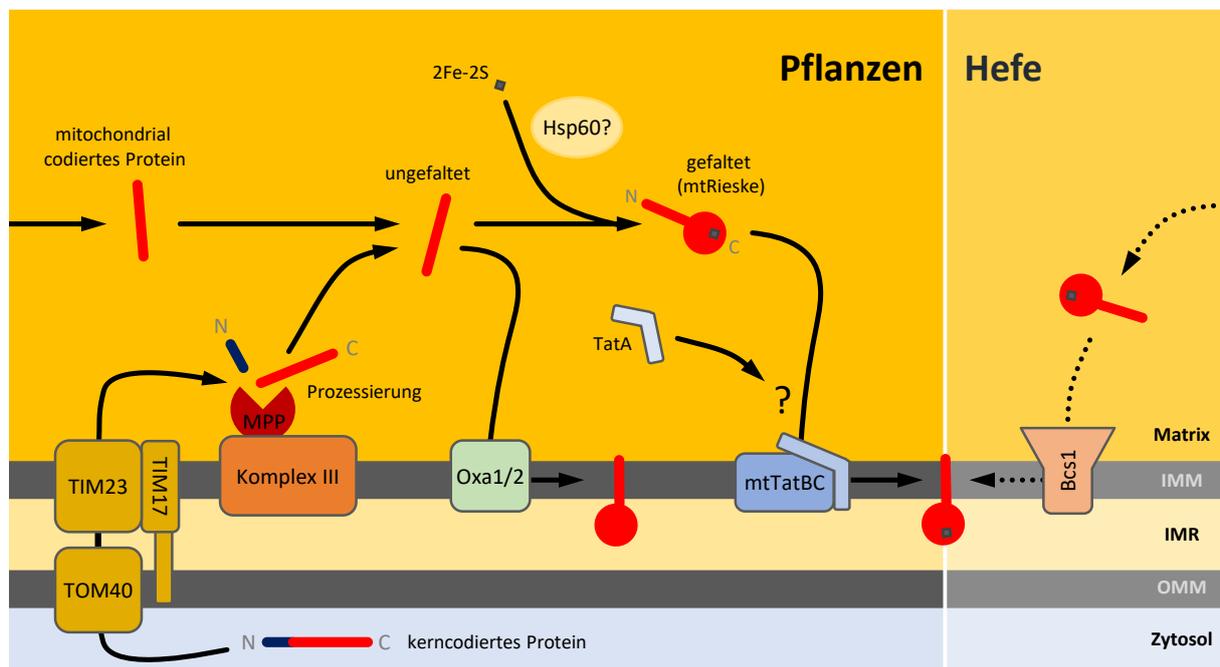
### **TatA als Katalysator/Coenzym**

TatA könnte außerdem als eine Art Aktivator für die Tat-abhängige Translokation dienen und somit die Funktion eines Coenzym übernehmen, was experimentell durch Transportanalysen in Abhängigkeit der TatA-Konzentration überprüft wurde (Hauer *et al.*, 2013). TatA zeigte in diesen Versuchen klare coenzymatische Eigenschaften und wird, wie bereits angesprochen, vermutlich in äquimolaren Mengen im aktiven Transport-Komplex benötigt, was ebenfalls für eine katalytische Funktion von TatA sprechen könnte (Hauer *et al.*, 2013, Zinecker *et al.*, 2020). In einem solchen Szenario wäre der Transportmechanismus zum Beispiel mit einer potentiellen Konformationsänderung des Tat-Komplexes erklärbar (Fröbel *et al.*, 2012a, Rollauer *et al.*, 2012, Geise *et al.*, 2019).

## **1.3. Proteintransport in die innere mitochondriale Hüllmembran**

In Mitochondrien muss ebenfalls eine Vielzahl von Proteinen von der Matrix ausgehend weitertransportiert werden (Schema siehe Abb. I.5). Auch die mitochondrialen Transportkomplexe der inneren Hüllmembran zum Re-Export neu importierter (oder zum Export mitochondrial codierter) Proteine sind, wie im Falle der thylakoidären Proteintransporter, hauptsächlich aus prokaryotischen Exportmaschinerien hervorgegangen. Von den mitochondrialen Vorläufern ist allerdings nur YidC in

Form der orthologen Oxa-Proteine hochkonserviert und in den Mitochondrien aller Eukaryoten vorhanden (Szyrach *et al.*, 2003). Oxa1 ist hierbei die Hauptkomponente des OXA-Komplexes (*oxidase assembly*) (Kermorgant *et al.*, 1997, Herrmann *et al.*, 2003), welcher für die Faltung und Insertion der meisten Proteine der inneren Hüllmembran zuständig ist (Bonnefoy *et al.*, 2009, Fox, 2012). Dies geschieht entweder posttranslational, oder durch eine direkte Interaktion mit mitochondrialen Ribosomen in einem cotranslationalen Prozess (Hell *et al.*, 2001, Ott und Herrmann, 2010). Mit Oxa2 gibt es in den Mitochondrien von Pflanzen ein weiteres Ortholog, jedoch mit einer zu Oxa1 abweichenden Funktion. Diese ergibt sich vermutlich aus der Präsenz von vier TPR-Strukturmotiven (*tetratricopeptide repeat*) (Zhang *et al.*, 2009), welche auf eine ähnliche Beteiligung an der Assemblierung der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) hindeuten, wie sie für das aus Hefe stammende Cox18 gezeigt werden konnte (Broadley *et al.*, 2001, Ghifari *et al.*, 2018). Beide Transporter, Oxa1 und Oxa2, transportieren ihre Substrate allerdings nur in linearer Form, weshalb für den Transport gefalteter Proteine die Notwendigkeit mindestens einer weiteren Translokase besteht.



**Abb. I.5: Schematische Darstellung zum Export bzw. Re-Export mitochondrialer Membranproteine aus der Matrix.**

In Pflanzen werden mitochondrial bzw. im Kern codierte Proteine der inneren mitochondrialen Hüllmembran entweder in ungefalteter Form über Oxa1 bzw. Oxa2 in die Membran inseriert und anschließend gefaltet oder, wie im konkreten Fall von mtRieske, nach erfolgter Cofaktor-Insertion (2Fe-2S) und Proteinfaltung in komplett gefalteter Form über das mtTat-System transloziert. In Hefe wurde mtTat funktional durch das Bcs1-System ersetzt. IMM = innere mitochondriale Hüllmembran, IMR = Intermembranraum, OMM = äußere mitochondriale Hüllmembran.

Ein funktionales mitochondriales Tat-System (mtTat) für den Transport gefalteter Proteine konnte bislang nur in den Mitochondrien von Jakobiden (einer Gruppe sehr früher Eukaryoten) und höheren

Pflanzen nachgewiesen werden (Jacob *et al.*, 2004, Petrů *et al.*, 2018, Carrie *et al.*, 2016, Schäfer *et al.*, 2020). In den Mitochondrien mehrzelliger Tiere, Pilze und nahverwandter Einzeller (als Opisthokonta zusammengefasst) wurde allerdings das bakteriell „vererbte“ mtTat-System durch eine neu etablierte Translokase ersetzt (Carrie *et al.*, 2016, Petrů *et al.*, 2018). Es handelt sich hierbei um Bcs1 (*cytochrome bc<sub>1</sub> synthase*), ein Protein der AAA-Familie (*ATPases Associated with diverse cellular Activities*), welches ebenfalls zum Transport gefalteter Proteine in der Lage ist (Wagener und Neupert, 2012). Eine detaillierte Beschreibung der mitochondrialen Tat- und Bcs1-Systeme folgt in den Kapiteln 1.4.1 und 1.4.2. Es ist eine bemerkenswerte Feststellung, dass der Verlust mtTat-spezifischer Gene nur mit der Etablierung eines alternativen Transportsystems einhergehen konnte, und dass Organismen ohne ein komplettes Bcs1-System weiterhin auf eine mtTat-Translokase angewiesen sind. Dies zeigt eindrücklich, wie fundamental und essentiell der mtTat- und Bcs1-vermittelte Transport gefalteter Proteine für die Vitalität nahezu aller eukaryotischen Organismen ist.

#### **1.4. Membrantransport gefalteter Proteine**

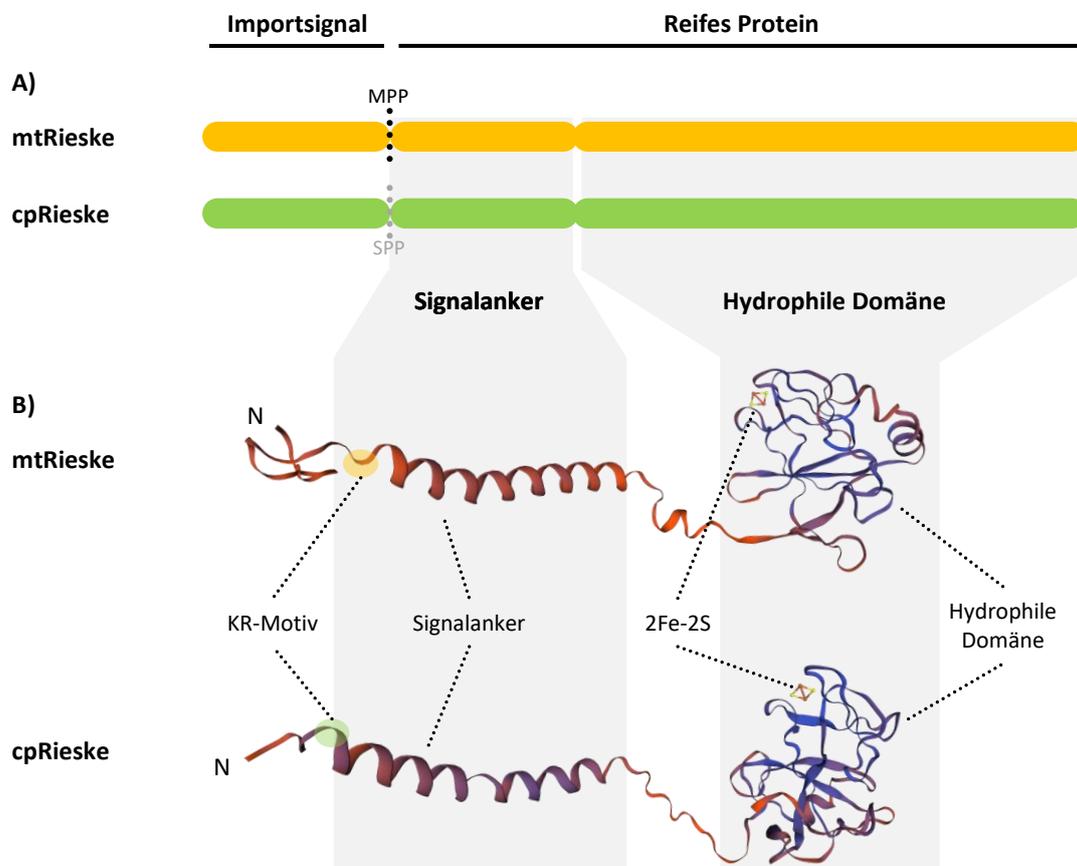
Tatsächlich stellt der Transport gefalteter Proteine durch eine oder mehrere Biomembranen keine Ausnahme dar und kann beispielsweise in Bakterien, Chloroplasten und pflanzlichen Mitochondrien als Proteinexport durch das Tat-System vermittelt werden (Schäfer *et al.*, 2020, Müller und Klösgen, 2005). Ein ähnliches System existiert in den Mitochondrien der meisten Opisthokonta in der Form von Bcs1 (Wagener und Neupert, 2012, Carrie *et al.*, 2016). In Eukaryoten gibt es allerdings eine Reihe weiterer Transporter und Mechanismen, die den Transport gefalteter Proteine ermöglichen. Hierzu zählen der Kernporenkomplex (NPC), durch welchen beispielsweise gefaltete Histon-Proteine in den Zellkern gelangen (Beck und Hurt, 2017, Bernardes und Chook, 2020), die als „unkonventionelle Proteinsekretion“ (UPS) zusammengefassten Mechanismen zur Sekretion von Proteinen in die Zellumgebung (Cohen *et al.*, 2020, Backhaus *et al.*, 2004) und der Import zytosolisch synthetisierter Proteine in die Peroxisomen mittels peroxisomaler Importmaschinerie (PIM) (Kim und Hetteema, 2015, Léon *et al.*, 2006). Doch auch virale Proteine dürfen während der Infiltration einer Wirtszelle nicht entfaltet werden, um die Virulenz zu erhalten (Pei und Dalbey, 2022). Einige bakterielle Toxine infiltrieren eukaryotische Zellen vermutlich ebenfalls in gefaltetem Zustand, wobei Bakterien hierzu verschiedene Sekretionssysteme (z. B. T2SS und T9SS) nutzen (Korotkov und Sandkvist, 2019, Lauber *et al.*, 2018). Die postulierten und teilweise nachgewiesenen Mechanismen reichen hierbei von der Ausbildung stabiler oder transientser Poren über die lokale Zerstörung oder Schwächung der Membran bis hin zum Transport durch Membranvesikel (zusammengefasst in Pei und Dalbey, 2022).

Der Transport gefalteter Proteine ist insofern essentiell, als dass eine Vielzahl von Proteinen entweder am Zielort keine Faltung mehr durchlaufen können, oder weil sie aufgrund einer schnellen Faltungskinetik oder der Insertion funktionell relevanter Cofaktoren (z. B. Molybdopterin, FAD oder verschiedene Metalle) bereits vor der Translokation eine gefaltete Konformation aufweisen (Weiner *et al.*, 1998, Fröbel *et al.*, 2012b, Berks *et al.*, 2005). In manchen Fällen bilden die zu translozierenden Substrate sogar ganze Proteinkomplexe, bevor sie über die Membran transportiert werden (Glover *et al.*, 1994, Fröbel *et al.*, 2012b). Eine besonders bedeutsame Substratgruppe stellen die Rieske-Fe/S-Proteine dar, welche aufgrund eines [2Fe-2S]-Clusters im gefalteten Zustand transportiert werden müssen.

#### 1.4.1. Die Rieske-Fe/S-Proteine

Die ubiquitär verbreiteten Rieske-Proteine bilden eine zentrale Untereinheit eukaryotischer und prokaryotischer Cytochrom-*bc*<sub>1</sub>- und Cytochrom-*b<sub>6</sub>f*-Komplexe und wurden erstmals von Rieske *et al.* (1964) beschrieben (Riedel *et al.*, 1991, Trumppower und Gennis, 1994). Innerhalb dieser Oxidoreduktasen fungieren sie als essentielle Elektronenüberträger der respiratorischen bzw. photosynthetischen Elektronentransportkette (Cramer *et al.*, 2011, Baniulis *et al.*, 2009) und tragen durch die Etablierung eines elektrochemischen Membranpotentials zur Synthese von ATP bei. Pflanzenzellen besitzen zwei homologe Rieske-Fe/S-Proteine, von welchen eines chloroplastidär und ein weiteres mitochondrial lokalisiert ist (im weiteren Verlauf der Arbeit auch als cpRieske und mtRieske bezeichnet). Diese Homologe besitzen einige Gemeinsamkeiten in Bezug auf ihre Biogenese, Struktur und Funktion: Beide Proteine sind kerncodiert und werden über spezifische Transitpeptide zum entsprechenden Zielorganell transportiert und dort über die „klassischen“ Importmaschinerien (TOC/TIC bzw. TOM/TIM) in das chloroplastidäre Stroma bzw. die mitochondriale Matrix importiert (Hartl *et al.*, 1986, Salter *et al.*, 1992). Ebenfalls beiden Proteinen wird nach erfolgter Prozessierung ein [2Fe-2S]-Cluster als Cofaktor eingebaut (Kispal *et al.*, 1999, Balk und Pilon, 2011), worauf die C-terminale Faltung der Rieske-Proteine zu einer fast identischen Tertiärstruktur von mtRieske und cpRieske führt (Schema siehe Abb. I.6). Diese umfasst den globulär gefalteten C-Terminus inklusive [2Fe-2S]-Cluster und eine hierzu senkrecht abstehende Transmembrandomäne (TMD), welche nicht nur für die Verankerung der Rieske-Proteine in der Membran und im Proteinkomplex benötigt wird, sondern auch als Signal für einen Weitertransport dient (Madueño *et al.*, 1994, Carrie *et al.*, 2016). Man bezeichnet eine solche TMD daher auch als Signalankerdomäne (SAD), wobei die SAD von cpRieske und mtRieske aus Pflanzen einige charakteristische Eigenschaften von Tat-Signalpeptiden, inklusive eines Tat-ähnlichen Lysin-Arginin-Motivs (KR) direkt zu Beginn der TMD, aufweist (Hinsley *et al.*, 2001, Pett und Lavrov, 2013). Nach erfolgtem Transport im komplett gefalteten Zustand sind

beide Proteine, cpRieske und mtRieske, im jeweils vollständig assemblierten Oxidoreduktase-Komplex ähnlich positioniert und katalysieren dort die Elektronenübertragung (Baniulis *et al.*, 2009, Maldonado *et al.*, 2021).



**Abb. I.6: Schematischer Aufbau der Rieske-Fe/S-Proteine (mtRieske bzw. cpRieske) und ihre 3D-Proteinstruktur.**

**A** Schematischer Aufbau der mitochondrialen und chloroplastidären Rieske-Proteine. Ein N-terminales Importsignal vermittelt den Import in das jeweilige Zielorganell und wird nach erfolgtem Import durch die mitochondriale bzw. stromale Prozessierungspeptidase (MPP bzw. SPP) abgetrennt. Auf das Importsignal folgt das reife Protein, welches in eine Signalankerdomäne und die C-terminal gelegene hydrophile Domäne gegliedert werden kann. **B** 3D-Strukturen von mtRieske (UniProt: P37841) und cpRieske (UniProt: P08980) aus *Solanum tuberosum*, vorhergesagt mit SWISS-MODEL (Waterhouse *et al.*, 2018). Der helikale Signalanker fungiert einerseits als Transportsignal und trägt zur Erkennung ein charakteristisches Lysin-Arginin(KR)-Motiv (Position durch orangefarbenen bzw. - grünen Punkt angedeutet), andererseits dient er auch als Membrananker und somit der korrekten Positionierung und Verankerung des jeweiligen Proteins in der Membran bzw. dem Proteinkomplex. Die hydrophile Domäne bindet nach dem Import ein [2Fe-2S]-Cluster und wird anschließend globulär gefaltet.

#### 1.4.1.1. Das mitochondriale Rieske-Fe/S-Protein (mtRieske)

Während die Biogenese von mtRieske in Hefe- und Säugerzellen weitestgehend erforscht und beschrieben wurde, ist in Pflanzen hierzu bislang nur wenig bekannt. Es ist allerdings sehr

wahrscheinlich, dass die Transport- und Assemblierungsprozesse von mtRieske in Pflanzen (auch als UCR1-1 bezeichnet), Hefe (Rip1) und Säugern (UQCRC1) größtenteils übereinstimmen und sich hauptsächlich in den hieran beteiligten Faktoren unterscheiden (Carrie *et al.*, 2016).

Das im Zellkern codierte mtRieske wird zunächst im Zytosol als Vorläuferprotein (inklusive N-terminaler Präsequenz) synthetisiert und posttranslational durch die mitochondrialen Hüllmembranen via TOM/TIM-Maschinerie importiert (Hartl *et al.*, 1986). Vermutlich folgt in Pflanzenzellen als nächstes die Prozessierung durch die im Cytochrom- $bc_1$ -Komplex (Komplex III) integriert vorliegende MPP (Glaser und Dessi, 1999). In Hefe läuft die Prozessierung hingegen in zwei aufeinanderfolgenden Schritten ab: Zunächst durch die MPP und vermutlich erst nach der Assemblierung in Komplex III durch die mitochondriale Intermediat-Peptidase (MIP) (Hartl *et al.*, 1986, Graham *et al.*, 1994). In Säugerzellen erfolgt die Prozessierung von mtRieske wiederum in einem einzigen Schritt, allerdings wohl erst nach dessen Assemblierung in Komplex III (Brandt *et al.*, 1993). Interessanterweise wird diese Prozessierung wohl nicht durch die generelle MPP durchgeführt, welche in Säugern wie auch in Hefe in der Matrix gelöst vorliegt. Vergleichbar zur pflanzlichen MPP übernimmt vermutlich auch in Säugern der Komplex III-Kernkomplex, bestehend aus UQCRC1 und UQCRC2 (Homologe der  $\alpha$ -MPP- und  $\beta$ -MPP-Untereinheit), die Prozessierung von mtRieske (Berry *et al.*, 2013, Fernandez-Vizarra und Zeviani, 2018). Anschließend verbleibt das abgetrennte Transitpeptid jedoch in Komplex III und hemmt dessen weitere MPP-Aktivität (Iwata *et al.*, 1998, Deng *et al.*, 2001).

In jedem Fall erfolgt noch vor der Assemblierung in den Präkomplex die Bindung des mtRieske-Apoproteins an eines oder mehrere Chaperon-Proteine sowie die weitere Reifung zum mtRieske-Holoprotein. In Hefe wurde gezeigt, dass mtRieske in der Matrix vom Chaperon Mzm1 erkannt und gebunden wird (Cui *et al.*, 2012). Eine solche Rolle übernimmt in Säugetieren das homologe Mzm1L (Sánchez *et al.*, 2013), und auch Pflanzen besitzen wohl ein Mzm1-Homolog (Carrie *et al.*, 2016), dessen Funktion bislang noch nicht aufgeklärt wurde. Allerdings konnte in pflanzlichen Mitochondrien bereits eine Bindung von mtRieske an Hsp60 detektiert werden (diese Arbeit, Dissertation Rödiger, 2010, Dissertation Kungel, 2020), dessen Homolog Cpn60 auch in Chloroplasten an das importierte cpRieske bindet und an dessen weiterer Reifung beteiligt ist (Madueño *et al.*, 1993, Molik *et al.*, 2001). Mzm1 und Mzm1L besitzen ein LYR-Motiv, welches maßgeblich für die Rekrutierung und Bindung des Fe/S-Transferkomplexes der mitochondrialen ISC-Maschinerie (*iron-sulfur cluster*) verantwortlich ist (Maio *et al.*, 2014, Maio *et al.*, 2017). Cpn60 und Hsp60 besitzen kein derartiges Motiv, weshalb in pflanzlichen Organellen die Bindung eines Fe/S-Transferkomplexes durch weitere Chaperon-Proteine oder auf andere Weise erfolgen muss. Im nächsten Schritt wird ein [2Fe-2S]-Cluster auf den C-Terminus von mtRieske übertragen und dort in einem hochkonservierten Motiv (Cys-x-His-x<sub>15-17</sub>-Cys-x-x-His) von je zwei Cystein- und Histidinresten gebunden (siehe Anhang Abb. A.5, Iwata *et al.*, 1996). Im Anschluss

faltet der C-Terminus vermutlich unter Mitwirken der gebundenen Chaperon-Proteine zu einer globulären Tertiärstruktur, und das mtRieske-Holoprotein wird nun zu einer in der inneren Hüllmembran lokalisierten Translokase geleitet (Cui *et al.*, 2012). Dies ist im Falle pflanzlicher Mitochondrien das mtTat-System (Carrie *et al.*, 2016, Schäfer *et al.*, 2020) und in den Mitochondrien von Säugern und Hefe der Bcs1L- bzw. Bcs1-Komplex (Cruciat *et al.*, 1999, Fernandez-Vizarra *et al.*, 2007, Wagener *et al.*, 2011). Die genannten Translokasen assemblieren schließlich die mtRieske-Holoproteine in den bereits dimerisierten Präkomplex (Zara *et al.*, 2009), indem die SAD in die innere Hüllmembran verankert und der komplett gefaltete C-Terminus auf die *trans*-Seite der Membran transloziert wird (Wagener und Neupert, 2012, Schäfer *et al.*, 2020).

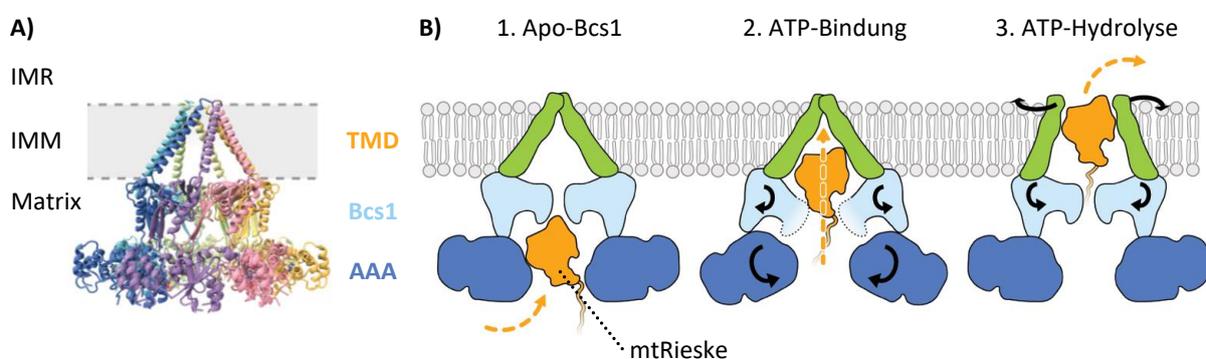
Im funktionalen Komplex III-Dimer katalysiert das mitochondriale Rieske-Protein die Oxidation von Ubichinol und die daran anschließende Reduktion von Cytochrom  $c_1$ , wobei das [2Fe-2S]-Cluster als initialer Elektronenakzeptor dient (Crofts, 2004). Durch den sogenannten Q-Zyklus ist der in Komplex III ablaufende Elektronentransfer zudem an einen gerichteten Transport von Protonen in den Intermembranraum gekoppelt (Trumpower, 1990, Cramer *et al.*, 2011). Der auf diese Weise entlang der inneren Hüllmembran erzeugte elektrochemische Gradient wird von der ATP-Synthase genutzt, um aus ADP und Phosphat das Energieäquivalent ATP zu generieren (Capaldi *et al.*, 1994).

#### **1.4.1. Das mitochondriale Bcs1-Transportsystem (*cytochrome bc<sub>1</sub> synthesis*)**

In Opisthokonta erfolgt der Transport und die Assemblierung des gefalteten mtRieske-Holoproteins in den Komplex III über das Bcs1-System (Wagener *et al.*, 2011). Bcs1 gehört zur Familie der AAA-Proteine (*ATPases Associated with diverse cellular Activities*) (Frickey und Lupas, 2004), deren Vertreter in Eukaryoten an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt sind, so auch an der Qualitätskontrolle und Homöostase von Proteinen (bspw. durch deren Entfaltung, Degradation, Prozessierung und Reifung) (Sauer *et al.*, 2004, Truscott *et al.*, 2010). Bcs1 im speziellen ist in den Mitochondrien von Hefen und Säugern (hier Bcs1L genannt) durch den Transport der mtRieske-Fe/S-Untereinheit essentiell an der korrekten Assemblierung von Komplex III beteiligt (Nobrega *et al.*, 1992, Petruzzella *et al.*, 1998, Wagener *et al.*, 2011). Neueste Erkenntnisse belegen eine derartige Funktion von Bcs1 auch in Invertebraten, und in filamentösen Pilzen können ebenfalls Bcs1-homologe Proteine (Bbbcs1c) mit einer vermutlich ähnlichen Funktion nachgewiesen werden (Brischigliaro *et al.*, 2021, Hou *et al.*, 2023). Tatsächlich lässt sich in den Genomen nahezu aller Opisthokonta ein Gen zur Expression eines vollständigen Bcs1-Homologs identifizieren (Wagener und Neupert, 2012, Carrie *et al.*, 2016). Interessanterweise geht das Auftreten von Bcs1 in den Mitochondrien von Opisthokonta mit einem

Verlust des mitochondrialen Tat-Systems einher, was mit großer Wahrscheinlichkeit in der sich überschneidenden Funktion begründet liegt (Wagener *et al.*, 2011, Carrie *et al.*, 2016).

Der Bcs1-Komplex ist, wie andere AAA-ATPasen auch, ein membranintegraler Homooligomer (Khan *et al.*, 2022). Das einzelne Bcs1-Protein besitzt eine kurze N-terminale Region im Intermembranraum, eine daran anschließende TMD, gefolgt von einer Bcs1-spezifischen Substrat-Bindedomäne und einer vergleichsweise großen und in die Matrix ragenden AAA-Domäne am C-Terminus (Siehe Abb. I.7 A, Nobrega *et al.*, 1992, Tang *et al.*, 2020). Um die Funktionsweise von Bcs1 zu verstehen, wurden detaillierte Strukturanalysen durchgeführt und einige Merkmale identifiziert, durch die sich Bcs1 von den meisten anderen AAA-ATPasen unterscheidet (Kater *et al.*, 2020, Tang *et al.*, 2020, Xia, 2021). So besitzt Bcs1 nur eine statt der typischerweise zwei AAA-Domänen. Zwischen dieser AAA-Domäne und der TMD befindet sich zudem eine Bcs1-spezifische Domäne, welche anstelle der für AAA-Bindedomänen charakteristischen *pore loop*-Regionen zwei Argininreste aufweist (Wagener und Neupert, 2012). Zudem formen Proteine der AAA-Familie in der Regel Hexamere, wohingegen Bcs1 einen homoheptameren Proteinkomplex bildet, was den Transport der gefalteten mtRieske-Ektodomäne vermutlich begünstigt (Tang *et al.*, 2020). Bei seitlicher Betrachtung der Bcs1-Translokase fallen zwei große Hohlräume im Komplex auf, einer auf Höhe der inneren Hüllmembran und ein weiterer auf der Matrixseite, geformt durch die AAA-Domänen (Kater *et al.*, 2020, Tang *et al.*, 2020, Xia, 2021). Knapp unterhalb der Hüllmembran werden beide Hohlräume durch die Bcs1-Domänen voneinander abgetrennt (Kater *et al.*, 2020). Die zur Energetisierung der Proteintranslokation erforderliche ATP-Hydrolyse führt zu einer Konformationsänderung im Bcs1-Komplex, durch welche sich deutliche Hinweise auf den möglichen Transportmechanismus ergeben (Schema siehe Abb. I.7 B,



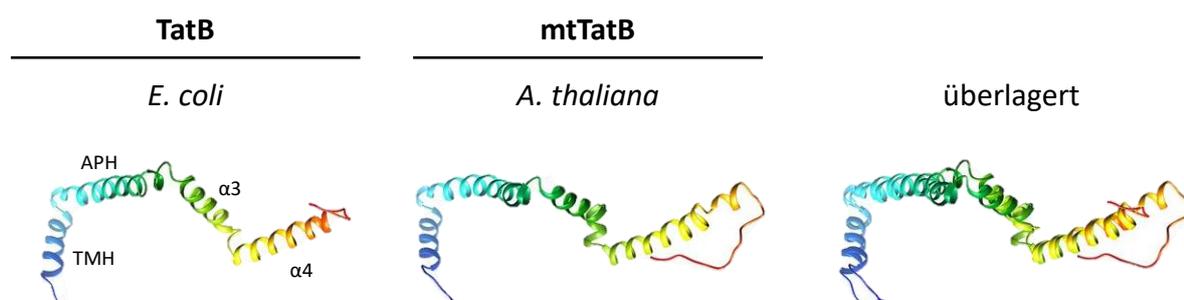
**Abb. I.7: Der Bcs1-Komplex: 3D-Struktur und schematische Darstellung zum vermuteten Proteintransport-Mechanismus.** **A** 3D-Komplexstruktur des homoheptameren Apo-Bcs1-Komplexes (PDB: 6SH4) aus *Saccharomyces cerevisiae* anhand von Kryo-EM-Aufnahmen von Kater *et al.* (2020). Das Monomere Protein setzt sich aus einer Transmembranhelix (TMD, orange), einer Bcs1-spezifischen Substrat-Bindedomäne (Bcs1, hellblau) und einer AAA-spezifischen ATPase-Domäne (AAA, dunkelblau) zusammen. **B** Schematische Darstellung des postulierten Transportmechanismus, einer Substrat- und ATP-abhängigen Konformationsänderung. Abbildungen modifiziert nach Kater *et al.* (2020). IMR = Intermembranraum, IMM = innere mitochondriale Hüllmembran.

Kater *et al.*, 2020, Tang *et al.*, 2020, Xia, 2021). Im ATP-ungebundenen oder ADP-gebundenen Zustand ist die Öffnung mit 35 – 40 Å groß genug, dass das gefaltete mtRieske-Protein mit einem Durchmesser von etwa 25 Å in den Matrix-zugewandten Hohlraum eintreten kann. Für Bcs1 sind bislang keine spezifischen Erkennungsmotive in der mtRieske-Sequenz bekannt und es wird von einer Erkennung anhand des gefalteten C-Terminus ausgegangen (Wagener *et al.*, 2011). Durch die Bindung von ATP an die jeweiligen AAA-Domänen und bei Erkennung der N-terminalen mtRieske-TMD kommt es zu einer Konformationsänderung im Komplex, durch welche der Hohlraum kontrahiert und dessen Matrix-zugewandte Öffnung sich auf 20 Å schließt (Wagener *et al.*, 2011, Tang *et al.*, 2020). Es wird angenommen, dass mtRieske in einem „schleusenähnlichen“ Mechanismus den Komplex und die Membran durchquert, und dass das simultane Öffnen und Schließen der einzelnen Komplexkammern die Barrierefunktion der Membran bewahrt (Kater *et al.*, 2020). Durch die Hydrolyse von ATP nimmt der Bcs1-Komplex wieder seine ursprüngliche Konformation ein und mtRieske wird lateral aus dem Komplex entlassen (Wagener *et al.*, 2011, Xia, 2021), wobei es durch eine Assoziation der Bcs1-Translokase an den Komplex III-Präkomplex eventuell zu einer direkten Assemblierung kommen könnte (Cruciat *et al.*, 1999, Zara *et al.*, 2007, Zara *et al.*, 2022). Um zu verstehen, wie genau mtRieske den Bcs1-Komplex durchquert und letztlich in den Komplex III-Präkomplex inseriert wird, sind in Zukunft jedoch weitere Untersuchungen erforderlich.

#### **1.4.2. Die mitochondriale Tat-Translokase (mtTat)**

Wahrscheinlich besaßen die ersten Mitochondrien früher Eukaryoten ein komplett mitochondrial codiertes Tat-System zum Transport gefalteter Proteine, welches auf die entsprechende Exportmaschinerie der Alphaproteobakterien zurückgeht (Nuñez *et al.*, 2012, Petrů *et al.*, 2018). Allerdings scheinen die mitochondrial codierten Tat-Untereinheiten sukzessive verloren gegangen und mitochondriale Tat-Systeme auf diese Weise in mehreren unabhängigen Ereignissen komplett verschwunden zu sein (Pett und Lavrov, 2013, Petrů *et al.*, 2018). Daher sind in eukaryotischen Genomen entweder keine mitochondrialen Tat-Untereinheiten mehr codiert, oder eine Reihe verschiedener Kombinationen identifizierbar, darunter mtTatBC, mtTatAC oder nur mtTatC (Petrů *et al.*, 2018). Im Gegensatz zu den in manchen Genomen alleine auftretenden mtTatC-Proteinen ist das mtTatAC-System des Jakobiden *Andalucia godoyi* dazu in der Lage, eine *TatABC*-Deletion in *E. coli* funktional zu komplementieren (Burger *et al.*, 2013, Petrů *et al.*, 2018). Dies legt eine mögliche Funktion von mitochondrialen TatAC-Systemen und einen generellen Funktionsverlust von mtTat in ausschließlich mtTatC-codierenden Organismen nahe.

In Opisthokonta ist, mit bislang nur zwei festgestellten Ausnahmen (Burger *et al.*, 2003, Wang und Lavrov, 2007), die Funktion einer mtTat-Translokase durch das bereits in Kapitel 1.4.1 beschriebene Bcs1-System übernommen worden und mtTat als Folge vollständig aus deren Genom verschwunden (Wagener *et al.*, 2011, Carrie *et al.*, 2016). Interessanterweise konnte jedoch in den Mitochondrien höherer Pflanzen eine funktionale mtTat-Translokase identifiziert werden, welche zunächst als potentiell mtTatBC-System beschrieben wurde (Carrie *et al.*, 2016). Für das kerncodierte TatA konnte erst später auch eine mitochondriale Lokalisierung nachgewiesen werden (Bennewitz *et al.*, 2020). Eine mitochondriale Funktion des dual lokalisierten TatA war zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht bekannt und ist eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit. Das in Pflanzen ebenfalls kerncodierte mtTatB besitzt kaum Sequenzähnlichkeit zu anderen TatB-Proteinen und wurde stattdessen aufgrund der auffälligen Strukturhomologie zu *E. coli*-TatB identifiziert (siehe Abb. 1.8, Carrie *et al.*, 2016). Einziger deutlicher Unterschied ist der im Falle von mtTatB verlängerte C-Terminus, welcher offenbar eine wichtige Rolle in der Proteintranslokation übernimmt, da C-terminal verkürzte mtTatB-Proteine dysfunktional sind (Carrie *et al.*, 2016, Schäfer *et al.*, 2020). Das mtTatC-codierende Gen im mitochondrialen Genom von *Arabidopsis thaliana* ist bereits seit 1994 als *open reading frame X (orfX)* bekannt (Sünkel *et al.*, 1994, Unseld *et al.*, 1997), wurde allerdings erst 2016, unter anderem aufgrund der aufwendigen Editierung des zugehörigen Transkripts, als funktionales und mtTatC-codierendes Gen identifiziert (Bentolila *et al.*, 2013, Carrie *et al.*, 2016). Die Tat-Translokase ist in pflanzlichen Mitochondrien in der inneren Hüllmembran lokalisiert und durch den Transport des mitochondrialen Rieske-Fe/S-Proteins, also der Insertion dessen SAD in die innere Hüllmembran und den Export des gefalteten C-Terminus in den Intermembranraum, an der Komplex III-Biogenese beteiligt und ein essentieller Assemblierungsfaktor (Carrie *et al.*, 2016, Schäfer *et al.*, 2020). Das mtTat-System zeigt hierbei allgemeine Charakteristika der Tat-abhängigen Protein-Translokation, da der Transport von mtRieske in Abhängigkeit von der PMK sowie in komplett gefaltetem Zustand abläuft und Mutationen



**Abb. 1.8: Vergleich der 3D-Proteinstrukturen von *E. coli* TatB und *A. thaliana* mtTatB.**

Vergleich der räumlichen Struktur von *E. coli* TatB (PDB: 2MI2) und dem modellierten mitochondrialen TatB (mtTatB) aus *A. thaliana*, modifiziert nach Carrie *et al.* (2016). Gekennzeichnet sind die Transmembranhelix (TMH) und amphipathische Helices (APH,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ).

im KR-Motiv die Transporteffizienz negativ beeinflussen (Carrie *et al.*, 2016). Neben mtRieske sind bislang keine weiteren mtTat-Substrate bekannt und es könnte sich dabei tatsächlich um das einzige mitochondriale Protein handeln, das zwingend auf einen gefalteten Transport angewiesen ist.

## 1.5. Zielstellung

Die in Mitochondrien ablaufenden Prozesse werden zum Großteil durch membrangebundene Proteinkomplexe katalysiert, deren Biogenese von einem effizienten Proteintransport in bzw. durch die innere Hüllmembran abhängig ist. Eine besondere Herausforderung stellt der essentielle Transport komplett gefalteter Proteine (wie bspw. dem mtRieske-Fe/S-Protein) dar und erfordert spezialisierte Translokasen. In den Mitochondrien nahezu aller Opisthokonta übernimmt diese Funktion das Bcs1-System, welches die bereits bestehende mtTat-Translokase in diesen Organismen funktional ersetzt hat. Bemerkenswerterweise sind pflanzliche Mitochondrien hingegen weiterhin auf ein mitochondriales Tat-System (mtTat) angewiesen, dessen Untersuchung und Charakterisierung das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war.

Hierzu musste zunächst ein geeignetes System zur direkten Untersuchung des mtTat-spezifischen Protein-Exportes etabliert werden. Zwei verschiedene Ansätze wurden hierbei verfolgt: 1. Die Präparation aktiver und invertierter, submitochondrialer Vesikel. 2. Die Cystein-Modifizierung potentieller mtTat-Substrate mithilfe Thiol-reaktiver Reagenzien. Untersucht wurden insbesondere die Energetisierung und der zeitliche Verlauf der mtTat-Translokation, die potentielle Funktion von mitochondrial lokalisiertem TatA, die Bedeutung eines Tat-Erkennungsmotivs und die Kompatibilität des pflanzlichen mtTat-Systems mit mtRieske-Proteinen verschiedener Opisthokonta-Spezies (Bcs1-Substraten). Anschließend wurden die Signalankerdomänen der mtRieske-Proteine aus Pflanzen und Opisthokonta vergleichend gegenübergestellt und die hierbei festgestellten Unterschiede mit der Etablierung von Bcs1 sowie dem damit einhergehenden Verlust von mtTat in Verbindung gebracht und diskutiert.

## 2. Material & Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Chemikalien

Die Chemikalien wurden in *p. a.*-Reinheit von den Firmen Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf), GE Healthcare (Chicago, IL, USA), Merck (Darmstadt, inklusive Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)), Carl Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) bezogen.

#### 2.1.2. Thiol-reaktive Reagenzien

Typ	Molekulargewicht	Hersteller
MalPEG (Methoxypolyethylenglycol-maleimid)	750 Da, 5 kDa, 10 kDa	Sigma-Aldrich
AMS (4-Acetamido-4'-Maleimidylstilben-2,2'-disulfonsäure)	540 Da	Invitrogen (Waltham, MA, USA)
MCCB (4-( <i>N</i> -Maleinimidomethyl)-cyclohexan-1-carbonsäurebradykininester)	1,2 kDa	Dr. Mario Jakob (AG Klösgen)

#### 2.1.3. Größenstandards

Typ	Bezeichnung	Hersteller
DNA	1 kB <i>plus DNA Ladder</i>	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
Protein (SDS-Gel)	PageRuler™ <i>Prestained Protein Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific
Protein (BN-Gel)	<i>High Molecular Weight Native Marker</i>	GE Healthcare

#### 2.1.4. Enzyme und Inhibitoren

Bezeichnung	Hersteller
NZYTaq-DNA-Polymerase	NZYtech (Lissabon, Portugal)
T3-RNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific
T7-RNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific
SP6-RNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific
Phusion® <i>High Fidelity</i> -Polymerase	Thermo Fisher Scientific

Restriktionsendonukleasen: <i>AgeI, BamHI, BstXI, DpnI, EcoRI, FspI, HincII, NaeI(PdI), NotI, PstI, Sall, SmaI, SnaBI, XbaI, XhoI</i>	Thermo Fisher Scientific
FastAP alkalische Phosphatase	Thermo Fisher Scientific
T4-DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific
Thermolysin	Sigma-Aldrich
Proteinase K	Merck

### 2.1.5. Reaktionskits

Bezeichnung	Hersteller
Flexi <sup>®</sup> Rabbit Reticulocyte Lysate System	Promega (Madison, WI, USA)
QuikChange <sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis	Agilent (Santa Clara, CA, USA)
QIAGEN <sup>®</sup> Plasmid Midi Kit	Qiagen (Hilden)
Wizard <sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega
Wizard <sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega

### 2.1.6. Nukleotide und Aminosäuren

Bezeichnung	Hersteller
Desoxyribonukleotide	Carl Roth
Ribonukleotide	Roche (Basel, Schweiz)
RNA Cap Structure Analog	New England Biolabs
<sup>35</sup> S-Methionin	PerkinElmer (Waltham, MA, USA)
Amino Acid Mixture Minus Methionine	Promega

### 2.1.7. Oligonukleotide/Primer

Die verwendeten Sequenzierungs-Primer wurden über MWG Biotech (Ebersberg) bezogen. Die Synthese eigens designer Primer wurde bei Biogio (Nijmegen, Niederlande) in Auftrag gegeben.

#### Sequenzierungs-Primer

Bezeichnung	Sequenz (5' nach 3')
M13 for	GGTTTTCCAGTCACGACGTTG
M13 rev	CACACAGGAAACAGCTATGACC
T7 prom	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 term	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

**Primer zur ortsspezifischen Mutagenese mittels QuikChange®-PCR**

siehe Kap. M.2.2.1.b, Template-Sequenzen siehe Anhang Tab. A.1

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (5' nach 3')</b>
KR to RR for	TATCCACCTGGTGATCCTAGCAGACGAGCTTTTGC
KR to RR rev	GCAAAGCTCGTCTGCTAGGATCACCAGGTGGATA
Neuer Klon   Template	mtRi-RR (pBAT)   mtRieske (pBAT) M/MPC-RR (pBAT)   M/MPC (pBAT)
KR to KK for	GTTATCCACCTGGTGATCCTAGCAAGAAGGCTTTTGCTTACTTTG
KR to KK rev	CAAAGTAAGCAAAAGCCTTCTTGCTAGGATCACCAGGTGGATAAC
Neuer Klon   Template	mtRi-KK (pBAT)   mtRieske (pBAT) M/MPC-KK (pBAT)   M/MPC (pBAT)
KR to AA for	TCAAGACAAAGTAAGCAAAAGCTGCTGCGCTAGGATCACCAGGTGGATAAC
KR to AA rev	GTTATCCACCTGGTGATCCTAGCGCAGCAGCTTTTGCTTACTTTGTCTTGA
Neuer Klon   Template	mtRi-AA (pBAT)   mtRieske (pBAT) M/MPC-AA (pBAT)   M/MPC (pBAT)
KR to EE for	CTGTCAAGACAAAGTAAGCAAAAGCCTCCTCGCTAGGATCACCAGGTGGATAACGC
KR to EE rev	GCGTTATCCACCTGGTGATCCTAGCGAGGAGGCTTTTGCTTACTTTGTCTTGACAG
Neuer Klon   Template	mtRi-EE (pBAT)   mtRieske (pBAT) M/MPC-EE (pBAT)   M/MPC (pBAT)

**Primer zur restriktionsfreien Klonierung**

siehe Kap. M.2.2.1.c, Nukleotidsequenzen der neu klonierten Konstrukte siehe Anhang Tab. A.1

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (5' nach 3')</b>
TatA-IS to GrpE-IS for	CCAAAACAGACAGACTCGAAGCTTGATTATGTTGGTGTCTAGGGTTTTATCA
TatA-IS to GrpE-IS rev	CCTAGACCGAAGAAGGCATTGCAAGTAAATCGGCTTGCAACA
Neuer Klon   Zielklon   Template	GrpE/TatA (pBAT)   TatA (pBat)   GrpE (pBAT)
TatA-IS to ATPS-IS for	CCAAAACAGACAGACTCGAAGCTTGATTATGGCGAGTCGGCGAATC
TatA-IS to ATPS-IS rev	CCTAGACCGAAGAAGGCATTGCAATACTCGGCGACTCGGCC
Neuer Klon   Zielklon   Template	ATPS/TatA (pBAT)   TatA (pBat)   ATPS(1-100)/EYFP (pBAT)
TatA-IS to mtRi-IS for	CTCTTCGTTTCTCGATCAAATCAGAGGTTTCTGCAATGCCTTCTTCGGC
TatA-IS to mtRi-IS rev	AACCCAACTGATGTGCGGGAGATCACATTACATTATCCTTTGTGCTG
Neuer Klon   Zielklon   Template	mtRi/TatA (pBAT)   TatA (pBat)   mtRieske (pBAT)

### 2.1.8. Plasmide

#### Vektoren

Bezeichnung	Herkunft
pBAT	Erhalten von Dr. Bationa Bennewitz (AG Klösgen), beschrieben in Annweiler <i>et al.</i> (1991)
pBluescript KS+ (pBSC)	Erhalten von Dr. Bationa Bennewitz (AG Klösgen), beschrieben in Clausmeyer <i>et al.</i> (1993)

#### Klone

Artkürzel: At = *Arabidopsis thaliana*, Av = *Aequorea victoria*, Ce = *Caenorhabditis elegans*,  
 Ec = *Escherichia coli*, Dr = *Danio rerio*, Mm = *Mus musculus*, Ps = *Pisum sativum*,  
 Sc = *Saccharomyces cerevisiae*, So = *Spinacia oleracea*, St = *Solanum tuberosum*,  
 Xt = *Xenopus tropicalis*

Bezeichnung	Vektor	Promotor	Linearisierung	Definition und Herkunft
ATPS(1-100)/EYFP (At/Av)	pBAT	–	–	Konstrukt: ATPS (Aminosäuren 1-100) + EYFP Dr. Bationa Bennewitz (AG Klösgen), beschrieben in Baudisch <i>et al.</i> (2014)
ATPS/TatA (At/Ps)	pBAT	T3	XbaI	Konstrukt: ATPS-Importsignal + reifer Teil von TatA beschrieben in dieser Arbeit
cpRi <sub>tp</sub> /23 (So/So)	pBAT	T3	NotI	Konstrukt: cpRieske-Importsignal (inkl. eingefügter TPP-Schnittstelle) + reifer Teil von OEC23 Dr. Bationa Bennewitz (AG Klösgen), beschrieben in Molik (2000)
cpRi <sub>tp</sub> /PC (So/So)	pBAT	T3	NotI	Konstrukt: cpRieske-Importsignal (inkl. eingefügter TPP-Schnittstelle) + reifer Teil von Plastocyanin Dr. Bationa Bennewitz (AG Klösgen)
GrpE (At)	pBAT	T3	NotI	Vorläuferprotein: GrpE Dr. Bationa Bennewitz (AG Klösgen), beschrieben in Baudisch <i>et al.</i> (2014)
GrpE/TatA (At/Ps)	pBAT	T3	XbaI	Konstrukt: GrpE-Importsignal + reifer Teil von TatA beschrieben in dieser Arbeit
M/CC (St/So)	pBAT	T3	BstXI	Konstrukt: mtRieske-Importsignal+ reifer Teil von cpRieske Dr. Jana Kungel (AG Klösgen), beschrieben in Kungel (Dissertation 2020)
M/M16 (St/So)	pBAT	T3	BstXI	Konstrukt: mtRieske-Importsignal+ mtRieske-Signalanker + reifer Teil von OEC16 beschrieben in dieser Arbeit

M/M23 (St/So)	pBAT	T3	<i>BstXI</i>	<i>Konstrukt: mtRieske-Importsignal+ mtRieske-Signalanker + reifer Teil von OEC23</i> beschrieben in dieser Arbeit
M/MPC (St/So)	pBAT	T3	<i>AgeI</i>	<i>Konstrukt: mtRieske-Importsignal+ mtRieske-Signalanker + reifer Teil von Plastocyanin</i> beschrieben in dieser Arbeit (inklusive Erkennungsmotiv-Mutanten)
m16 (So)	pBSC	–	–	<i>Klonierungskassette: reifer Teil von OEC16</i> B.Sc. Anastasia Doroshenko (AG Klösgen)
M16 (St/So)	pBAT	T3	<i>BstXI</i>	<i>Konstrukt: mtRieske-Signalanker + reifer Teil von OEC16</i> beschrieben in dieser Arbeit
m23 (So)		–	–	<i>Klonierungskassette: reifer Teil von OEC23</i> B.Sc. Anastasia Doroshenko (AG Klösgen)
M23 (St/So)	pBAT	T3	<i>BamHI</i>	<i>Konstrukt: mtRieske-Signalanker + reifer Teil von OEC23</i> beschrieben in dieser Arbeit
mcpRi (So) (m-cpRieske) (So)	pBAT	T3	<i>NotI</i>	<i>Reifes Protein: cpRieske</i> Dr. Bationa Bennewitz (AG Klösgen)
mmtRi (St) (m-mtRieske)	pBAT	T3	<i>NotI</i>	<i>Reifes Protein: mtRieske</i> Dr. Bationa Bennewitz (AG Klösgen)
mPC (So)	pUC18	–	–	<i>Klonierungskassette: reifer Teil von Plastocyanin</i> B.Sc. Anastasia Doroshenko (AG Klösgen)
MPC (St/So)	pBAT	T3	<i>AgeI</i>	<i>Konstrukt: mtRieske-Signalanker + reifer Teil von Plastocyanin</i> beschrieben in dieser Arbeit
mtRi/TatA (St/Ps)	pBAT	T3	<i>AgeI</i>	<i>Konstrukt: mtRieske-Importsignal+ reifer Teil von TatA</i> beschrieben in dieser Arbeit
At-mtRieske	pBSC	T3	<i>XhoI</i>	<i>Vorläuferprotein: mtRieske</i> M.Sc. Ditya Larasati (AG Klösgen)
Ce-mtRieske	pBAT	T3	<i>NotI</i>	<i>Vorläuferprotein: mtRieske</i> M.Sc. Ditya Larasati (AG Klösgen)
Dr-mtRieske	pCMV	SP6	<i>NotI</i>	<i>Vorläuferprotein: mtRieske</i> M.Sc. Ditya Larasati (AG Klösgen)
Mm-mtRieske	pCMV	SP6	<i>XbaI</i>	<i>Vorläuferprotein: mtRieske</i> M.Sc. Ditya Larasati (AG Klösgen)

Sc-mtRieske	pBAT	T3	<i>Xba</i> I	<i>Vorläuferprotein: mtRieske</i> M.Sc. Ditya Larasati (AG Klösigen)
St-mtRieske	pBAT	T3	<i>Bst</i> XI	<i>Vorläuferprotein: mtRieske</i> Dr. Bationa Bennewitz (AG Klösigen), beschrieben in Emmermann <i>et al.</i> (1994), Erkennungsmotiv-Mutanten beschrieben in dieser Arbeit
Xt-mtRieske	pBAT	T7	<i>Eco</i> RI	<i>Vorläuferprotein: mtRieske</i> M.Sc. Ditya Larasati (AG Klösigen)
mtRi-SA (St)	Topo2.1	–	–	<i>Klonierungskassette: mtRieske-Signalanker</i> B.Sc. Anastasia Doroshenko (AG Klösigen)
mtRi-ISSA (St)	Topo2.1	–	–	<i>Klonierungskassette: mtRieske-Importsignal + mtRieske Signalanker</i> B.Sc. Anastasia Doroshenko (AG Klösigen)
Sufl (Ec)	pKSM717	T7	<i>Eco</i> RI	<i>Vorläuferprotein: Sufl</i> AG Matthias Müller (Freiburg), beschrieben in Alami <i>et al.</i> (2003)
TatA (Ps)	pBAT	T3	<i>Not</i> I	<i>Vorläuferprotein: Tata</i> Dr. Bationa Bennewitz (AG Klösigen), beschrieben in Bennewitz <i>et al.</i> (2020)

### 2.1.9. E. coli-Bakterienstämme

Informationen zum Genotyp stammen von: [https://openwetware.org/wiki/E.\\_coli\\_genotypes](https://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes)  
(Stand 09.03.2023).

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
Top10	F <sup>-</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str <sup>R</sup> ) endA1 λ <sup>-</sup>	Invitrogen
DH5α	F <sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), λ <sup>-</sup>	Invitrogen

### 2.1.10. Kulturmedien

***lysogeny broth***  
**(LB-Flüssigmedium)**  
pH 7,0 (NaOH)

1 % (w/v) Trypton (Carl Roth)  
1 % (w/v) NaCl  
0,5 % (w/v) Hefeextrakt (Carl Roth)  
Frisch vor Gebrauch zugeben:  
0,01 % (w/v) Ampicillin (Carl Roth)

**LB-Festmedium**Gelöst in LB-Flüssigmedium:

1,5 % (w/v) Agar-Agar (Carl Roth)

Frisch vor Gebrauch zugeben:

0,01 % (w/v) Ampicillin (Carl Roth)

***super optimal broth with catabolite repression***  
**(SOC-Medium)**  
pH 7,0 (NaOH)2,5 mM KCl  
10 mM NaCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
20 mM Glucose  
2 % (w/v) Trypton (Carl Roth)  
0,5 % (w/v) Hefeextrakt (Carl Roth)***Half strength Murishage-Skoog-Basalmedium***  
**(½MS-Basalmedium)**0,22 % (w/v) Murishage & Skoog *Medium including Vitamins* (Duchefa Farma, Haarlem, Niederlande)  
0,05 % (w/v) MES/KOH (pH 5,7) (Carl Roth)  
1 % (w/v) Saccharose  
0,7 % (w/v) Micro Agar (Duchefa Farma)**2.1.11. Inhibitoren und Antibiotika**

Bezeichnung	Hersteller
RiboLock™ RNase-Inhibitor	Thermo Fisher Scientific
CCCP (Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon)	Sigma-Aldrich
Kaliumcyanid	Sigma-Aldrich
Antimycin A	Sigma-Aldrich
Gramicidin	Sigma-Aldrich
Valinomycin	Sigma-Aldrich
Ampicillin	Carl Roth

**2.1.12. Heterolog synthetisierte Proteine**

Bezeichnung	Definition	Herkunft
TatA	Reifer Teil von TatA aus <i>A. thaliana</i> , kloniert in pET30a, synthetisiert in <i>E. coli</i> BL21(DE3)	Erhalten von Dr. Sarah Zinecker (AG Klösgen) nach Aufreinigung, beschrieben in Hauer <i>et al.</i> (2013)

### 2.1.13. Antikörper

Alle Antikörper stammen aus immunisierten Kaninchen (anti-*rabbit*-HRP stammt aus Ziege).

Bezeichnung	Immunogen	Verdünnung	Herkunft
anti-AtpB	Synthetisiertes Peptid auf Basis der ATP-Synthase-F <sub>1</sub> β-Sequenz verschiedener Organismen	1:5.000	Agrisera (Vännäs, Schweden)
anti-mtRieske	mtRieske aus <i>A. thaliana</i>	1:10.000	Beschrieben in Carrie <i>et al.</i> (2010)
anti-TOM40	TOM40 aus <i>A. thaliana</i>	1:5.000	Beschrieben in Carrie <i>et al.</i> (2009)
anti-TatA	TatA aus <i>A. thaliana</i>	1:5 für Rekonstitutions-Versuche	Beschrieben in Jakob <i>et al.</i> (2009)
anti-mtTatB	mtTatB aus <i>S. oleracea</i>	1:1.000	Masterarbeit Anna Krüger (2019), (AG Klösgen)
anti-cpRieske/PC	Konstrukt aus cpRieske-Importsignal und dem reifen Teil aus Plastocyanin, jeweils aus <i>S. oleracea</i>	1:1.000	Beschrieben in Karnauchov <i>et al.</i> (1997)
anti-CytC <sub>1</sub>	Cytochrom c <sub>1</sub> aus <i>S. tuberosum</i>	1:1.000	Beschrieben in Rödiger (Dissertation 2010)
anti- <i>rabbit</i> -HRP	IgG-Antikörper aus Kaninchen	1:10.000	Sigma-Aldrich

### 2.1.14. Pflanzenmaterial

*Pisum sativum* (var. *Feltham First*) wurde unter Langtagbedingungen bei 20 – 22 °C auf kokosfaserhaltiger Erde kultiviert. Zur Organell-Isolierung wurden die Blätter von 7 Tage alten Erbsenkeimlingen geerntet.

*Spinacia oleracea* (Sorte Lina) wurde, wie von Waclawek (Dissertation 2016) beschrieben, unter Kurztagbedingungen in hydroponischen Kulturen mit Nährlösung kultiviert. Zur Organell-Isolierung wurden die Blätter von 2 – 4 Monate alten Pflanzen geerntet.

Die Samen von *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp Columbia-0 bzw. Col-0) wurden vor der Keimung 3 Tage lang dunkel bei 4 °C stratifiziert und anschließend auf Erde zum Auskeimen gebracht. Nach 2 Wochen Wachstum unter Kurztagbedingungen bei 20 – 22 °C wurden die Pflanzen vereinzelt, um so eine

gesteigerte Bildung von Blatt-Biomasse zu erreichen. Für die Organell-Isolierung wurde das gesamte oberirdische Pflanzenmaterial nach 4 – 5 Wochen geerntet.

Die Samen von Wildtyp-Pflanzen (Col-0) und heterozygoten *TatA*-Deletionsmutanten ( $\Delta$ TatA vor Col-0-Hintergrund) von *A. thaliana*, beschrieben von Sharma (Dissertation 2019), wurden sterilisiert und auf festem ½MS-Basalmedium ausgebracht. Die Platten wurden zur Stratifizierung der Samen für 3 Tage dunkel bei 4 °C gelagert. Keimung und Wachstum erfolgte unter Langtagbedingungen bei 22 °C. Zur Organell-Isolierung wurden die Keimlinge nach 7 – 14 Tagen geerntet (ganze Pflanze). Eine Selektion homozygoter *TatA*-Deletionsmutanten erfolgte anhand des charakteristischen Phänotyps (Zwergenwuchs und Albinismus).

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Molekularbiologische Methoden**

#### **a) Standardmethoden**

Die im Folgenden nicht explizit beschriebenen Standardmethoden (wie Agarose-Gelelektrophorese und die Fällung von DNA bzw. Proteinen) wurden nach den Protokollen von Sambrook und Russell (2001) durchgeführt. Für Kolonie-PCR-Reaktionen wurde die NZYtaq-DNA-Polymerase (NZYtech, Lissabon, Portugal) verwendet.

#### **b) Ortsspezifische Mutagenese**

Zum gerichteten Austausch einzelner Aminosäuren oder Aminosäurepaare wurde nach den Herstellerangaben des QuikChange® *Site-Directed Mutagenesis*-Kits (Agilent, Santa Clara, CA, USA) und der Phusion® *High Fidelity*-Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) vorgegangen. Auf diese Weise wurden die Erkennungsmotiv-Mutanten der Proteine mtRieske und M/MPC erstellt, wobei das authentische Lysin-Arginin-Motiv (KR) entsprechend durch zwei Lysinreste (KK), Argininreste (RR), Alaninreste (AA) oder Glutaminsäurereste (EE) ersetzt wurde (die jeweils verwendeten Primerpaare sind Kapitel M.2.1.7 zu entnehmen, die Template-Sequenzen befinden sich im Anhang Tab. A.1). Nach abgeschlossener PCR erfolgte der Abbau der parentalen dsDNA ebenfalls nach den Herstellerangaben des QuikChange®-Kits durch die Zugabe von *DpnI*, einem methylierungssensitiven Restriktionsenzym. Anschließend wurden die gewünschten PCR-Produkte

über ein präparatives Agarosegel und unter Verwendung des Wizard® *SV Gel and PCR Clean-Up-Kits* (Promega, Madison, WI, USA) von anderen Komponenten und weiteren PCR-Produkten befreit.

### c) Klonierung rekombinanter Konstrukte

#### Klassische Klonierung (Restriktion und Ligation)

Die mtRieske-basierten mtTat-Substrate (MPC, M/MPC, M16, M/M16, M23 und M/M23) wurden durch Restriktion und Ligation nach Sambrook und Russell (2001) erstellt (Nukleotidsequenzen der klonierten Konstrukte befinden sich im Anhang Tab.A.1). Hierzu wurden die codierenden Gensequenzen der jeweils zwei Konstrukt-Abschnitte (N-Terminus: Importsignal+Signalanker bzw. nur Signalanker von mtRieske; C-Terminus: reifer Teil von Plastocyanin, OEC16 oder OEC23) nach erfolgter Restriktion über glatte Enden miteinander ligiert und durch überhängende Enden in das entsprechende Zielplasmid eingefügt (T4-DNA-Ligase; Thermo Fisher Scientific). Eine Dephosphorylierung der linearisierten Zielplasmide durch die Zugabe alkalischer Phosphatase sollte einer spontanen Selbstligation vorbeugen.

#### Insert 1 (codiert N-terminalen Proteinabschnitt)

Bezeichnung	Beschreibung	Plasmid	Restriktion
mtRi-SA	Signalanker von mtRieske	Topo2.1	<i>EcoRI/NaeI</i>
mtRi-ISSA	Importsignal+Signalanker von mtRieske	Topo2.1	<i>EcoRI/NaeI</i>

#### Insert 2 (codiert C-terminalen Proteinabschnitt)

Bezeichnung	Beschreibung	Plasmid	Restriktion
mPC	reifer Teil von Plastocyanin	pUC18	<i>EcoRI/SnaBI</i>
m16	reifer Teil von OEC16	pBSC	<i>EcoRI/HincII</i>
m23	reifer Teil von OEC23	pBSC	<i>Sall/FspI</i>

#### Zielplasmid

Bezeichnung	Beschreibung	Restriktion
pBAT	Zielvektor der PC- und OEC16-Konstrukte	<i>EcoRI</i>
pBSC	Zielvektor der OEC23-Konstrukte	<i>EcoRI/Sall</i>

Die resultierenden OEC23-Konstrukte M23 und M/M23 wurden nach ihrer Klonierung in pBSC für verbesserte Transkriptions-Resultate ebenfalls durch Restriktion und Ligation in pBAT umklontiert.

### Insert

Bezeichnung	Beschreibung	Plasmid	Restriktion
M23	Signalanker von mtRieske mit dem reifen Teil von OEC23	pBSC	<i>PstI/HincII</i>
M/M23	Importsignal+Signalanker von mtRieske mit dem reifen Teil von OEC23	pBSC	<i>PstI/HincII</i>

### Zielpiasmid

Bezeichnung	Beschreibung	Restriktion
pBAT	Zielvektor von M23 und M/M23	<i>PstI/SmaI</i>

### Restriktionsfreie Klonierung

Die Erstellung einiger rekombinanter Proteinkonstrukte (GrpE/TatA, ATPS/TatA und mtRi/TatA) erfolgte in dieser Arbeit durch die von van den Ent und Löwe (2006) beschriebene restriktionsfreie Klonierung. Hierzu wurde das Insert mithilfe geeigneter Primer zunächst amplifiziert und im selben Schritt Überhänge (komplementär zum Insertionsort) angefügt. Das Amplifikat diente in einer zweiten PCR als „Megaprimer“ zur Amplifikation des Zielpiasmides bei gleichzeitiger Insertion der „Megaprimer“-Sequenz. Die Amplifikationen wurden mit der Phusion®-Polymerase durchgeführt. Zum Design geeigneter Primer und der Berechnung erforderlicher Vektor- bzw. Primer-Mengen wurde das auf [rf-cloning.org](http://rf-cloning.org) zur Verfügung gestellte Online-Tool von Bond und Naus (2012) verwendet.

### d) Transformation

#### Hitzeschock (chemisch kompetente Zellen)

Zu 50 µl chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen (Stamm Top10) wurden 50 – 100 ng der zu vermehrenden Plasmid-DNA gegeben. Während einer 20-minütigen Inkubation der Suspension auf Eis und einem anschließenden Hitzeschock für 50 s bei 42 °C erfolgte die Aufnahme der Plasmide. Nach einer weiteren Inkubation des Ansatzes für 2 min auf Eis wurde die Suspension mit 900 µl SOC-Medium (*super optimal broth with catabolite repression*) versetzt und für 30 – 45 min bei 37 °C auf dem Rotator

inkubiert. Verschiedene Volumina (10 – 100 µl) der Suspension wurden anschließend auf Festmedium ausplattiert (Kultivierung siehe Kap. M.2.2.1.e).

### **Elektroporation (elektrokompetente Zellen)**

Die zur Transformation genutzte Plasmid-DNA muss für eine erfolgreiche Elektroporation frei von Salzen sein, weshalb PCR-amplifizierte Plasmide zunächst über Wizard® *Clean-Up*-Kit nach Herstellerangaben gereinigt werden mussten, oder alternativ das Hitzeschock-Verfahren (s. o.) verwendet wurde.

Zu 50 µl elektrokompetenten *E. coli*-Zellen (Stamm DH5α) wurden 50 – 200 ng (maximal 2 µl) der zu vermehrenden Plasmid-DNA gegeben und die Suspension in eine Elektroporationsküvette (Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf) überführt. Die Küvette wurde in den Elektroporator (*E. coli* Pulser™; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) eingespannt und ein Impuls mit einer Spannung von 1,8 kV erzeugt. Anschließend wurden 900 µl SOC-Medium zum Ansatz in die Küvette gegeben und die Suspension für 30 – 45 min bei 37 °C auf dem Rotator inkubiert. Verschiedene Volumina (10 – 100 µl) der Suspension wurden anschließend auf Festmedium ausplattiert (Kultivierung siehe Kap. M.2.2.1.e).

### **e) Anzucht und Lagerung von *E. coli*-Kulturen**

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte generell über Nacht (ca. 16 h) bei 37 °C mit LB-Medium (*lysogeny broth*) inklusive geeignetem Antibiotikum zur Selektion Plasmid-tragender Zellen. Für LB-Festmedium wurde das flüssige LB-Medium mit Antibiotikum und 1,5 % Agar-Agar versehen und zum Aushärten in Petrischalen gegossen. Flüssigkulturen wurden schüttelnd inkubiert, um eine Sauerstofflimitierung während des aeroben Wachstums der Kulturen zu vermeiden. Durch Kolonie-PCR mit der NZYtaq-DNA-Polymerase (NZYtech, Lissabon, Portugal) wurden nach Sambrook und Russell (2001) die auf LB-Festmedium gewachsenen Kolonien überprüft und zum Animpfen von Flüssigmedium vorselektiert.

Flüssigkulturen von *E. coli* können über mehrere Jahre gelagert und bei Bedarf zum animpfen von frischem Medium genutzt werden. Hierzu wurden 500 µl einer über Nacht gewachsenen Flüssigkultur mit 500 µl Glycerin-Lagerpuffer versetzt, zunächst für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei -20 °C gelagert.

<b>Glycerin-Lagerpuffer</b>	2,5 mM	TRIS/HCl (pH 8,0)
	65 % (v/v)	Glycerin
	100 mM	MgSO <sub>4</sub>

### f) Plasmidpräparation und Aufreinigung

Zur Präparation und Aufreinigung von Plasmiden aus über Nacht gewachsenen *E. coli*-Flüssigkulturen wurden die Reaktionskits Wizard® *Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) oder QIAGEN® *Plasmid Midi Kit* (Qiagen, Hilden) entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Eine Sanger-Sequenzierung erfolgte durch die Firma SeqLab (Göttingen).

### g) Plasmid-Linearisierung und Phenol-Chloroform-Extraktion

Um eine effizientere *in vitro*-Transkription zu gewährleisten, wurden die präparierten Plasmide zunächst entsprechend der Herstellerangaben der in Kapitel M.2.1.8 aufgeführten Restriktionsenzyme linearisiert. Anschließend erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion der linearisierten Plasmide nach Sambrook und Russell (2001).

### h) *In vitro*-Synthese radioaktiv markierter Proteine

Die zuvor linearisierten und gereinigten Plasmide wurden, wie in Molik (Dissertation 2005) beschrieben, zunächst für eine *in vitro*-Transkription und anschließende *in vitro*-Translation mittels Flexi® *Rabbit Reticulocyte Lysate System* (Promega) verwendet. Zur radioaktiven Markierung der neu synthetisierten Polypeptide erfolgte die Translationsreaktion nach Zugabe von <sup>35</sup>S-Methionin.

## 2.2.2. Methoden zur Arbeit mit pflanzlichem Material

### 2.2.2.1. Organellisolierung und Fraktionierung

#### a) Mitochondrienisolierung

Alle Arbeits- und Zentrifugationsschritte wurden bei 4 °C bzw. auf Eis sowie mit vorgekühlten Lösungen und Geräten durchgeführt, um die Aktivität der isolierten Mitochondrien zu erhalten.

#### **Erbse (*Pisum sativum*)**

Das hier beschriebene Protokoll zur Isolierung intakter Mitochondrien aus Erbsenkeimlingen wurde auf Grundlage von Rödiger *et al.* (2010) erstellt und modifiziert. Geerntet wurden 80 – 120 g Blattmaterial von 7 Tage alten Keimlingen.

<b>Saccharose-Isolierungsmedium (SIM)</b>	25 mM	HEPES/KOH (pH 8,0)
	350 mM	Saccharose
	2 mM	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
	<u>Frisch vor Gebrauch zugeben:</u>	
	0,6 % (w/v)	Polyvinylpyrrolidon K-25 (PVP)
	0,2 % (w/v)	Bovines Serumalbumin (BSA)
	10 mM	Dithiothreitol (DTT)
	0,2 mM	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
<b>5x Sorbitol-Re-Isolierungsmedium (SRM)</b>	0.25 M	HEPES/KOH (pH 8,0)
	1,65 M	Sorbitol
<b>1x SRM+PMSF</b>	<u>Vor Gebrauch frisch herstellen:</u>	
	20 % (v/v)	5x SRM (s. o.)
	0,2 mM	PMSF

<b>Percoll®-Lösungen</b>	<b>50 % Percoll®</b>	<b>34 % Percoll®</b>	<b>18 % Percoll®</b>
5x SRM (s. o.)	20 % (v/v)	20 % (v/v)	20 % (v/v)
Percoll® (Cytiva, Uppsala, Schweden)	50 % (v/v)	34 % (v/v)	18 % (v/v)

Das geerntete Pflanzenmaterial wurde zunächst in 400 ml SIM für 5x 2 s im Labormixer (Waring®; New Hartford, CT, USA) aufgeschlossen und das Homogenat anschließend über zwei Lagen Miracloth® (22 – 25 µm Porengröße, Merck Millipore, Burlington, MA, USA) und eine Lage Nylongewebe (100 µm Porengröße) in zwei 250 ml-Zentrifugenbecher filtriert. Das Filtrat wurde für 5 min bei 2.000 g zentrifugiert (Avanti™ J-25; Beckman Coulter, Brea, CA, USA; Rotor: JA-14), um Chloroplasten und schwerere Zellbestandteile zu sedimentieren. Die Überstände wurden zügig in zwei frische Zentrifugenbecher abgegossen und für 10 min bei 6.000 g zentrifugiert, während die Sedimente bei Bedarf für die Chloroplastenisolierung verwendet wurden (siehe Kap. M.2.2.2.1.e Erbse). Nach erfolgter Zentrifugation wurden die Überstände erneut in frische Zentrifugenbecher überführt und anschließend für 10 min bei 16.000 g zentrifugiert, um die enthaltenen Mitochondrien zu sedimentieren. Die Überstände wurden vorsichtig verworfen und die verbliebenen Sedimente mit einem weichen Pinsel in je 2 ml 1x SRM+PMSF resuspendiert. Vier zuvor in 30 ml-Corex®-Zentrifugenröhrchen (DuPont Instruments, Newton, CT, USA) vorgelegte Dichtegradienten (dreistufig von unten nach oben: 5 ml 50 % Percoll®, 8 ml 34 % Percoll® und 5 ml 18 % Percoll®) wurden gleichmäßig mit der Mitochondrien-Suspension überschichtet und anschließend für 45 min bei 12.000 g mit geringer Beschleunigung und Bremsung im Ausschwingrotor zentrifugiert (Avanti™ J-25, Rotor: JS-13.1). Die oberen Phasen wurden jeweils entfernt und die intakten Mitochondrien aus der Interphase zwischen 50 % und 34 % Percoll® in vier frische Corex®-Röhrchen überführt, diese mit

1x SRM+PMSF auf ca. 25 ml aufgefüllt, vorsichtig gemischt und für 10 min bei 12.000 g zentrifugiert. Es folgten mindestens drei Waschschrte, bei welchen etwa 50 % des jeweiligen Überstandes verworfen und die Suspensionen wie zuvor mit 1x SRM+PMSF aufgefüllt und zentrifugiert wurden. Wenn die Überstände klar erschienen und sich je ein festes Sediment gebildet hat, wurden diese in insgesamt 1 ml 1x SRM+PMSF resuspendiert und in ein 1,5 ml-Eppendorf®-Röhrchen überführt. Nach einer letzten Zentrifugation für 5 min bei 16.000 g (Heraeus Fresco™ 17, Thermo Fisher Sycientific) wurde das Sediment in 100 – 200 µl 1x SRM+PMSF resuspendiert und die Proteinkonzentration der Mitochondrien-Suspension nach Bradford (1976) bestimmt (siehe Kap. M.2.2.2.1.b).

Alternativ wurde ein vereinfachter Gradient (zweistufig von unten nach oben: 13 ml 34 % Percoll® und 5 ml 18 % Percoll®) verwendet und alle weiteren Arbeitsschritte wie oben beschrieben beibehalten. Bei diesem alternativen Gradienten befanden sich die Mitochondrien nach der Dichtegradienten-Zentrifugation am Boden des Corex®-Röhrchens. Dieses Verfahren war schneller und führte in der Regel zu einer höheren Ausbeute, allerdings auf Kosten einiger Verunreinigungen, welche je nach Verwendung der isolierten Organellen vernachlässigbar waren.

### **Spinat (*Spinacia oleracea*)**

Am Vortag der Isolierung wurden 100 – 150 g Blattmaterial (ohne Mittelrippe) von 2 – 3 Monate alten Pflanzen geerntet und dunkel bei 4 °C gelagert, um die transitorische Stärke vor Beginn der Präparation abzubauen. Die erforderlichen Lösungen entsprechen denen der Mitochondrienisolierung aus Erbsenkeimlingen (s. o.).

Das geerntete Pflanzenmaterial wurde, wie oben bereits beschrieben, zunächst in 400 ml SIM für 5x 2 s im Waring®-Labormixer aufgeschlossen und das Homogenat anschließend über zwei Lagen Miracloth® (22 – 25 µm Porengröße) und eine Lage Nylogewebe (100 µm Porengröße) in zwei 250 ml-Zentrifugenbecher filtriert. Das Filtrat wurde für 5 min bei 2.000 g zentrifugiert (Avanti™ J-25, Rotor: JA-14) und die Überstände zügig in zwei frische Zentrifugenbecher abgegossen und für 15 min bei 18.000 g zentrifugiert. Nach erfolgter Zentrifugation wurden die Überstände abgegossen und die Sedimente in jeweils ca. 150 ml 1x SRM+PMSF durch schwenken resuspendiert. Es wurde erneut für 5 min bei 2.000 g und anschließend die überführten Überstände für 15 min bei 18.000 g zentrifugiert. Die zwei Sedimente wurden mit einem weichen Pinsel in je 2 ml 1x SRM+PMSF resuspendiert. In zwei 30 ml-Corex®-Zentrifugenröhrchen wurden je 27 ml 34 % Percoll® vorgelegt und gleichmäßig mit der Mitochondrien-Suspension überschichtet. Anschließend folgte eine Zentrifugation für 45 min bei 12.000 g mit geringer Beschleunigung und Bremsung im Ausschwingrotor (Avanti™ J-25, Rotor: JS-13.1), nach welcher sich die intakten Mitochondrien nahe dem Röhrchenboden angesammelt haben. Unter Vermeidung der Mitochondrien wurden ca. 50 % der Überstände entfernt, auf

ca. 25 ml mit 1x SRM+PMSF aufgefüllt und nach vorsichtigem Mischen für 10 min bei 12.000 g zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis die Überstände klar erschienen und sich je ein festes Sediment gebildet hat. Die Sedimente wurden in insgesamt 1 ml 1x SRM+PMSF resuspendiert und in ein 1,5 ml-Eppendorf®-Röhrchen überführt. Nach einer letzten Zentrifugation für 5 min bei 16.000 g (Heraeus Fresco™ 17) wurde das Sediment in 100 – 200 µl 1x SRM+PMSF resuspendiert und die Proteinkonzentration der Mitochondrien-Suspension nach Bradford (1976) bestimmt (siehe Kap. M.2.2.2.1.b).

### Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*)

Zur Isolierung von Mitochondrien aus *A. thaliana* wurden zwei verschiedene Protokolle angewandt.

Protokoll 1 – Die hier zuerst beschriebene Methode wurde auf Grundlage von Meyer *et al.* (2009) modifiziert und für die Isolierung von Mitochondrien aus ca. 30 g Blattmaterial von 4–5 Wochen alten Wildtyp-Pflanzen (Col-0) genutzt.

<b>Extraktionspuffer pH 7,5 (85 % Phosphorsäure)</b>	300 mM	Saccharose
	5 mM	Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>
	2 mM	EDTA
	10 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	1 % (w/v)	PVP 40
	1 % (w/v)	BSA
	<u>Frisch vor Gebrauch zugeben:</u>	
20 mM	Ascorbinsäure	
5 mM	Cystein	
<b>Mitochondrien-Waschpuffer (MWP)</b>	10 mM	MOPS/KOH (pH 7,2)
	300 mM	Saccharose
	1 mM	EDTA
<b>5x Gradientenpuffer</b>	50 mM	MOPS/KOH (pH 7,2)
	1,5 M	Saccharose

<b>Percoll®-Lösungen</b>	<b>50 % Percoll®</b>	<b>25 % Percoll®</b>	<b>18 % Percoll®</b>
5x Gradientenpuffer (s. o.)	20 % (v/v)	20 % (v/v)	20 % (v/v)
Percoll®	50 % (v/v)	25 % (v/v)	18 % (v/v)

Das geerntete Pflanzenmaterial wurde zunächst in 150 ml Extraktionspuffer für 3x 15 s im Waring®-Labormixer aufgeschlossen und anschließend über zwei Lagen Miracloth® (22 – 25 µm Porengröße) und eine Lage Nylogewebe (100 µm Porengröße) in einen 250 ml-Zentrifugenbecher filtriert. Das Filtrat wurde für 10 min bei 1.500 g zentrifugiert (Avanti™ J-25, Rotor: JA-14) und der Überstand zügig in einen sauberen Zentrifugenbecher abgegossen und für 10 min bei 20.000 g zentrifugiert. Nach erfolgter Zentrifugation wurde der Überstand abgegossen und das Sediment vorsichtig in 5 ml MWP resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension in einen Potter-Elvehjem-Homogenisator (Fisherbrand™ Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) überführt, mit 5 Stößen weiter homogenisiert und 15 ml MWP zugegeben. Das Homogenat wurde in ein 30 ml-Corex®-Zentrifugenröhrchen überführt und zunächst für 10 min bei 2.000 g zentrifugiert (Avanti™ J-25, Rotor: JA-25.50). Der Überstand wurde in ein sauberes Corex®-Röhrchen transferiert und für 10 min bei 20.000 g zentrifugiert, woraufhin das Sediment mit einem weichen Pinsel in 1 ml MWP resuspendiert wurde. In einem Corex®-Röhrchen wurde ein Dichtegradient vorgelegt (dreistufig von unten nach oben: 5 ml 50 % Percoll®, 25 ml 25 % Percoll® und 5 ml 18 % Percoll®) und mit der Mitochondrien-Suspension überschichtet. Anschließend folgte eine Zentrifugation für 45 min bei 40.000 g mit geringer Beschleunigung und Bremsung im Ausschwingrotor (Avanti™ J-25, Rotor: JS-13.1), nach welcher sich die intakten Mitochondrien in der Interphase zwischen 50 % und 25 % Percoll® befanden. Die oberen Phasen wurden abgenommen, die Mitochondrien in ein sauberes Corex®-Röhrchen überführt und anschließend auf ca. 25 ml mit MWP aufgefüllt und vorsichtig gemischt. Nach erfolgter Zentrifugation für 10 min bei 20.000 g wurde ca. 50 % vom Überstand entfernt, auf ca. 25 ml mit MWP aufgefüllt und nach vorsichtigem Mischen für 10 min bei 20.000 g zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis der Überstand klar erschien und sich ein festes Sediment gebildet hat. Dieses wurde in insgesamt 1 ml MWP resuspendiert und in ein 1,5 ml-Eppendorf®-Röhrchen überführt. Nach einer letzten Zentrifugation für 5 min bei 16.000 g (Heraeus Fresco™ 17) wurde das Sediment in 100 µl MWP resuspendiert und die Proteinkonzentration der Mitochondrien-Suspension nach Bradford (1976) bestimmt (siehe Kap. M.2.2.2.1.b).

Protokoll 2 – Bei dem zweiten Protokoll handelt es sich um ein vereinfachtes Verfahren, welches sich zur Isolierung von Mitochondrien aus sehr geringen Mengen Ausgangsmaterial eignet. Es wurde daher zur Isolierung von Mitochondrien aus *TatA*-Deletionsmutanten eingesetzt, da diese ein stark verringertes Wachstum aufweisen. Nach 10 Tagen Anzucht auf Festmedium wurden etwa 200 mg Keimlinge von Wildtyp-Pflanzen (Col-0) bzw. *TatA*-Deletionsmutanten geerntet.

<b>Mörserpuffer</b>	30 mM	MOPS/KOH (pH 7,6)
	350 mM	Mannitol
	1 mM	EDTA
	0,7 % (w/v)	PVP 40
	11 mM	Cystein
<b>Saccharose-Lösung</b>	0,6 M	Saccharose

**MWP** (s. o.)

Das Pflanzenmaterial wurde in einen Mörser gegeben und Mörserpuffer hinzugefügt, bis das Pflanzenmaterial vollständig bedeckt war. Für mindestens 3 min wurden die Keimlinge gründlich homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend durch eine Lage Miracloth® (22 – 25 µm Porengröße) in ein Corex®-Zentrifugenröhrchen filtriert und für 5 min bei 5.000 g zentrifugiert (Avanti™ J-25, Rotor: JA-25.50). Der Überstand wurde in ein sauberes Corex®-Röhrchen überführt und für 10 min bei 20.000 g zentrifugiert, woraufhin der Überstand möglichst vollständig verworfen und das Sediment in 1 ml MWP vorsichtig resuspendiert wurde. Die Mitochondrien-Suspension wurde für 5 min bei 5.000 g zentrifugiert und 15 ml Saccharose-Lösung mit dem resultierenden Überstand überschichtet. Anschließend folgte eine Zentrifugation für 30 min bei 12.000 g mit geringer Beschleunigung und Bremsung im Ausschwingrotor (Avanti™ J-25, Rotor: JS-13.1). Die sedimentierten Mitochondrien wurden in 1 ml MWP resuspendiert und in ein 1,5 ml-Eppendorf®-Röhrchen überführt. Nach einer letzten Zentrifugation für 10 min bei 20.000 g wurden die sedimentierten Mitochondrien schließlich in 50 µl MWP resuspendiert.

**b) Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford**

Zur Vereinheitlichung eingesetzter Mitochondrien-Mengen wurde zunächst die Proteinkonzentration ( $c_p$ ) der frisch angefertigten Mitochondrien-Suspension nach Bradford (1976) bestimmt. Es erfolgte hierbei eine Dreifachbestimmung. Hierzu wurden jeweils 99 µl 1 M Harnstoff und 700 µl Wasser vorgelegt und 1 µl der Suspension zugegeben. Die Proben wurden für 1 min bei 16.000 g zentrifugiert (Heraeus Fresco™ 17) und der Überstand mit je 200 µl Bradford-Reagenz (ROTI®Quant; Carl Roth, Karlsruhe) versetzt. Nach 5-minütiger Inkubation wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm im Photometer (NanoPhotometer®; Implen, München) gemessen. Aus dem Mittelwert wurde die Proteinkonzentration anhand einer Eichgerade bestimmt. Die Mitochondrien-Suspension wurde auf eine Proteinkonzentration von 10 µg/µl verdünnt.

### c) Mitoplastenpräparation

Alle Arbeits- und Zentrifugationsschritte wurden bei 4 °C bzw. auf Eis sowie mit vorgekühlten Lösungen und Geräten durchgeführt, um die Aktivität der präparierten Mitoplasten zu erhalten.

Die Präparation von Mitoplasten beruht auf der Osmolyse der äußeren mitochondrialen Hüllmembran in hypotonischem Puffer. Hierzu wurde ein Teil der Mitochondrien-Suspension ( $c_p$  10 µg/µl) entnommen und für 5 min bei 16.000 g (Heraeus Fresco™ 17) zentrifugiert. Die sedimentierten Mitochondrien wurden anschließend in FP1 resuspendiert (finale  $c_p$  10 µg/µl) und zur Osmolyse der äußeren Hüllmembran für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde FP2 im Verhältnis 1:1 zugegeben. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Mitoplasten für 15 min bei 16.000 g sedimentiert und in 1x SRM resuspendiert ( $\cong c_p$  10 µg/µl), oder für eine weitere Fraktionierung zu submitochondrialen Vesikeln stattdessen entweder in 1x SRM + 20 mM MgCl<sub>2</sub> ( $\cong c_p$  10 µg/µl) oder in USP ( $\cong c_p$  2,5 µg/µl) resuspendiert.

<b>Fraktionierungspuffer 1 (FP1)</b>	10 mM	HEPES/KOH (pH 8,0)
	60 mM	Saccharose
	<u>Frisch vor Gebrauch zugeben:</u>	
	1 mM	PMSF
<b>Fraktionierungspuffer 2 (FP2)</b>	20 mM	HEPES/KOH (pH 8,0)
	600 mM	Saccharose
	<u>Frisch vor Gebrauch zugeben:</u>	
	1 mM	PMSF

**SRM** (s. o.)

**USP** (s. u.)

### d) Vesikelpräparation

Alle Arbeits- und Zentrifugationsschritte wurden bei 4 °C bzw. auf Eis sowie mit vorgekühlten Lösungen und Geräten durchgeführt, um die Aktivität der präparierten Vesikel zu erhalten.

Zur Präparation submitochondrialer Vesikel aus zuvor gewonnen Mitoplasten, wurde die innere Hüllmembran durch äußeres Einwirken und in Anwesenheit von 20 mM MgCl<sub>2</sub> an mehreren Positionen geöffnet. Die Membranen schließen sich aufgrund ihrer amphiphilen Eigenschaften spontan und

bilden Vesikel, wobei das zugesetzte  $\text{MgCl}_2$  durch die Maskierung der Membranladungen die Entstehung invertierter Vesikel unterstützt (Kay *et al.*, 1985, Møller *et al.*, 1987).

### Gefrier-Tau-Zyklen

Als Vorlage diente die von Palmgren *et al.* (1990) beschriebene Methode zur Präparation invertierter und physiologisch aktiver Plasmamembranvesikel von Pflanzenzellen.

Die Mitoplasten in  $1\times \text{SRM} + 20 \text{ mM MgCl}_2$  ( $\cong c_p 10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) wurden für ca. 20 s in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend in der Hand komplett aufgetaut. Dieser Vorgang wurde zwei weitere Male wiederholt.

### Ultraschall

Dieses Protokoll wurde auf Grundlage der Arbeit von Petit *et al.* (1987) erstellt und unter Berücksichtigung weiterer Protokolle sowie erster Vorversuche entsprechend modifiziert.

Die Mitoplasten in USP ( $\cong c_p 2,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) wurden für  $4\times 10 \text{ s}$  mit einer Leistung von 40 W über eine Tauchsonotrode beschallt (Sonopuls® HD 3100; Bandelin, Berlin). Hierbei wurde die Probe durchgehend auf Eis gekühlt und zwischen den einzelnen Beschallungen jeweils 50 s pausiert, um einer entstehenden Hitze einwirkung bestmöglich entgegenzuwirken. Die Vesikel wurden anschließend für 30 min bei 300.000 g (Optima™ MAX; Beckman Coulter, Rotor: MLA-80) sedimentiert und in  $1\times \text{SRM}$  resuspendiert ( $\cong c_p 10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ).

<b>Ultraschall-Puffer (USP)</b>	15 mM	HEPES/KOH (pH 8,0)
	0,1 % (w/v)	Lysozym
	20 mM	$\text{MgCl}_2$

**SRM** (s. o.)

### e) Chloroplastenisolierung

Alle Arbeits- und Zentrifugationsschritte wurden bei 4 °C bzw. auf Eis sowie mit vorgekühlten Lösungen und Geräten durchgeführt, um die Aktivität der isolierten Chloroplasten zu bewahren. Zudem wurden die Chloroplasten-Suspensionen nach Möglichkeit dunkel gehalten (Eisbehälter mit Deckel bzw. Zentrifugen-Becher und -Röhrchen mit Alufolie umwickelt). Beim Pipettieren der Chloroplasten-Suspensionen wurden gestutzte Spitzen verwendet, um die Scherkräfte zu verringern.

### Erbse (*Pisum sativum*)

Das hier beschriebene Protokoll zur Isolierung intakter Chloroplasten aus Erbsenkeimlingen wurde ebenfalls auf Grundlage von Rödiger *et al.* (2010) erstellt und modifiziert. Das Pflanzenmaterial wurde zunächst, wie in Kapitel M.2.2.2.1.a (Erbse) beschrieben, geerntet und aufgearbeitet. Die Chloroplasten-beinhaltenen Sedimente des ersten Zentrifugationsschrittes wurden anschließend für die nachfolgend beschriebene Chloroplastenisolierung verwendet.

#### SRM (s. o.)

Percoll®-Lösungen	80 % Percoll®	35 % Percoll®
5x SRM (s. o.)	20 % (v/v)	20 % (v/v)
Percoll®	80 % (v/v)	35 % (v/v)

Die zwei Sedimente wurden vorsichtig mit einem weichen Pinsel in je 5 ml 1x SRM resuspendiert und zwei vorgelegte Dichtegradienten (zweistufig von unten nach oben: 4 ml 80 % Percoll®, 10 ml 35 % Percoll®) jeweils mit maximal 5 ml dieser Suspensionen überschichtet. Nach erfolgter Zentrifugation für 7 min bei 2.000 g mit geringer Beschleunigung und Bremsung im Ausschwingrotor (Avanti™ J-25; Rotor: JS-13.1) wurden die oberen Phasen entnommen und verworfen. Die Chloroplasten-haltige Interphase zwischen dem 80 % und 35 % Percoll® wurde in ein frisches 30 ml-Corex®-Röhrchen überführt und mit 1x SRM auf ca. 25 ml aufgefüllt. Anschließend wurde für 2 min bei 1.000 g zentrifugiert und der Großteil des Überstandes verworfen, woraufhin wieder auf ca. 25 ml mit 1x SRM aufgefüllt wurde. Nach einer letzten Zentrifugation für 2 min bei 1.000 g wurde das Sediment in jeweils 900 µl resuspendiert und beide Suspensionen in einem 2 ml-Eppendorf®-Röhrchen vereinigt. Die Chlorophyllkonzentration der Chloroplasten-Suspension wurde nach Arnon (1949) bestimmt (siehe Kap. M.2.2.2.1.f).

### Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*)

Die Isolierung von Chloroplasten aus *A. thaliana* erfolgte, analog zu einem für Spinat etablierten Protokoll von Molik (Dissertation 2005), aus ca. 30 g Blattmaterial von 4 – 5 Wochen alten Wildtyp-Pflanzen (Col-0).

Das geerntete Pflanzenmaterial wurde mit 90 ml HP im Waring®-Labormixer für 5x 2 s homogenisiert und das Homogenat über zwei Lagen Miracloth® (22 – 25 µm Porengröße) und eine Lage Nylongewebe (100 µm Porengröße) filtriert. Das Filtrat wurde für 2 min bei 4.000 g (Avanti™ J-25, Rotor: JA-14) zentrifugiert und das Sediment vorsichtig mit einem weichen Pinsel in 5 ml HP resuspendiert. In zwei

15 ml-Corex®-Zentrifugenröhrchen wurden Dichtegradienten vorgelegt (zweistufig von unten nach oben: 3 ml 85 % Percoll®, 5 ml 45 % Percoll®) und diese gleichmäßig mit der Suspension überschichtet. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation im Ausschwingrotor (Avanti™ J-25, Rotor: JS-13.1) für 10 min bei 17.000 g mit geringer Beschleunigung und Bremsung, nach welcher sich die intakten Chloroplasten in der Interphase zwischen 85 % und 45 % Percoll® angesammelt haben. Die oberen Phasen wurden verworfen, die Chloroplasten in zwei saubere Corex®-Röhrchen überführt und auf ca. 15 ml mit HP aufgefüllt und vorsichtig gemischt. Nach Zentrifugation für 2 min bei 4.000 g wurde der Überstand abgossen und erneut mit HP auf ca. 15 ml aufgefüllt und wie zuvor zentrifugiert. Das Sediment wurde in 1 ml HP resuspendiert und in ein 1,5 ml-Eppendorf®-Röhrchen transferiert. Die Chlorophyllkonzentration der Chloroplasten-Suspension wurde nach Arnon (1949) bestimmt (siehe Kap. M.2.2.2.1.f).

<b>Homogenisierungspuffer (HP)</b>	50 mM	HEPES/KOH (pH 7,6)
	330 mM	Sorbitol
	2 mM	EDTA
	1 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1 mM	MnCl <sub>2</sub>
	<u>Frisch vor Gebrauch zugeben:</u>	
	5 mM	Natriumascorbat

<b>PEG-BSA-Ficoll®-Percoll® (PBF-Percoll®)</b>	<u>Gelöst in Percoll®:</u>	
	3 % (w/v)	PEG 6.000 (Polyethylenglycol)
	1 % (w/v)	BSA
	1 % (w/v)	Ficoll® 400

<b>Percoll®-Lösungen</b>	<b>85 % Percoll®</b>	<b>45 % Percoll®</b>
PBF-Percoll®	85 % (v/v)	45 % (v/v)
Sorbitol	330 mM	330 mM
HEPES/KOH (pH 7,6)	50 mM	50 mM
EDTA (pH 8,0)	2 mM	2 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM	1 mM

#### f) Messung der Chlorophyll-Konzentration

Zur Vereinheitlichung eingesetzter Chloroplasten-Mengen wurde zunächst die Chlorophyll-Konzentration der frisch angefertigten Chloroplasten-Suspensionen nach Arnon (1949) bestimmt. Hierbei wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Es wurden je 10 µl der Chloroplasten-Suspension in 990 µl 80 % Aceton aufgenommen. Die Proben wurden kräftig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 2 min bei 16.000 *g* und 4 °C (Heraeus Fresco™ 17) wurde jeweils die Extinktion des Überstandes bei den Wellenlängen 663 nm und 645 nm gemessen und entsprechende Mittelwerte gebildet. Diese wurden zur Berechnung der Chlorophyllkonzentration in folgende Formel eingesetzt:

$$c_{chl} \left[ \frac{\mu g}{\mu l} \right] = (20,2 \times A_{645} + 8,02 \times A_{663}) \times 0,1$$

Die Chloroplasten-Suspension wurde auf eine Chlorophyllkonzentration von 1 µg/µl verdünnt.

### g) Thylakoidpräparation

Alle Arbeits- und Zentrifugationsschritte wurden bei 4 °C bzw. auf Eis sowie mit vorgekühlten Lösungen und Geräten durchgeführt, um die Aktivität der präparierten Thylakoide zu bewahren. Zudem wurden die Thylakoid-Suspensionen nach Möglichkeit dunkel gehalten (Eisbehälter mit Deckel bzw. Zentrifugen-Becher und -Röhrchen mit Alufolie umwickelt). Beim Pipettieren der Thylakoid-Suspensionen wurden gestutzte Spitzen verwendet, um die Scherkräfte zu verringern.

Ein Volumen der Chloroplasten-Suspension entsprechend 750 µg Chlorophyll wurde zunächst 1 min bei 10.000 *g* (Heraeus Fresco™ 17) zentrifugiert und die pelletierten Chloroplasten in 800 µl HMP resuspendiert. Die Osmolyse der Hüllmembranen erfolgte während einer 10-minütigen Inkubation auf Eis. Anschließend wurden die Thylakoide für 5 min bei 10.000 *g* abzentrifugiert und das erhaltene Sediment zweimal mit HMP gewaschen. Abschließend wurden die sedimentierten Thylakoide in 1 ml HMP resuspendiert (finale  $c_{chl}$  0,75 µg/µl).

<b>HEPES-MgCl<sub>2</sub>-Puffer</b>	10 mM	HEPES/KOH (pH 8,0)
<b>(HMP)</b>	5 mM	MgCl <sub>2</sub>

#### 2.2.2.2. Proteinbiochemische Methoden

##### a) Extraktion membrangebundener Proteine

Wie von Berghöfer (Dissertation 1999) beschrieben, erfolgte die Extraktion membrangebundener Proteine durch die Zugabe von 2 M NaBr. Hierzu wurden die Mitochondrien-, Mitoplasten- oder Vesikel-Suspensionen mit NaBr versetzt und für 5 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation

(Mitochondrien und Mitoplasten für 10 min bei 16.000 g (Heraeus Fresco™ 17), Vesikel für 30 min bei 300.000 g (Optima™ MAX, Rotor: MLA-80)) wurden jeweils eine Überstand- und Sediment-Fraktion erstellt. Die Sediment-Fraktionen wurden vor der weiteren Verwendung zwei weitere Male mit frischem Puffer gewaschen, um alle extrahierten Proteine aus der Probe zu entfernen.

### b) *In vitro*-Proteintransport

Die Proteintransport-Versuche wurden nach dem von Rödiger (Dissertation 2010) beschriebenen Standardprotokoll modifiziert. Alle Arbeits- und Zentrifugationsschritte wurden, wenn nicht anders aufgeführt, auf Eis bzw. bei 4 °C und mit gekühlten Lösungen und Geräten durchgeführt. Beim Pipettieren der Thylakoid-Suspension wurden gestutzte Spitzen verwendet, um die Scherkräfte zu verringern. Für alle im Folgenden genannten Zentrifugationsschritte wurden die Mitochondrien für 5 min bei 16.000 g (Heraeus Fresco™ 17), Mitoplasten für 15 min bei 16.000 g (Heraeus Fresco™ 17), Vesikel für 30 min bei 300.000 g (Optima™ MAX, Rotor: MLA-80) und Thylakoide für 4 min bei 10.000 g (Heraeus Fresco™ 17) zentrifugiert.

<b>2x Importpuffer (IP)</b>	30 mM	HEPES/KOH (pH 7,4)
	600 mM	Saccharose
	10 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0,1 % (w/v)	BSA

<b>supplementierter Importpuffer (SIP)</b>	<u>Vor Gebrauch frisch herstellen:</u>	
	50 % (v/v)	2x IP (s. o.)
	4 mM	MgCl <sub>2</sub>
	4 mM	Methionin
	4 mM	ATP
	1 mM	GTP
	0,2 mM	ADP
	5 mM	Malat
	4,5 mM	DTT
	10 mM	Kaliumacetat
	10 mM	NaHCO <sub>3</sub>
2 mM	NADH	

<b>4x Laemmli-Probenpuffer (LPP)</b>	250 mM	TRIS/HCl (pH 6,8)
	8 % (w/v)	Natriumdodecylsulfat (SDS)
	40 % (w/v)	Glycerin
	20 % (w/v)	β-Mercaptoethanol
	0,016 % (w/v)	Coomassie® G-250 (Serva, Heidelberg)

**HMP** (s. o.)

**SRM** (s. o.)

Die Importansätze für Mitochondrien (M), Mitoplasten (MP), submitochondriale Vesikel (V) und Thylakoide (Thy) waren folgendermaßen zusammengesetzt und wurden je nach gewünschter Probenzahl hochskaliert:

<b>Proteintransport-Ansatz</b>	<b>M, MP, V</b>	<b>Thy</b>
SIP (s. o.)	90 $\mu$ l	–
Translations-Ansatz (s. Kap. M.2.2.1.h)	10 $\mu$ l	5 $\mu$ l
„Organell“-Suspension	10 $\mu$ l	40 $\mu$ l
	(mit $c_p$ 10 $\mu$ g/ $\mu$ l $\triangleq$ 100 $\mu$ g Protein)	(mit $c_{chl}$ 0,75 $\mu$ g/ $\mu$ l $\triangleq$ 30 $\mu$ g Chl)

Die Ansätze wurden für den Proteintransport im Wasserbad bei 25 °C mit eingeschalteter Beleuchtung (Lichtintensität von 20  $\mu$ E) inkubiert, wobei die Standard-Inkubationszeit hierbei 20 min betrug. Den Thylakoid-Ansätzen wurden nach der Inkubationszeit 55  $\mu$ l HMP zugegeben. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Transportansätze auf verschiedene Weise analysiert und das Standardprotokoll (siehe Rödiger, Dissertation 2010) dementsprechend variiert und angepasst.

### **Rekonstitution anti-TatA-blockierter Thylakoide**

Für einen Rekonstitutions-Versuch mit Thylakoiden mussten diese vor der Transport-Reaktion mit 0,25 Volumen TatA-spezifischen Antikörpern versetzt und für 45 min auf Eis inkubiert werden, um den Tat-Transport zu blockieren. Nach zwei Waschschritten mit HMP wurden die Thylakoide schließlich in HMP resuspendiert ( $c_{chl}$  0,75  $\mu$ g/ $\mu$ l) und der Transport-Ansatz wie bereits beschrieben pipettiert (s. o.). Zur Transport-Rekonstitution wurde einem Ansatz 1  $\mu$ M TatA-Protein (heterolog synthetisiert und aufgereinigt) zugegeben und ein weiterer Ansatz als Kontrolle unbehandelt belassen. Nach erfolgter Import-Reaktion im Wasserbad (20 min bei 25 °C und Beleuchtung) wurde analog zur Protease-Behandlung vorgegangen (s. u.).

### **Konsekutiver Proteintransport mit Mitochondrien**

Für zwei aufeinanderfolgende Proteintransporte wurde die Probe nach einer ersten Transportreaktion mit „Substrat 1“ zentrifugiert (s. o.) und das Sediment mit 1x IP gewaschen, um „Substrat 1“ möglichst vollständig aus der Organell-Umgebung zu entfernen. Anschließend wurde das Sediment, entsprechend einem neuen Proteintransport-Ansatz, in 90  $\mu$ l SIP resuspendiert und mit 10  $\mu$ l des

Translations-Ansatzes mit „Substrat 2“ versetzt. Die Probe wurde nun erneut bei 25 °C im Wasserbad inkubiert: Entweder für 20 min mit anschließender Protease-Behandlung (s. u.) oder analog zur Transportkinetik mit anschließender Cysteinmodifizierung (s. u.).

### Transportkinetik

Um den bei Mitochondrien ablaufenden Proteintransport (Import und Re-Export) im zeitlichen Verlauf zu beobachten, wurden Transportkinetiken durchgeführt.

Hierzu wurde der Importansatz entsprechend der Anzahl zu kontrollierender Zeitpunkte hochskaliert und im Wasserbad inkubiert. In mehrere 1,5 ml-Eppendorf®-Röhrchen wurden jeweils 5 µl Ionophor-Lösung vorgelegt und zu den entsprechenden Zeitpunkten (bspw. nach 0, 5, 30, 60 und 90 min) 55 µl des Import-Ansatzes entnommen und zur vorgelegten Ionophor-Lösung gegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 10 min auf Eis und die Zentrifugation (s. o.) der Probe. Das Sediment wurde in 1x IP gewaschen und zur Cystein-Modifizierung mit Thiol-reaktiven Reagenzien behandelt (s. u.).

#### Ionophor-Lösung

1 µM	Valinomycin (in Dimethylsulfoxid, DMSO)
100 µM	Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon (CCCP; in DMSO)

### Cystein-Modifizierung mit Thiol-reaktiven Reagenzien

Durch die Cystein-Modifizierung mithilfe Thiol-reaktiver Reagenzien wurde die Topologie von Membranproteinen überprüft.

Hierzu wurden die Proben nach erfolgter Transport-Reaktion zentrifugiert (s. o.), das Sediment einmal mit 1x IP gewaschen (wenn nicht bereits geschehen) und anschließend in 150 µl 1x IP + 500 µM AMS (bzw. 500 µM MalPEG<sub>x</sub> oder 100 µM MCCC) resuspendiert. Die Cystein-Modifizierung erfolgte für 30 min bei 30 °C im Wasserbad, woraufhin die Probe zentrifugiert (s. o.), das Sediment mit 1x SRM gewaschen und anschließend in 25 µl 2x LPP aufgenommen wurde.

### Protease-Behandlung

Die Behandlung des Import-Ansatzes mit einer Protease diente der Kontrolle einer stattgefundenen Transportreaktion, da nicht importierte Proteine (außerhalb der präparierten Organellen bzw. Membransysteme) durch die Protease degradiert werden.

Der Importansatz wurde nach erfolgter Inkubation zentrifugiert (s. o.) und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde einmal mit 1x IP gewaschen und in 200 µl 1x IP resuspendiert (M, MP, V) bzw. zunächst mit HMP gewaschen und anschließend in 200 µl HMP resuspendiert (Thy). Die Probe wurde

anschließend halbiert und ein Aliquot mit 1/10 Volumen Thermolysin (2 mg/ml in 25 mM CaCl<sub>2</sub>) oder Proteinase K (0,2 mg/ml) versetzt und zusammen mit dem unbehandelten Aliquot für 30 min auf Eis inkubiert. Die Protease-Reaktion wurde durch Zugabe von 1/30 Volumen 0,5 M EDTA für Thermolysin bzw. 1/20 Volumen 100 mM PMSF (in Isopropanol) für Proteinase K abgestoppt. Die Proben wurden zentrifugiert (s. o.), das Sediment jeweils mit 1x SRM gewaschen und abschließend in 25 µl 2x LPP aufgenommen.

### c) Denaturierende Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die denaturierende Gelelektrophorese wurde basierend auf den Arbeiten von Laemmli (1970) durchgeführt. Die zu analysierenden Proben wurden mit LPP versetzt (Endkonzentration 1-2x) und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Das SDS bindet gleichmäßig an die denaturierten Proteine und verleiht diesen ein konstantes Ladung:Masse-Verhältnis. Die Auftrennung der denaturierten und linearisierten Proteine erfolgte im elektrischen Feld bei 80 – 100 V durch eine poröse Polyacrylamid-Gelmatrix, in welcher die Proteine durch den Molekularsiebeffekt der Gelmatrix, entsprechend ihrem hydrodynamischen Radius und somit dem Molekulargewicht, separiert wurden. Die Gelelektrophorese lief meist über Nacht bis zum Erreichen einer Voltstundenzahl von etwa 1500 Vh. Sowohl an Kathode als auch Anode wurde SDS-Laufpuffer verwendet.

<b>SDS-Laufpuffer</b>	25 mM	TRIS/HCl (pH 8,3)
	192 mM	Glycin
	0,1 % (w/v)	SDS

Für die Herstellung von Gradientengelen wurden die Trenngel-Lösungen in einen Gradientenmischer überführt und auf einem erhöhten Magnetrührer platziert, sodass der Gießvorgang durch Schwerkraft erfolgen konnte. Während der Polymerisation wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet und dieses anschließend entfernt, woraufhin die Sammelgel-Lösung eingegossen und der Teflonkamm eingeführt wurde. Alle Polyacrylamid-Gele wurden mit den Dimensionen 200 mm x 200 mm x 1 mm angefertigt.

**SDS-PA-Gel (10 % Acrylamid)**

<b>Stammlösung</b>	<b>Trenngel 10 % (w/v) A</b>	<b>Sammelgel 5 % (w/v) A</b>
H <sub>2</sub> O	14,8 ml	6,9 ml
2M TRIS/HCl (pH 8,8)	6 ml	–
1M TRIS/HCl (pH 6,8)	–	1,2 ml
30 % Acrylamid	10,7 ml	1,7 ml
10 % SDS	320 µl	100 µl
10 % APS	140 µl	80 µl
TEMED	14 µl	8 µl
Gesamtvolumen	32 ml	10 ml

**SDS-PA-Gel (12,5 % Acrylamid)**

<b>Stammlösung</b>	<b>Trenngel 12,5 % (w/v) A</b>	<b>Sammelgel 5 % (w/v) A</b>
H <sub>2</sub> O	12,2 ml	6,9 ml
2M TRIS/HCl (pH 8,8)	6 ml	–
1M TRIS/HCl (pH 6,8)	–	1,2 ml
30 % Acrylamid	13,3 ml	1,7 ml
10 % SDS	320 µl	100 µl
10 % APS	140 µl	80 µl
TEMED	14 µl	8 µl
Gesamtvolumen	32 ml	10 ml

**SDS-PA-Gradientengel (10 % - 17,5 % Acrylamid)**

<b>Stammlösung</b>	<b>Trenngel 10 % (w/v) A</b>	<b>Trenngel 17,5 % (w/v) A</b>	<b>Sammelgel 5 % (w/v) A</b>
H <sub>2</sub> O	6,5 ml	–	6,9 ml
2M TRIS/HCl (pH 8,8)	3 ml	3 ml	–
1M TRIS/HCl (pH 6,8)	–	–	1,2 ml
80 % Saccharose	0,93 ml	3,47 ml	–
30 % Acrylamid	5,3 ml	9,3 ml	1,7 ml
10 % SDS	160 µl	160 µl	100 µl
10 % APS	70 µl	70 µl	80 µl
TEMED	7 µl	7 µl	8 µl
Gesamtvolumen	16 ml	16 ml	10 ml

**d) Solubilisierung von Membranprotein-Komplexen**

Die Solubilisierung mitochondrialer Proteinkomplexe erfolgte modifiziert nach Eubel *et al.* (2003) unter Verwendung von Digitonin als Detergens (in einem Detergens:Protein-Verhältnis von 5:1). Eine Probe entsprechend 100 – 200 µg Protein wurde für 10 min bei 16.000 *g* zentrifugiert (Heraeus Fresco™ 17) und das Sediment in Solubilisierungspuffer resuspendiert ( $\cong c_p$  10 µg/µl). Nach einer 20-minütigen

Inkubation auf Eis wurde unsolubilisiertes Material für 30 min bei 22.000 g (Optima™ MAX, Rotor: MLA-80) abzentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml-Eppendorf®-Röhrchen überführt. Anschließend wurde BN-Probenpuffer zugegeben (Detergens:Coomassie®-Verhältnis von 8:1) und die Proben mittels nativer Gelelektrophorese analysiert (s. u.).

**Solubilisierungspuffer**Vor Gebrauch frisch herstellen:

30 mM	HEPES/KOH (pH 7,4)
150 mM	Kaliumacetat
10 % (v/v)	Glycerin
2 mM	PMSF
5 % (w/v)	Digitonin

**BlueNative-Probenpuffer  
(BN-Probenpuffer)**

5 % (w/v)	Coomassie® Brilliantblau G-250
750 mM	ε-Aminocapronsäure

**e) Native Gelelektrophorese (BN-PAGE)**

Die solubilisierten Proteinkomplexe wurden in einer Polyacrylamid-Gelmatrix elektrophoretisch separiert (modifiziert nach Schägger *et al.*, 1994). Der zugesetzte Farbstoff Coomassie® Brilliantblau verleiht den Proteinkomplexen nach Bindung zwar eine insgesamt negative Gesamtladung, allerdings ist das Ladung:Masse-Verhältnis verschiedener Protein-Farbstoff-Komplexe nicht konstant, und die Proteinkomplexe werden somit nicht nach ihrem Molekulargewicht sondern ihrer Größe aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht bei einer Spannung von 100 V mit Anodenpuffer und dem Coomassie®-haltigen Kathodenpuffer 1. Anschließend wurde der Kathodenpuffer 1 durch Kathodenpuffer 2 (ohne Coomassie®) ausgetauscht und die Elektrophorese mit einer Spannung von 400 V für ca. 3 h fortgesetzt.

**Kathodenpuffer 1**

15 mM	BIS-TRIS (pH nicht eingestellt)
50 mM	Tricin
0,01 % (w/v)	Coomassie® Brilliantblau G-250

**Kathodenpuffer 2**

15 mM	BIS-TRIS (pH nicht eingestellt)
50 mM	Tricin

**Anodenpuffer**

50 mM	BIS-TRIS (pH nicht eingestellt)
-------	---------------------------------

Für die Herstellung des Gradientengels wurden die Trenngel-Lösungen in einen Gradientenmischer überführt und auf einem erhöhten Magnetrührer platziert, sodass der Gießvorgang durch Schwerkraft erfolgen konnte. Während der Polymerisation wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet und dieses anschließend entfernt, woraufhin die Sammelgel-Lösung eingegossen und der Teflonkamm eingeführt wurde. Das Polyacrylamid-Gel wurde mit den Dimensionen 200 mm x 200 mm x 1 mm angefertigt.

#### BN-PA-Gradientengel (5 % - 13,5 % Acrylamid)

Stammlösung	Trenngel 5 % (w/v) A	Trenngel 13,5 % (w/v) A	Sammelgel 3,6 % (w/v) A
H <sub>2</sub> O	6,6 ml	1,3 ml	5,1 ml
0,5 M BIS-TRIS/HCl (pH 7,0)	1,6 ml	1,6 ml	1 ml
30 % Acrylamid	2,7 ml	7,2 ml	1,2 ml
2 M ε-Aminocaprinsäure	4 ml	4 ml	2,5 ml
87 % Glycerin	0,95 ml	1,7 ml	–
10 % APS	70 µl	70 µl	90 µl
TEMED	7 µl	7 µl	9 µl
Gesamtvolumen	16 ml	16 ml	10 ml

#### f) Kolloidale Coomassie®-Färbung

Zur Visualisierung der separierten Proteine und Proteinkomplexe wurden die Proteingele (SDS- und BN-Gele) einer kolloidalen Coomassie®-Färbung (KoCo) nach Neuhoff *et al.* (1985) unterzogen. Zunächst wurden die Proteine für 30 min (SDS-Gel) bzw. 60 min (BN-Gel) in Fixierlösung schwenkend inkubiert. Anschließend wurde das zu färbende Gel über Nacht auf dem Schüttler in der Färbelösung inkubiert. Der Gelhintergrund wurde in mehreren Waschschritten mit Wasser entfärbt und das Gel zur Digitalisierung eingescannt.

<b>KoCo-Fixierlösung</b>	40 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Essigsäure
<b>Lösung A</b>	2 % (w/v)	85 % Phosphorsäure
	10 % (w/v)	Ammoniumsulfat
<b>Lösung B</b>	5 % (w/v)	Coomassie® Brilliantblau G-250

<b>Färbelösung</b>	98 % (v/v) Lösung A (s. o.)
	2 % (v/v) Lösung B (s. o.)
	<u>Über Nacht rühren, dann Zugabe von:</u> ¼ Volumen Methanol

### g) Western Blot (*semi-dry*) und Immundetektion

Nach erfolgter Gelelektrophorese konnten die separierten Proteine und Proteinkomplexe aus der Gelmatrix zur anschließenden Immundetektion auf eine Membran übertragen werden (Western Blot). Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte der Transfer in einem *semi-dry*-Verfahren auf PVDF-Membranen mit einer Porengröße von 0,2 µm (Roti®-PVDF 2.0, Carl Roth).

#### Western Blot nach SDS-PAGE

Der Western Blot nach denaturierender SDS-PAGE wurde modifiziert nach Towbin *et al.* (1979) und Gallagher *et al.* (2008) durchgeführt. Die PVDF-Membran und sechs Filterpapiere (Whatman® 3 MM CHR; GE Healthcare, Little Chalfont, UK) wurden auf Gelgröße zugeschnitten und die Membran zunächst für 1 min in 100 % Methanol inkubiert und anschließend in Transferpuffer equilibriert. Das SDS-Gel wurde ebenfalls für 1 min in Transferpuffer inkubiert, die Filterpapiere kurz mit Transferpuffer getränkt und anschließend der *semi-dry*-Blot aufgebaut (von unten nach oben: Anodenplatte, 3x Filterpapier, Membran, Gel, 3x Filterpapier, Kathodenplatte). Für einen vollständigen Transfer wurden Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen durch das Ausrollen mit einem Glasröhrchen entfernt. Der Proteintransfer erfolgte für 120 min bei einer konstanten Stromstärke von 1,5 mA/cm<sup>2</sup>.

<b>Transferpuffer</b>	25 mM TRIS/HCl (pH 8,3)
	192 mM Glycin
	10 % (v/v) Methanol

#### Western Blot nach BN-PAGE

Der Transfer nativer Proteinkomplexe wurde nach dem von Reimers (Dissertation 2020) beschriebenen Protokoll durchgeführt und entsprechend ein 3-Puffer-System verwendet. Die Dauer des Proteintransfers wurde aufgrund der Verwendung dickerer BN-PA-Gele auf 90 min angepasst.

Das BN-Gel wurde für 15 min in Kathodenpuffer inkubiert. Die PVDF-Membran wurde zunächst mit Methanol benetzt und kurz mit deionisiertem Wasser gespült, daraufhin für 5 min in Anodenpuffer II equilibriert. Die Filterpapiere wurden kurz in den entsprechenden Transferpuffern getränkt und

anschließend der *semi-dry*-Blot aufgebaut (von unten nach oben: Anodenplatte, 2x Filterpapier in AP I, 1x Filterpapier in AP II, Membran, Gel, 3x Filterpapier in KP, Kathodenplatte). Für einen vollständigen Transfer wurden Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen durch das Ausrollen mit einem Glasröhrchen entfernt. Der Proteintransfer erfolgte für 90 min bei einer konstanten Stromstärke von 1,2 mA/cm<sup>2</sup>. Die Proteinkomplexe und der verwendete *high molecular weight*(HMW)-Größenstandard wurden anschließend gefärbt (s. u.)

<b>Kathodenpuffer (KP)</b>	25 mM	TRIS (pH nicht eingestellt)
	40 mM	ε-Aminocapronsäure
	10 % (v/v)	Methanol
<b>Anodenpuffer II (AP II)</b>	25 mM	TRIS (pH nicht eingestellt)
	10 % (v/v)	Methanol
<b>Anodenpuffer I (AP I)</b>	300 mM	TRIS (pH nicht eingestellt)
	10 % (v/v)	Methanol

### Coomassie®-Färbung der Membran

Um den ungefärbten HMW-Größenstandard sichtbar zu machen, wurde die PVDF-Membran nach dem Proteintransfer von Proteinkomplexen mit dem Farbstoff Coomassie® Brilliantblau R-250 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) gefärbt. Hierzu wurde die Membran für 1 – 2 min in Membran-Färbelösung geschwenkt und anschließend mehrfach mit Entfärbelösung gewaschen, bis der Hintergrund ausreichend entfärbt und Protein- bzw. Markerbanden sichtbar wurden. Die gefärbte Membran wurde zur Digitalisierung eingescannt und anschließend für wenige Minuten in 100 % Methanol komplett entfärbt.

<b>Membran-Färbelösung</b>	0,2 % (w/v)	Coomassie® R-250
	40 % (v/v)	Methanol
	7 % (v/v)	Essigsäure
<b>Entfärbelösung</b>	50 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Essigsäure

### Antikörperbehandlung

Nach erfolgtem Proteintransfer (und gegebenenfalls einer Membran-Färbung) wurde die PVDF-Membran für 120 min in Blockierlösung bei Raumtemperatur geschwenkt. Anschließend wurde die Lösung abgegossen und die Membran für 120 min in Antikörperlösung inklusive der primären Antikörper in entsprechender Verdünnung (siehe Kap. M.2.1.13) schwenkend bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten einige Waschstschritte (4x 10 min) mit Waschpuffer und die darauffolgende Detektion des gebundenen primären Antikörpers durch die Inkubation der Membran in Antikörperlösung inklusive sekundärer Antikörper (1:10.000) für 60 min schwenkend bei Raumtemperatur. Die Membran wurde abschließend 4x 10 min mit Waschpuffer gewaschen.

<b>Waschpuffer</b>	10 mM TRIS/HCl (pH 7,4) 150 mM NaCl 0,1 % (v/v) Tween® 20 (Carl Roth)
<b>Blockierlösung</b>	<u>Gelöst in TBS-T:</u> 5 % (w/v) Milchpulver (fettreduziert)
<b>Antikörperlösung</b>	<u>Gelöst in TBS-T:</u> 2 % (w/v) Milchpulver (fettreduziert)

### Enhanced chemiluminescence (ECL)-Detektion

Bei dem sekundären Antikörper handelt es sich um ein anti-*rabbit*-Antikörperkonjugat, welches mit der *horseradish peroxidase* (HRP) gekoppelt vorliegt. Die Peroxidaseaktivität dieser Antikörper lässt sich in einer ECL-Reaktion visualisieren und aufnehmen. Hierzu wurde die Membran vorsichtig von überschüssiger Waschlösung befreit und mit ECL-Lösung benetzt. Nach 1 min Inkubation wurde die Reaktion in einer komplett abgedunkelten Chemilumineszenz-Kamera (Fusion FX; Vilber, Collégien, Frankreich) nach Herstellerangaben aufgenommen und die Signale mit der zugehörigen Software (Evolution-Capt, Vilber) digital festgehalten.

<b>ECL-Lösung</b>	100 mM TRIS/HCl (pH 8,5) 0,2 mM Cumarin 1,25 mM Luminol <u>Unmittelbar vor Gebrauch zugeben:</u> 0,01 % (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
-------------------	---

### h) Visualisierung und Quantifizierung radioaktiver Signale

Nach erfolgter Gelelektrophorese radioaktiver Proteinproben (bspw. nach einem *in vitro*-Proteintransport) wurde das Gel für 30 min (SDS-Gel) bzw. 45 min (BN-Gel) zur Fixierung der Proteine und der Gel-Dehydrierung in Fixierlösung geschwenkt. Anschließend wurde das bei Unterdruck und langsamer Erwärmung auf 80 °C für ca. 100 min (SDS-Gel) bzw. 120 min (BN-Gel) auf Filterpapier getrocknet. Anschließend wurde eine Speicherplatte (*storage phosphor screen*) mit dem Gel in einer Aufnahmekassette exponiert (meist 3 Tage), sodass die vom Gel ausgesendete Strahlung auf der Platte chemisch gespeichert und in einem Phosphorimager (FLA-3000; Fujifilm, Düsseldorf) und mithilfe der zugehörigen Software (BASReader v3.14; Raytest, Straubenhardt) ausgelesen werden konnte.

Die densitometrische Analyse der in BASReader erstellten Abbildungen zur Erhebung quantitativer Daten wurde in der Software „AIDA Image Analyzer“ v5.0 (Raytest) durchgeführt. Für die einzelnen Spuren wurden rechteckige Densitometerfenster definiert, um zunächst die Profile der Spuren zu erstellen. Diese bestehen aus der summierten Signalintensität (als *photo-stimulated luminescence* (PSL) ausgegeben), aufgetragen gegen die Länge des Densitometers. Die zu quantifizierenden Banden wurden festgelegt und deren Signalintensität integriert. Die erhaltenen Werte dienen als Grundlage der Berechnung relativer Signalintensitäten.

### 2.2.2.3. Photometrische Enzymaktivitätsmessungen

#### a) Messung der NADH-Oxidation

Die photometrische Messung der Komplex I-abhängigen NADH-Oxidation wurde modifiziert nach Barrientos *et al.* (2009) und Gndt *et al.* (2017) durchgeführt. Die Messungen erfolgten in einem UV-VIS-Spektrophotometer (UV-1900; Shimadzu, Kyōto, Japan) mit der zugehörigen Software (UVProbe v2.70; Shimadzu).

<b>Komplex 1-Puffer</b>	20 % (v/v)	5x SRM (s. o.)
<b>(K1-Puffer)</b>	240 mM	Kaliumcyanid
	4 mM	Antimycin A

Hierzu wurden 800 µl 1x SRM, 200 µl K1-Puffer und Mitochondrien- bzw. Mitoplasten- oder Vesikel-Suspension entsprechend 150 µg Protein in einer 1 ml-Küvette vereinigt und zunächst der Nullwert bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen (Absorptionsmaximum von NADH). Im K1-Puffer sind die Inhibitoren Antimycin A und Kaliumcyanid (KCN) enthalten, welche durch die Inhibierung von

Komplex III und Komplex IV gewährleisten, dass nur das im Überschuss zugegebene Ferricyanid reduziert und ein Einfluss der respiratorischen Elektronentransportkette auf die gemessene NADH-Oxidation ausgeschlossen werden kann. Durch die Zugabe von 160  $\mu\text{M}$  NADH und 1 mM Ferricyanid wurde die Reaktion gestartet und auch die Messung wurde möglichst sofort nach NADH-Zugabe begonnen. Diese verlief für ca. 5 min bei einer Wellenlänge von 340 nm.

### b) Messung der ATP-Synthase-Aktivität

Die photometrische Messung der Komplex V-Aktivität wurde anhand des pH-sensitiven Farbstoffes Acridin Orange (AO) durchgeführt und erfolgte in einem UV-VIS-Spektrophotometer (UV-1900) mit der zugehörigen Software (UVProbe v2.70).

#### **Komplex 5-Puffer (K5-Puffer)**

#### Vor Gebrauch frisch herstellen:

25 mM	HEPES/KOH (pH 7,5)
300 mM	Sorbitol
25 mM	KCl
5 mM	MgCl <sub>2</sub>
1 mM	DTT
6 mM	Acridin Orange (Sigma-Aldrich)

In einem Heizblock wurde 1 ml vorgelegter K5-Puffer auf 25 °C temperiert. Mitochondrien- bzw. Mitoplasten- oder Vesikel-Suspension entsprechend 100  $\mu\text{g}$  Protein wurden zugegeben und das Gemisch in einer 1 ml-Küvette für 5 min inkubiert. Anschließend wurde der Nullwert bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen (Absorptionsmaximum von monomeren AO-Molekülen) und daraufhin die Messung begonnen. Der Reaktionsstart erfolgte nach insgesamt 60 s durch die Zugabe von 1 mM ATP (frisch gelöst in K5-Puffer). Nach insgesamt 300 s wurde die Reaktion durch die Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  Gramicidin (in DMSO) abgestoppt.

#### **2.2.2.4. Elektronenmikroskopie**

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurde zur Untersuchung der Morphologie, Qualität und Reinheit der präparierten submitochondrialen Vesikel genutzt.

Hierzu wurde eine Vesikel-Suspension entsprechend 100  $\mu\text{g}$  Protein 1:1 mit Fixativ gemischt und zur Erhaltung der Ultrastruktur für 30 – 60 min schüttelnd und anschließend über Nacht bei 4 °C fixiert. Nach einer Zentrifugation für 15 min bei 22.000 g und 4 °C (Optima™ MAX, Rotor: MLA-80) wurde das Sediment in 4 % Agar (frisch gelöst in 0,1 M SCB) resuspendiert und die enthaltenen Vesikel

immobilisiert. Ab diesem Schritt (inklusive der Immobilisierung in Agar) wurden die Proben vom Servicebereich Elektronenmikroskopie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung von Dr. Gerd Hause weiterbearbeitet. Die Agarblöcke wurden in kleine Stücke geschnitten und diese 6x 8 min mit 0,1 M SCB gewaschen. Anschließend wurden die Blöcke für eine Vorfärbung der Biomembranen in 0,1 M SCB + 1 % OsO<sub>4</sub> für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde 2x 10 min mit Wasser gewaschen und daraufhin jeweils 30 min mit Ethanol in aufsteigender Konzentration dehydriert (10 %, 30 %, 50 % Ethanol). Ebenfalls zur Vorfärbung und Dehydrierung diene die anschließende Inkubation in 70 % Ethanol + 1 % Uranylacetat für 30 min bei Raumtemperatur. Es wurde nun weiter für je 30 min mit 90 % und dann 100 % Ethanol dehydriert. Als nächstes wurden die Agarblöcke mit Epoxidharz (SEH) nach Spurr (1969) bei Raumtemperatur infiltriert: 3 h in 25 % SEH (verdünnt mit 100 % Ethanol), 4 h in 50 % SEH (verdünnt in 100 % Ethanol), über Nacht in 75 % SEH (verdünnt in 100 % Ethanol) und 6 h in 100 % SEH. Die Polymerisation des Epoxidharzes erfolgte in etwa 1 ml frischem SEH (100 %) für 18 h bei 70 °C. In einem Ultramikrotom (Ultracut R; Leica, Wetzlar, Germany) wurden 70 nm-dünne Schnitte angefertigt und diese auf Kupfer-Grids mit Cedukol™-Beschichtung (Merck, Darmstadt) übertragen. Die Schnitte wurden in einem automatisierten Schnittfärber (EM-Stain apparatus; Leica) bei 25 °C für 60 min mit 1 % Uranylacetat und 10 min mit 3 % Bleicitrat nachgefärbt und anschließend im TEM (Zeiss EM 900; Oberkochen) bei 80 kV analysiert. Die Mikrographien wurden mit einer SSCCD SM-1k-120 Kamera (TRS, Moorenweis, Deutschland) aufgenommen.

<b>Natriumcacodylat-Puffer (NCP)</b>	0,2 M Natriumcacodylat (pH 7,2)
<b>Fixativ</b>	<u>Vor Gebrauch frisch herstellen:</u> 0,2 M SCB (pH 7,2) 6 % (w/v) Glutaraldehyd 0,33 M Sorbitol
<b>Spurr-Epoxidharz (SEH)</b>	<u>Nach Herstellerangaben vorbereiten:</u> Spurr <i>low viscosity embedding</i> -Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

## 3. Ergebnisse

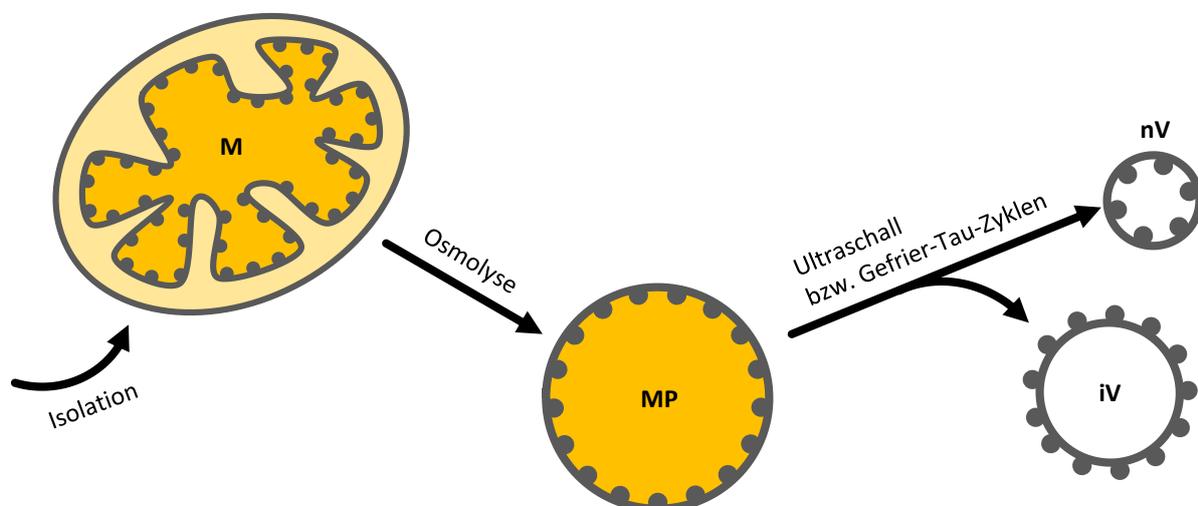
### 3.1. Etablierung eines geeigneten Systems zur Untersuchung der mtTat-Translokase

Die Tat-Translokase in den Mitochondrien höherer Pflanzen (in der weiteren Arbeit auch als mtTat bezeichnet) konnte mittlerweile nachgewiesen, und auch dessen Funktionalität in *Arabidopsis thaliana* bestätigt werden (siehe Kap. 1.4.2). Bislang ist jedoch nur wenig über die spezifischen Charakteristika und die genaue Funktionsweise der pflanzlichen mtTat-Translokase bekannt. Beispielsweise stellt sich die Frage, ob die kerncodierte und dual lokalisierte (also in Chloroplasten und Mitochondrien importierte) Untereinheit TatA nicht nur für die Funktion der thylakoidären, sondern auch der mitochondrialen Tat-Translokase erforderlich ist (Bennewitz *et al.*, 2020). Alle bislang bekannten und funktionalen Tat-Systeme benötigen TatA, so auch jene in Chloroplasten und *E. coli* (Müller und Klösgen, 2005) sowie in Alphaproteobakterien (Nuñez *et al.*, 2012, Fröbel *et al.*, 2012b), von welchen die endosymbiontischen Mitochondrien vermutlich abstammen (Spang *et al.*, 2015, Wang und Wu, 2015). Eine Funktion von TatA in pflanzlichen Mitochondrien und weitere Gemeinsamkeiten der Tat-Translokasen aus Thylakoiden, Bakterien und pflanzlichen Mitochondrien scheinen demnach zunächst wahrscheinlich und wurden im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht. Detaillierte Analysen der mitochondrialen Tat-Translokase sind jedoch vor allem durch die in Mitochondrien gegebene Translokationsrichtung, entsprechend einem Re-Export der mtTat-Substrate aus der Matrix in den Intermembranraum (Schema siehe Einleitung Abb. 1.5), deutlich erschwert. Aus diesem Grund musste zunächst eine geeignete Methode etabliert werden, welche die weiterführenden Untersuchungen der mitochondrialen Tat-Translokase, der von ihr transportierten Substrate, und des dabei ablaufenden Translokationsprozesses erlaubt. Hierzu wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei sich ergänzende Ansätze verfolgt: 1. Durch die Präparation invertierter submitochondrialer Vesikel sollte die Richtung der Proteintranslokation umgekehrt und dadurch die mtTat-Translokase für weiterführende Untersuchungen zugänglich gemacht werden (siehe Kap. 3.1.1). 2. Für Analysen der mtTat-Translokase an intakten Mitochondrien wurden Thiol-reaktive Reagenzien eingesetzt, welche durch die Modifizierung freier Cysteinreste eine Bestimmung der Proteintopologie transportierter mtTat-Substrate zulassen (siehe Kap. 3.1.2).

### 3.1.1. Präparation invertierter submitochondrialer Vesikel

Durch die Präparation invertierter submitochondrialer Vesikel der inneren Hüllmembran sollte ein potentielles Modellsystem für den mitochondrialen Proteinexport etabliert werden. Die Isolierung der inneren Hüllmembran in Form invertierter Vesikel würde es theoretisch ermöglichen, mitochondriale Exportprozesse in Importprozesse zu überführen, die unter standardisierten und kontrollierbaren Bedingungen untersucht werden können. Dies würde die Anwendung von bereits an anderen Systemen etablierten Ansätzen zur Untersuchung der Tat-Proteintranslokation erlauben. Beispielsweise könnte analog zu den bereits an isolierten Thylakoiden beschriebenen Rekonstitutionsversuchen auch für eine Analyse des mitochondrialen Tat-Systems vorgegangen werden: An isolierten Thylakoiden kann zunächst die intrinsische Aktivität von TatA bzw. TatB durch spezifische Antikörper oder durch eine Extraktion mit chaotropen Salzen inhibiert, und anschließend durch die Zugabe heterolog synthetisierter TatA- bzw. TatB-Untereinheiten rekonstituiert werden (Dabney-Smith *et al.*, 2003, Zinecker *et al.*, 2020).

Zur Vesikelpräparation wurde zunächst die äußere Hüllmembran isolierter Mitochondrien osmolytisch entfernt und die entstandenen Mitoplasten an mehreren Membranpositionen geöffnet. Die resultierenden Membranfragmente tendieren aufgrund der physikochemischen Eigenschaften amphiphiler Membranlipide zu einem raschen Zusammenschluss, wodurch Membranvesikel mit zwei potentiellen Orientierungen entstehen können: Nicht-invertierte Vesikel entsprechend der



**Abb. E.1: Schema zur Präparation invertierter submitochondrialer Vesikel.**

Schematische Darstellung der Osmolyse isolierter Mitochondrien (M) zur Generierung von Mitoplasten (MP) mit anschließender Präparation invertierter (iV) und nicht-invertierter (nV) submitochondrialer Vesikel mittels Ultraschallbehandlung oder wiederholten Gefrier-Tau-Zyklen. Die grauen Punkte auf der Oberfläche der inneren Mitochondrienmembran visualisieren die Matrix-zugewandte Membranseite. Für eine detaillierte Beschreibung der Präparation von Mitochondrien, Mitoplasten und Vesikelfraktionen siehe Kapitel M.2.2.2.1.a-d.

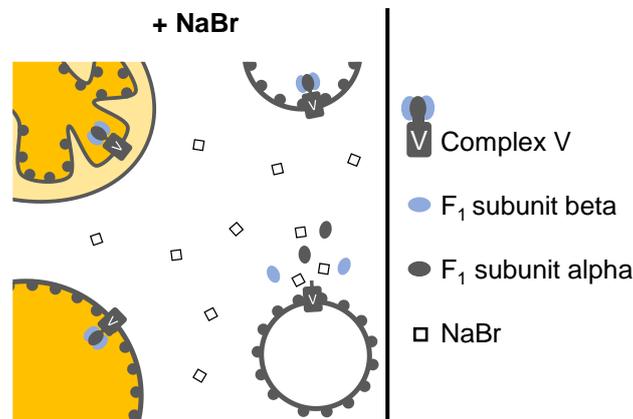
physiologischen Orientierung der inneren Hüllmembran, und invertierte Vesikel, bei welchen die normalerweise Matrix-zugewandte Seite der Membran nun nach außen orientiert ist (Schema siehe Abb. E.1). Die Ultraschallbehandlung ist die meistzitierte Methode zur Präparation invertierter Vesikel und wird im Vergleich zur French-Press häufig als effizienter und geeigneter eingestuft (Kay *et al.*, 1985, Petit *et al.*, 1987), weshalb einerseits Ultraschall als verwendete Präparationsmethode gewählt wurde. Im Falle pflanzlicher Plasmamembranen konnte zudem gezeigt werden, dass wiederholte Gefrier-Tau-Zyklen zur Entstehung mehrheitlich invertierter, intakter und enzymatisch aktiver Membranvesikel führen (Palmgren *et al.*, 1990), was allerdings an Mitochondrien bisher nicht eingehender getestet wurde. Da es sich beim Schockgefrieren und schonenden Auftauen von Mitoplasten im Vergleich zu Ultraschall um ein insgesamt deutlich „sanfteres“ Verfahren handelt, wurde diese Methode alternativ zur Ultraschallbehandlung ebenfalls getestet. Die resultierenden Vesikelfractionen beider Methoden wurden hinsichtlich ihrer Membranorientierung und Aktivität charakterisiert, um eine geeignete Methode zur Präparation invertierter submitochondrialer Vesikel identifizieren zu können.

### **3.1.1.1. Charakterisierung präparierter Vesikelfractionen**

#### **a) Membranorientierung**

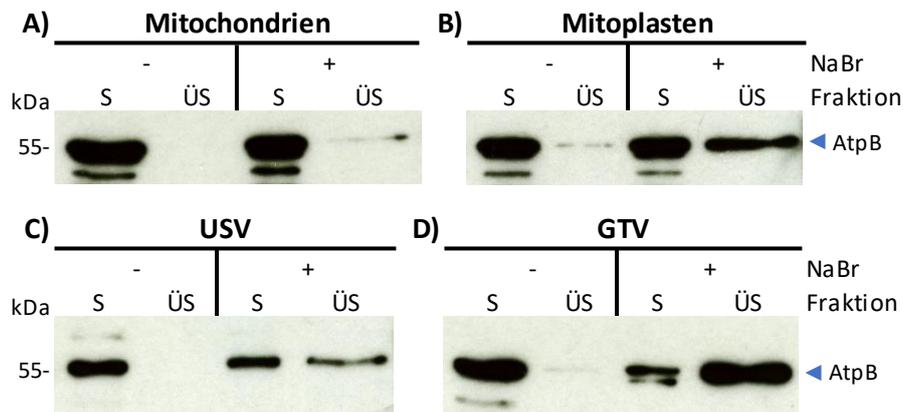
Ein Ansatz zur Bestimmung der Membranorientierung ist die NaBr-Behandlung und anschließende Immundetektion spezifischer Membrankomponenten mit bekannter Topologie. Das vergleichsweise milde chaotrope Salz NaBr (Hofmeister, 1888) führt ab einer Konzentration von 0,2 M zur Dissoziation der von außen an Membranen gebundenen Proteine, sodass sich diese im Überstand anreichern (Frielingsdorf *et al.*, 2008, Hauer *et al.*, 2017). Zur Steigerung der Dissoziationseffizienz oder zur Extraktion von Membranproteinen sind höhere Konzentration um 2 M NaBr erforderlich (Dissertation Berghöfer, 1999). Nach der Behandlung mit NaBr kann mithilfe spezifischer Antikörper die Membrantopologie dieser Proteine durch Analyse von Überstand- und Sedimentfraktionen untersucht werden. Ein geeignetes Zielprotein ist beispielsweise die  $F_1\beta$ -Untereinheit der ATP-Synthase (AtpB), dessen Topologie hier vergleichend in Mitochondrien-, Mitoplasten- und Vesikelfractionen analysiert wurde. Der  $F_1$ -Subkomplex der ATP-Synthase ist an den membrandurchspannenden  $F_0$ -Subkomplex gebunden. Eine Inversion der Membran führt dazu, dass der  $F_1$ -Subkomplex in das Umgebungsmedium ragt, wo dieser für äußerlich zugeführtes NaBr zugänglich ist und dementsprechend vom Kernkomplex dissoziiert (Hatefi und Hanstein, 1970). Dies führt in Anwesenheit invertierter Vesikel zu einer Akkumulation von AtpB im Überstand (Schema siehe Abb. E.2). In dieser Arbeit wurden gegen AtpB

gerichtete Antikörper genutzt, um die Membrantopologie des  $F_1$ -Subkomplexes zu untersuchen und somit eine Einschätzung der Membranorientierung zu ermöglichen.



**Abb. E.2: Schema zur Untersuchung der Membranorientierung (sub)mitochondrialer Fraktionen mittels NaBr-Extraktion.** Das milde chaotrope Salz NaBr führt zur Extraktion der zugänglichen  $F_1$ -Untereinheiten und damit zur Akkumulation der ATP-Synthase  $F_1\beta$ -Untereinheit (AtpB) im Überstand. Für NaBr sind nur nach außen gerichtete  $F_1$ -Untereinheiten zugänglich, weshalb eine NaBr-bedingte Dissoziation von AtpB und anschließende Akkumulation im Überstand bei invertierten Vesikeln am stärksten ist.

AtpB hat ein Molekulargewicht von etwa 55 kDa (Heazlewood *et al.*, 2003) und kann nach erfolgter Gelelektrophorese und anschließendem Proteintransfer auf eine PVDF-Membran mit spezifischen Antikörpern auf der entsprechenden Laufhöhe detektiert werden (siehe Abb. E.3). Darüber hinaus gibt es eine Kreuzreaktion mit einem weiteren mitochondrialen Proteinen mit einem Molekulargewicht von etwa 45 kDa, welche insbesondere in den Sedimentfraktionen der Mitochondrien und Mitoplasten (siehe Abb. E.3 A,B), aber auch in der Sedimentfraktion un behandelter Vesikel sichtbar ist (siehe Abb. E.3 D). Hierbei handelt es sich vermutlich ebenfalls um ein membrangebundenes Protein, da dieses direkt nach erfolgtem Organellaufschluss (durch Ultraschall bzw. Gefrier-Tau-Zyklen) nicht in der Überstandfraktion detektiert werden konnte (Ergebnisse nicht gezeigt). Wie in Abb. E.3 A zu erkennen, wird nach NaBr-Behandlung der mitochondrialen Kontrolle nur eine sehr geringe Menge AtpB im Überstand detektiert. Dies spricht für eine geringe Zugänglichkeit des  $F_1$ -Subkomplexes und die Intaktheit der mitochondrialen Hüllmembranen. In den Mitoplastenfraktionen hingegen wird eine vergleichsweise hohe Menge AtpB durch das zugegebene NaBr im Überstand gelöst, obwohl sich das detektierte Signal der zwei analysierten Sedimentfraktionen durch die Salzzugabe nicht merklich ändert (siehe Abb. E.3 B). Daraus könnte geschlossen werden, dass die zur Mitoplastenpräparation angewandte Osmolyse bereits zum kompletten Aufschluss einiger Mitochondrien, und damit potentiell zur Entstehung invertierter Membranvesikel sowie einiger Membranfragmente führen



**Abb. E.3: Immundetektion der  $F_1\beta$ -Untereinheit von Komplex V (AtpB) in (sub)mitochondrialen Fraktionen vor und nach Proteinextraktion mit 2 M NaBr.** Untersucht wurden **A** isolierte Mitochondrien, **B** osmolytisch generierte Mitoplasten, sowie Vesikelfractionen, welche mittels **C** Ultraschallbehandlung (USV) oder durch **D** wiederholte Gefrier-Tau-Zyklen (GTV) aus zuvor generierten Mitoplasten präpariert wurden. Nach außen gewandte, membranassoziierte Proteine wurden durch die Zugabe von 2 M NaBr extrahiert und so im Überstand akkumuliert (+ NaBr). Als Kontrolle dienten jeweils NaBr-unbehandelte Proben (- NaBr). Durch Zentrifugation erfolgte eine Fraktionierung aller Proben in Sediment (S) und Überstand (ÜS). Die darin enthaltenen Proteine wurden denaturiert und stöchiometrische Mengen entsprechend einem Ausgangsmaterial von 40  $\mu$ g Gesamtprotein über ein 15 %iges SDS-PA-Gel separiert und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Immundetektion von AtpB ( $\blacktriangleleft$ ) wurde über eine HRP-vermittelte ECL-Reaktion visualisiert. Referenzwerte des verwendeten Größenstandards sind links in kDa angegeben.

könnte. Das AtpB-Detektionsmuster der mittels Ultraschall generierten Vesikel (USV) ähnelt dem der Mitoplasten, da auch hier ein deutliches Signal für AtpB im Überstand nach erfolgter NaBr-Behandlung detektiert wird (siehe Abb. E.3 C). Allerdings verbleibt auch hier der Großteil an Protein in der Sedimentfraktion. Deutlich anders verhält sich AtpB in den über Gefrier-Tau-Zyklen präparierten Vesikeln (GTV). Neben einer starken Akkumulation von AtpB im Überstand infolge der Salzzugabe, wird komplementär eine deutliche Signalabnahme in der entsprechenden Sedimentfraktion sichtbar (siehe Abb. E.3 D).

Die antikörpervermittelte Detektion von AtpB deutet insgesamt darauf hin, dass sich in den Mitoplasten- und USV-Fractionen zwar invertierte Vesikel oder Membranfragmente befinden, aber dass die Gesamtmenge invertierter Vesikel in den GTV-Fractionen anscheinend deutlich höher ausfällt. Dies wird insbesondere an dem durch die NaBr-Zugabe bedingten Übergang von membrangebundenem AtpB in den Überstand sichtbar, welcher sich in einer Signalabnahme in der Sedimentfraktion und der gleichzeitigen Signalzunahme in der Überstandfraktion zeigt (siehe Abb. E.3 D).

### b) Aktivität

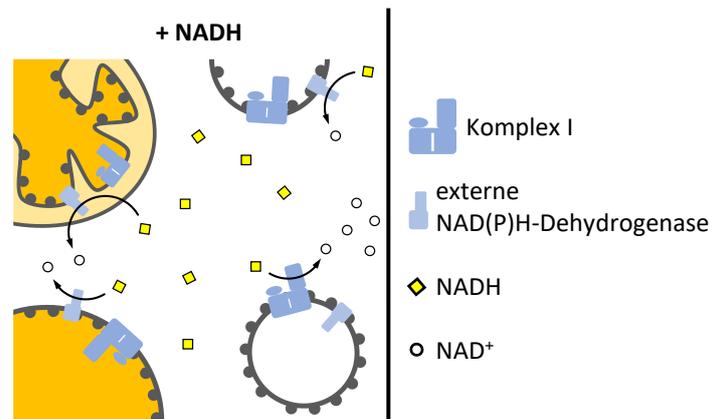
Die präparierten Vesikelfractionen wurden anschließend auf die Anwesenheit und Effizienz verschiedener Enzymaktivitäten hin untersucht und mit entsprechenden Kontrollen verglichen, um so

Informationen über den physiologischen Zustand, sowie die Membranorientierung und -intaktheit der gewonnenen Vesikel zu erhalten. Da die Vesikel schlussendlich für Proteintransportversuche von Tat-Substraten verwendet werden sollten, ist die Überprüfung der vorhandenen Enzymaktivitäten hierbei von besonderer Bedeutung. Denn der Membranaufschluss und die hierzu angewandten Methoden können tendenziell auch Proteinkomplexe und deren Funktion maßgeblich beeinträchtigen, was sich wiederum auf den zu untersuchenden mtTat-Proteintransport direkt (durch Schädigung der Translokase) oder indirekt (beispielsweise durch Beeinträchtigung des transmembranen Protonengradienten) auswirken kann. Betrachtet wurden hierfür die Aktivitäten von Proteinkomplexen der inneren Hüllmembran: Komplex I, Komplex V und die mitochondriale Prozessierungspeptidase (MPP), welche in Pflanzenmitochondrien integraler Bestandteil von Komplex III ist (Braun *et al.*, 1992, Eriksson *et al.*, 1994, Braun *et al.*, 1995).

### Komplex I-Aktivität

In der inneren Hüllmembran pflanzlicher Mitochondrien befinden sich vermutlich drei Dehydrogenasen, die zur Oxidation von NADH in der Lage sind: zwei davon zur Matrix gerichtet, darunter Komplex I, und eine weitere zum Intermembranraum gewandte externe NADH-Dehydrogenase (Douce *et al.*, 1973, Møller und Palmer, 1982, Rasmusson *et al.*, 2004). Da NADH nicht aktiv in die Matrix importiert wird und auch nicht frei durch Biomembranen diffundieren kann (Jagow und Klingenberg, 1970), hat bei Mitoplasten und nicht-invertierten Vesikeln nur die externe NADH-Dehydrogenase der inneren Hüllmembran Zugang zu dem äußerlich zugeführten NADH. Intakte Mitochondrien verfügen darüber hinaus über eine weitere NADH-Dehydrogenase in der äußeren Hüllmembran (Douce *et al.*, 1973). Im Gegensatz dazu ist in Anwesenheit invertierter Vesikel eine Oxidation des von außen zugeführten NADH sowohl durch Komplex I als auch durch die zweite zur Matrix gewandte NADH-Dehydrogenase möglich (Møller und Palmer, 1982). Die Oxidation von NADH kann photometrisch durch eine Abnahme der Absorption bei 340 nm gemessen werden. Aufgrund der Beteiligung von Komplex I sollten invertierte Vesikel im Vergleich zu intakten Mitochondrien und anderen submitochondrialen Fraktionen eine gesteigerte Oxidationsrate des extern zugegebenen NADH aufweisen (Schema siehe Abb. E.4).

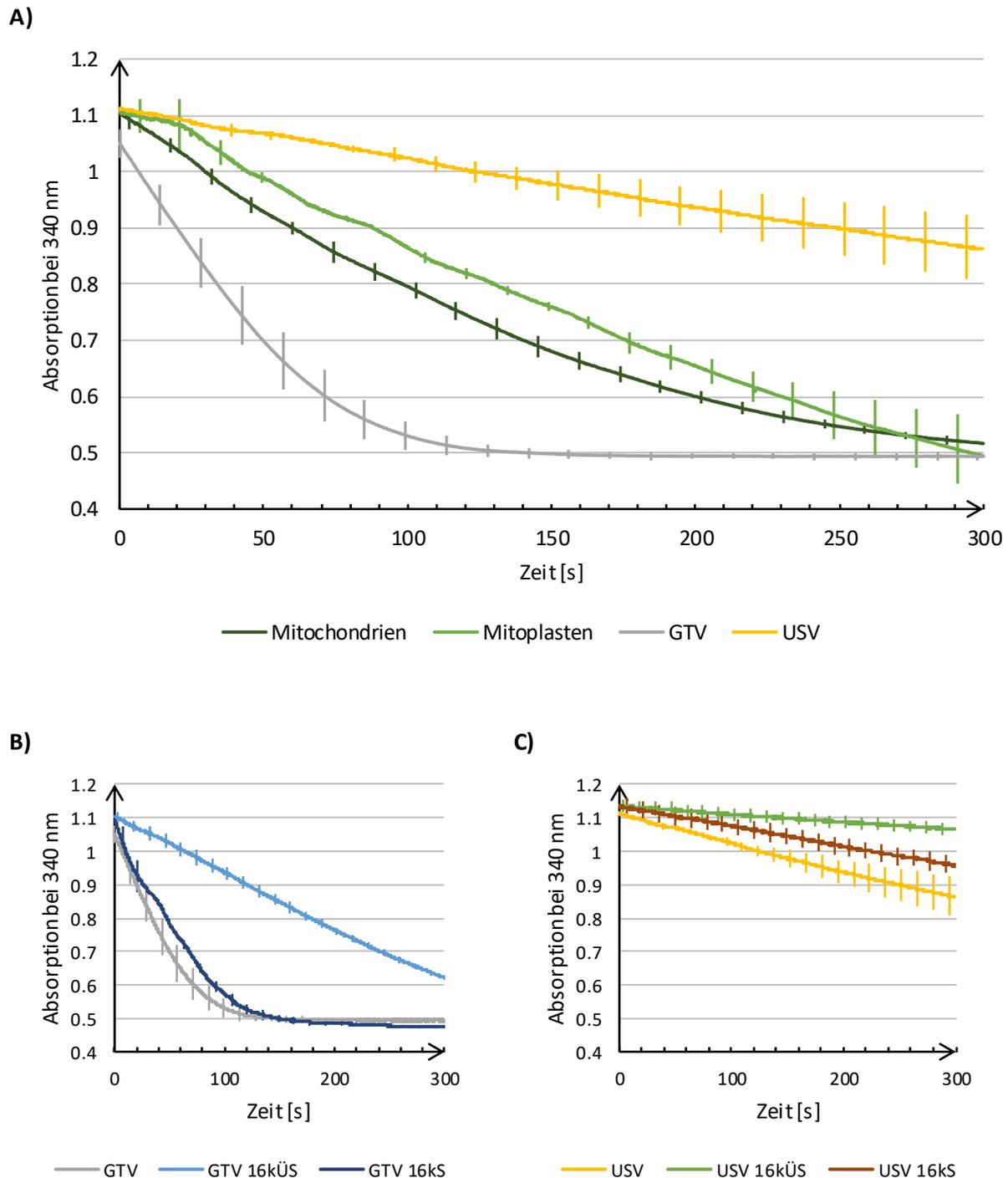
Die Kontrollmessungen mit isolierten Mitochondrien und Mitoplasten zeigen eine moderat ablaufende NADH-Oxidation, durch die jeweils nach etwa 5 Minuten das zugesetzte NADH nahezu vollständig oxidiert vorliegt (siehe Abb. E.5 A). Wie bereits erläutert, sollte es isolierten Mitochondrien und Mitoplasten nicht möglich sein, das zugesetzte NADH durch Komplex I umzusetzen. Vielmehr sollten hier die externen NADH-Dehydrogenasen für die gemessene NADH-Oxidation verantwortlich sein. Die



**Abb. E.4: Schema zur Untersuchung der Komplex I-Aktivität (sub)mitochondrialer Fraktionen.**

Bei Zugabe von NADH zu verschiedenen (sub)mitochondrialen Fraktionen kann die Oxidation von NADH zu NAD<sup>+</sup> photometrisch gemessen werden. Intakte Pflanzenmitochondrien sowie Mitoplasten und nicht-invertierte Vesikel können von außen zugeführtes NADH nur über die dem Intermembranraum zugewandten externen NAD(P)H-Dehydrogenasen oxidieren, da NADH selbst nicht in die Matrix gelangt (weitere Informationen siehe Text). Die Membranausrichtung invertierter Vesikel ermöglicht eine Oxidation des zugesetzten NADH durch Komplex I, was die gemessene NADH-Oxidationsrate deutlich erhöht.

im Vergleich zu den Mitoplastenfraktionen leicht erhöhte Oxidationsrate bei einer Messung mit intakten Mitochondrien könnte eventuell durch die zusätzliche Aktivität der in der äußeren Hüllmembran lokalisierten NADH-Dehydrogenase hervorgerufen werden. In den USV-Fraktionen lassen sich nur schwache NADH-Oxidationsraten messen, durch welche extrapoliert erst nach etwa 20 Minuten mit einer kompletten NADH-Oxidation gerechnet werden kann. Dies deutet mit großer Wahrscheinlichkeit auf einen inhibitorischen Effekt der Ultraschallbehandlung auf die untersuchten NADH-Dehydrogenasen hin. Anders verhält es sich mit den GTV-Fraktionen, in welchen bereits nach 2,5 Minuten das zugegebene NADH oxidiert vorliegt. Die im Vergleich zu den Mitochondrien deutlich gesteigerte Oxidationsrate lässt auf die Anwesenheit enzymatisch aktiver und invertierter Vesikel in den GTV-Fraktionen schließen. Werden die verschiedenen Vesikelfraktionen durch eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 16.000 g nochmal in je zwei Subfraktionen geteilt (sedimentierte und im Überstand verbliebene Vesikel), besitzen die jeweils sedimentierten Vesikel nahezu die gleiche enzymatische Aktivität wie die Gesamtfaktionen (siehe Abb. E.5 B). Die Überstandfraktionen hingegen zeigen nur noch einen Bruchteil der zuvor gemessenen Oxidationsraten. Dies deutet vor allem in den GTV-Fraktionen auf die Präsenz vergleichsweise großer, invertierter Vesikel hin, die sich entweder in ihrer Membranorientierung, Enzymaktivität oder Gesamtmenge von den im Überstand verbliebenen, vergleichsweise kleinen Vesikeln und Fragmenten unterscheiden. Ein ähnlicher Einfluss der Zentrifugation zeigt sich auch an den USV, deren ohnehin schon geringe Enzymaktivität ebenfalls hauptsächlich in der Sediment- und weniger in der Überstandfraktion messbar ist (siehe Abb. E.5 C).



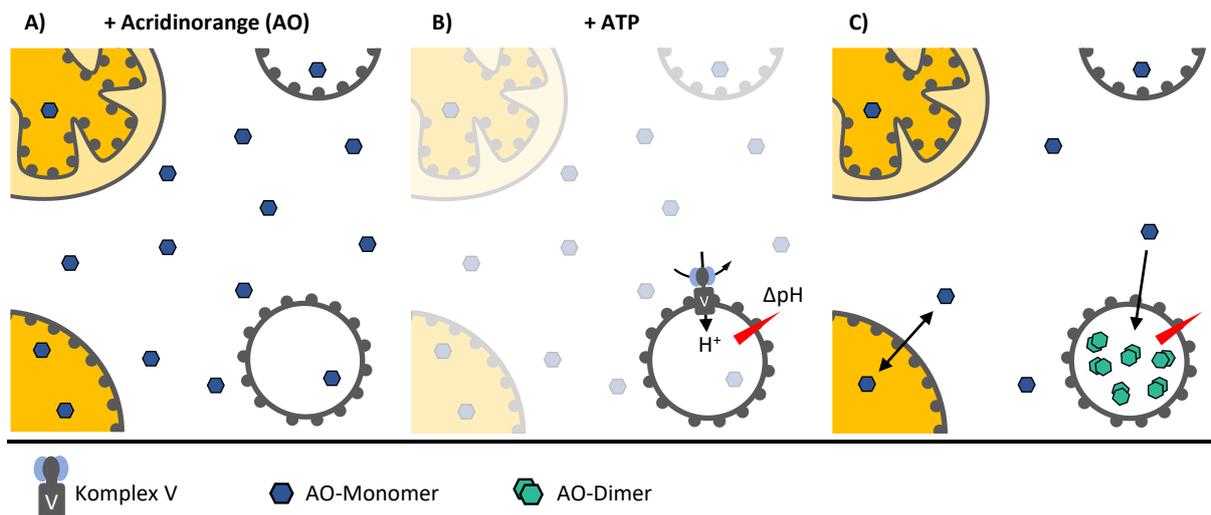
**Abb. E.5: Photometrische Messung der NADH-Oxidation in (sub)mitochondrialen Fraktionen.**

Zur Untersuchung der NADH:Ferricyanid-Oxidoreduktaseaktivität in verschiedenen (sub)mitochondrialen Fraktionen wurde die Absorption von extern zugegebenem NADH ( $Abs_{S_{max}}$  bei 340 nm) im zeitlichen Verlauf gemessen. Getestet wurden **A** isolierte Mitochondrien, osmolytisch generierte Mitoplasten, sowie Vesikelfraktionen, welche mittels Ultraschallbehandlung (USV) oder durch wiederholte Gefrier-Tau-Zyklen (GTV) aus zuvor generierten Mitoplasten präpariert wurden. Nach differentieller Zentrifugation der **B** GTV-Fraktionen und **C** USV-Fraktionen bei 16kg wurden aus Sediment (16kS) und Überstand (16kÜS) entsprechende Subfraktionen erstellt und diese ebenfalls untersucht. Den Proben wurde 4  $\mu$ M Antimycin A (Komplex III-Inhibitor) und 240  $\mu$ M Kaliumcyanid (Komplex IV-Inhibitor) zugegeben und die Messung mit der Zugabe von 160 mM NADH und 1 mM Ferricyanid gestartet (n = 3, inkl. Standardabweichung).

Zusammenfassend lässt die Messung der NADH-Oxidationsrate in verschiedenen Vesikel- und Kontrollfraktionen darauf schließen, dass sich mittels Gefrier-Tau-Zyklen gut messbare Mengen invertierter, enzymatisch aktiver und vergleichsweise großer Vesikel präparieren lassen, während Ultraschall entweder kaum invertierte Vesikel hervorzubringen scheint, oder die entstehenden Vesikel ihre Komplex I-Aktivität größtenteils verloren haben.

### **Komplex V-Aktivität**

Um die Komplex V-Aktivität präparierter Vesikel zu überprüfen, ist der Einsatz pH-sensitiver Reporter-moleküle wie Acridin Orange (AO) oder Oxonol VI ein besonders geeignetes Verfahren (Macri *et al.*, 1982, Palmgren *et al.*, 1990, Petit *et al.*, 1991). Der Nachweis eines transmembranen Protonengradienten, hervorgerufen durch die Komplex V-Aktivität invertierter Vesikel, ermöglicht nicht nur die Überprüfung der Membranorientierung sowie der enzymatischen Aktivität, sondern liefert darüber hinaus wichtige Informationen über die Intaktheit und Dichtigkeit der Vesikelmembranen, da ein wiederhergestellter und aufrechterhaltener Protonengradient für spätere Proteintransportversuche von zentraler Bedeutung ist. Komplex V nutzt unter physiologischen Bedingungen den transmembranen Protonengradienten der inneren Hüllmembran, um ATP aus ADP und Phosphat ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) zu generieren. In Abwesenheit eines solchen Gradienten und bei hohen ATP-Konzentrationen wird die Reaktion umgekehrt, was zur Hydrolyse von ATP, einem auf diese Weise energetisierten Transport von Protonen und somit schlussendlich zum Aufbau eines Protonengradienten führt. Die Zugabe von ATP zu komplett geschlossenen invertierten Vesikeln inklusive aktiver ATP-Synthasen sollte demnach zu einer Ansäuerung des Vesikelinneren führen, was mithilfe des Farbstoffs Acridinorange (AO) überprüft werden kann (Schema siehe Abb. E.6). In seiner deprotonierten Form (bei neutralem pH-Wert) passiert dieser basische Farbstoff Biomembranen und besitzt ein Absorptionsmaximum bei 492 nm. Beim Übergang in eine saure Umgebung wird AO protoniert und beginnt bei steigenden Konzentrationen zu aggregieren, was wiederum zu einer Verschiebung seines Absorptionsmaximums führt (Falcone *et al.*, 2002). Die Zugabe von ATP und AO zu Vesikeln bewirkt die Ansäuerung der invertierten Vesikel durch die Aktivität von Komplex V, die Aggregation von AO innerhalb der invertierten Vesikel und damit die photometrisch messbare Abnahme der AO-Monomerkonzentration im experimentellen Ansatz. Die Zugabe des Protonophors Gramicidin kehrt diesen Prozess um, da der transmembrane Protonengradient aufgehoben wird (Wakiuchi *et al.*, 1988).

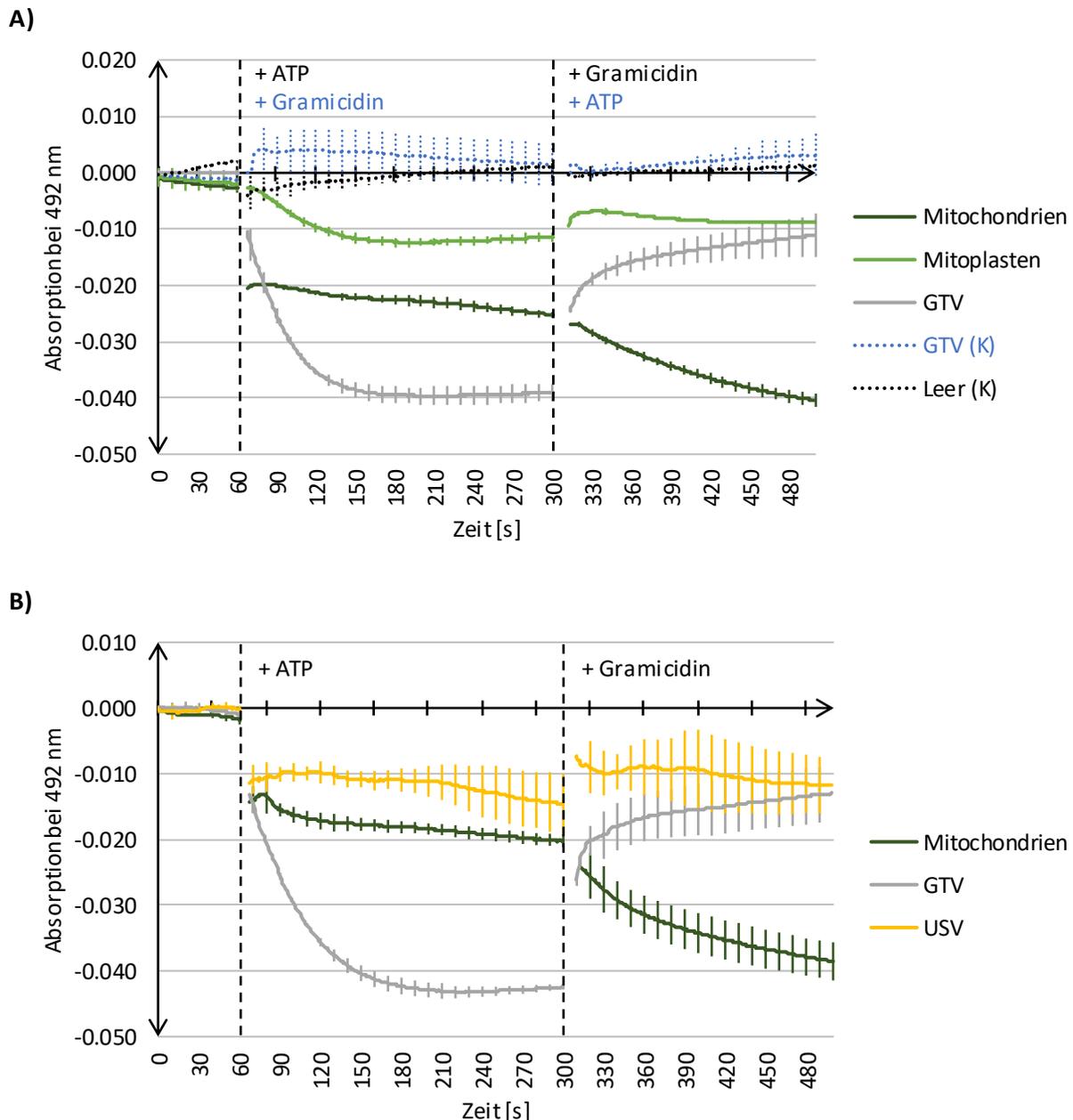


**Abb. E.6: Schema zur Untersuchung der Komplex V-Aktivität (sub)mitochondrialer Fraktionen.**

**A** Bei der Zugabe von Acridinorange (AO) zu verschiedenen (sub)mitochondrialen Fraktionen kann der monomere Farbstoff (basisch in neutralem pH-Wert) Biomembranen passieren und sich gleichmäßig in der Probe verteilen. **B** Die Zugabe von ATP zu den Proben aktiviert die Protonenpumpen-Aktivität von Komplex V invertierter Vesikel, was zu einer Ansäuerung ihres Inneren führt. **C** Das AO-Monomer neigt dazu, in positiv geladene Kompartimente (wie auch die nun angesäuerten invertierten Vesikel) zu migrieren, wo es protoniert und dadurch am Herausdiffundieren gehindert wird. Die allmählich ansteigende Konzentration des protonierten AO-Monomers in den invertierten Vesikeln führt zu einer Dimerisierung des Farbstoffs, was wiederum zu einer photometrisch messbaren Verschiebung des AO-Absorptionsmaximums führt.

Die Absorptionsmessung der AO-Monomere im zeitlichen Verlauf und bei Zugabe von ATP bzw. Gramicidin ergibt für die Kontrollen mit Mitochondrien- und Mitoplastenfraktionen deutlich voneinander abweichende Kurvenverläufe (siehe Abb. E.7A). Die gemessene Menge an AO-Monomeren nimmt in der Anwesenheit isolierter Mitochondrien linear und vergleichsweise langsam ab, wobei die Zugabe von ATP nach 60 Sekunden zu einem deutlichen Einbruch in der gemessenen Absorption führt. Bei einer Zugabe von Gramicidin nach insgesamt 300 Sekunden sinkt die Absorption weiterhin linear ab, wenn auch mit etwas erhöhter Geschwindigkeit. Der Kurvenverlauf und der ausbleibende Absorptionsanstieg nach Gramicidinzugabe sprechen im Falle der Mitochondrien allerdings eher gegen die Messung einer enzymatischen Reaktion. Da entsprechende Leerkontrollen ohne Mitochondrien oder deren Subfraktionen keinerlei Änderungen in der Absorption infolge von ATP- oder Gramicidinzugabe zeigen, kann ein direkter Einfluss dieser Additive auf die AO-Monomere ausgeschlossen werden. Eine mögliche Erklärung der, nach Gramicidin-Zugabe, verstärkt absinkenden Absorption beruht auf der Eigenschaft von AO-Monomeren, an DNA-Moleküle zu binden und auch in diesem Zustand ein verändertes Absorptionsspektrum zu besitzen (Sayed *et al.*, 2016). Das zugesetzte Gramicidin erhöht womöglich die Erreichbarkeit der mitochondrialen DNA für die AO-Monomere und könnte so zu einer verstärkten Abnahme der Monomer-Absorption führen. Die Messungen an USV zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf, allerdings führt hier die Zugabe von Gramicidin nicht zu einem verstärkten Absinken der gemessenen Absorption,

sondern zu einem sprunghaften Anstieg, was vermutlich ebenfalls nicht durch eine enzymatische Reaktion bzw. einen pH-abhängigen Prozess verursacht wird (siehe Abb. E.7B). In den

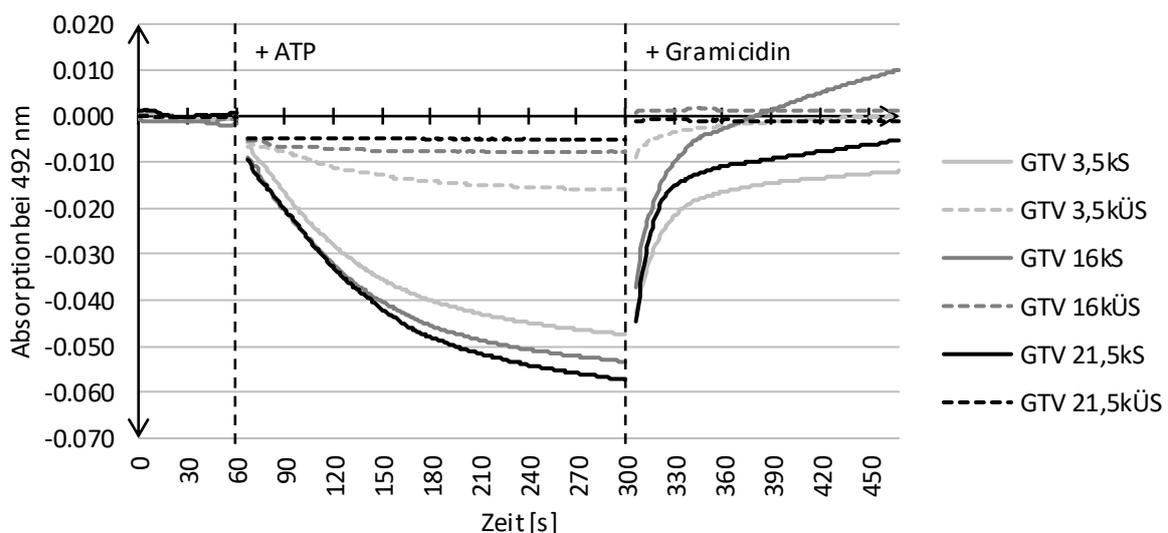


**Abb. E.7: Photometrische Messung der Komplex V-Aktivität in (sub)mitochondrialen Fraktionen.**

Zur Untersuchung der Komplex V-Aktivität in verschiedenen (sub)mitochondrialen Fraktionen wurde der pH-sensitive Farbstoff Acridinorange (AO) eingesetzt, und die zeitliche Absorptionsänderung der im Ansatz enthaltenen AO-Monomere ( $Ab_{S_{max}}$  bei 492 nm) photometrisch gemessen. Nach 60 s wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 mM ATP gestartet und nach insgesamt 300 s durch die Zugabe von 1  $\mu$ M Gramicidin abgestoppt (detaillierte Beschreibung und weitere Informationen im Text). Untersucht wurden **A** isolierte Mitochondrien, osmolytisch generierte Mitoplasten, sowie die aus Mitoplasten mittels Gefrier-Tau-Zyklen präparierten Vesikelfraktionen (GTV). Als Kontrollen dienen einerseits Leeransätze (Leer (K)) ohne (sub)mitochondriale Fraktionen, und andererseits GTV, welchen zuerst Gramicidin und erst im Anschluss ATP zugegeben wurde (GTV (K)) ( $n = 3$ , inkl. Standardabweichung). In **B** sind die Messungen zu isolierten Mitochondrien und Vesikelfraktionen, welche aus zuvor generierten Mitoplasten mittels Ultraschallbehandlung (USV) oder durch wiederholte Gefrier-Tau-Zyklen (GTV) präpariert wurden, dargestellt ( $n = 3$ , inkl. Standardabweichung).

Mitoplastenfraktionen hingegen lässt sich in geringem Maße eine Komplex V-Aktivität messen, da die ATP-Zugabe zu einem exponentiellen, wenn auch schwachen Absinken der gemessenen Absorption des AO-Monomers führt (siehe Abb. E.7). Durch die Gramacidinzugabe kommt es zunächst zu einem leichten Anstieg der Absorption, welche nach kurzer Zeit jedoch wieder abflacht. Ein ähnliches Verhalten kann anhand der GTV-Fractionen gemessen werden, wobei die Absorption des AO-Monomers um ein Vielfaches stärker absinkt, und auch der umkehrende Effekt durch Gramacidin wesentlich stärker ausfällt. Der Einfluss von Gramacidin belegt, dass es sich bei der gemessenen Absorptionsänderung infolge der ATP-Zugabe um einen pH-abhängigen Prozess handelt. Überprüft wurde dies, indem die Vesikel zuerst mit Gramacidin und erst im Anschluss mit ATP versetzt wurden. Das Gramacidin verhindert nun den Aufbau eines Protonengradienten, weshalb auch die Konzentration des AO-Monomers im Ansatz unverändert bleibt.

Ähnlich wie zuvor im Zusammenhang der Komplex I-Aktivität beschrieben, wurden durch differentielle Zentrifugation der GTV mehrere Subfraktionen erstellt. Auch hier ist die gemessene Aktivität fast ausschließlich in den sedimentierten Vesikeln zu beobachten, wobei steigende Zentrifugationsgeschwindigkeiten zu einer erhöhten Aktivität in den Sedimentfraktionen führen, und einer dementsprechend abnehmenden Aktivität in den dazugehörigen Überstandfraktionen (siehe Abb. E.8).



**Abb. E.8: Photometrische Messung der Komplex V-Aktivität in mitochondrialen Vesikel-Subfraktionen.**

Zur Untersuchung der Komplex V-Aktivität in verschiedenen Subfraktionen der mittels Gefrier-Tau-Zyklen aus Mitochondrien präparierten Vesikel (GTV) wurde der pH-sensitive Farbstoff Acridinorange (AO) eingesetzt, und die zeitliche Absorptionsänderung der im Ansatz enthaltenen AO-Monomere ( $Abs_{max}$  bei 492 nm) photometrisch gemessen. Nach 60 s wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 mM ATP gestartet und nach insgesamt 300 s durch die Zugabe von 1  $\mu$ M Gramacidin abgestoppt (detaillierte Beschreibung und weitere Informationen im Text). Untersucht wurden GTV-Subfraktionen, welche nach differentieller Zentrifugation bei 3,5k g, 16k g oder 21,5k g aus dem jeweiligen Sediment (S) und Überstand (ÜS) erstellt wurden. Grafisch dargestellt sind die Ergebnisse einer repräsentativen Messung.

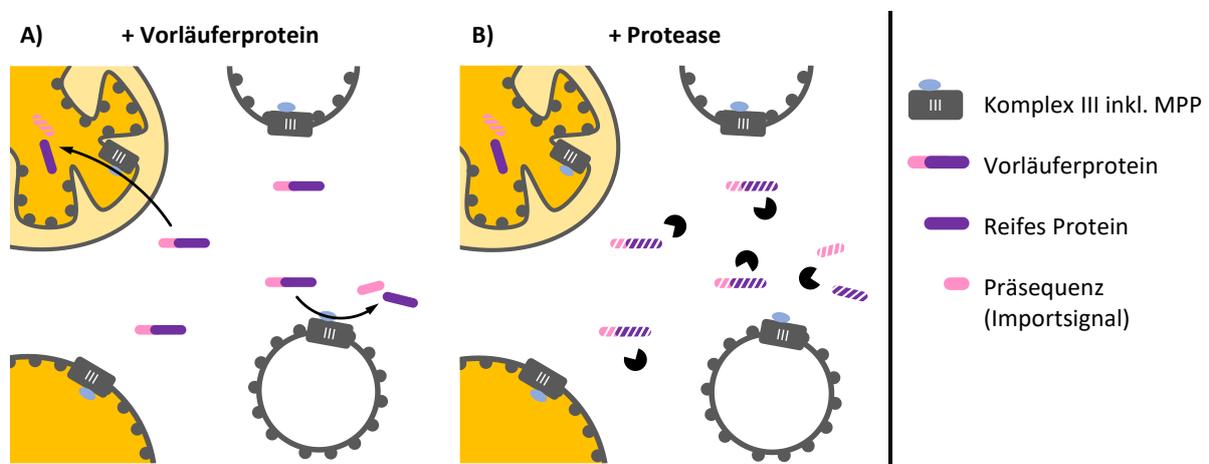
Die Messungen der Komplex V-Aktivität, bzw. der daraus resultierenden Absorptionsabnahme des AO-Monomers, belegen die Anwesenheit invertierter und aktiver Vesikel in den GTV-Fractionen. Die Fähigkeit, einen stabilen Protonengradienten entlang der Vesikelmembran zu erzeugen, spricht zudem für deren Intaktheit. Eine geringe Menge invertierter und aktiver Vesikel scheint ebenfalls in den Mitoplastenfraktionen vorhanden zu sein, wobei die USV erneut kaum Enzymaktivität aufweisen.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurde ausschließlich mit GTV gearbeitet, da alle bisher gezeigten Versuche zur Charakterisierung von USV und GTV deutlich belegen, dass sich wiederholte Gefrier-Tau-Zyklen zur Präparation intakter, aktiver und invertierter submitochondrialer Vesikel eignen (siehe Abb. E.3 D, E.5, E.7). Außerdem wurde bestätigt, dass GTV unter ATP-Zugabe einen stabilen, transmembranen Protonengradienten etablieren und aufrechterhalten können, was in Analogie zum thylakoidären Tat-System eine wichtige Voraussetzung für dessen Funktion sein könnte (Klöggen *et al.*, 1992, Alder und Theg, 2003). Die Ultraschallbehandlung scheint hingegen in den durchgeführten Versuchen entweder eine deutlich geringere Zahl vergleichbarer Vesikel hervorzubringen (siehe Abb. E.3 C), oder führt zu einer starken Inhibierung der getesteten Enzymkomplexe (siehe Abb. E.5, E.7 B). Der inhibitorische Effekt von Ultraschall auf verschiedene Enzymaktivitäten konnte bereits von Palmgren *et al.* (1990) bei der Präparation pflanzlicher Plasmamembranvesikel festgestellt werden. Mit großer Wahrscheinlichkeit hat die Ultraschallbehandlung nicht nur zum Aufschluss der Membran, sondern auch zur Schädigung und Dissoziation von Proteinkomplexen geführt. Besonders die durch Kavitationskräfte entstehende Hitzeeinwirkung könnte sich denaturierend auf die Membranproteine ausgewirkt und so deren Aktivität beeinträchtigt haben.

### **MPP-Aktivität**

Ein weiterer Enzymkomplex, der zur Untersuchung der Membranorientierung und Aktivität von präparierten Vesikeln genutzt wurde, ist die mitochondriale Prozessierungspeptidase (MPP). Die MPP entfernt Präsequenzen von kernkodierten, mitochondrialen Vorläuferproteinen nach deren Import in die Matrix und ist in Pflanzenmitochondrien Teil des membranintegralen Komplex III, welcher in intakten Mitochondrien zur Matrixseite und nach erfolgter Membraninversion dementsprechend nach außen weist (Braun *et al.*, 1992, Eriksson *et al.*, 1994, Braun *et al.*, 1995). Dies führt dazu, dass invertierte Vesikel in der Lage sind, Vorläuferproteine im umgebenden Medium zu prozessieren, wo das resultierende reife Protein sowie die nicht gespaltenen Vorläuferproteine durch eine von außen zugeführte Protease (wie Thermolysin oder Proteinase K) abgebaut werden können. Von

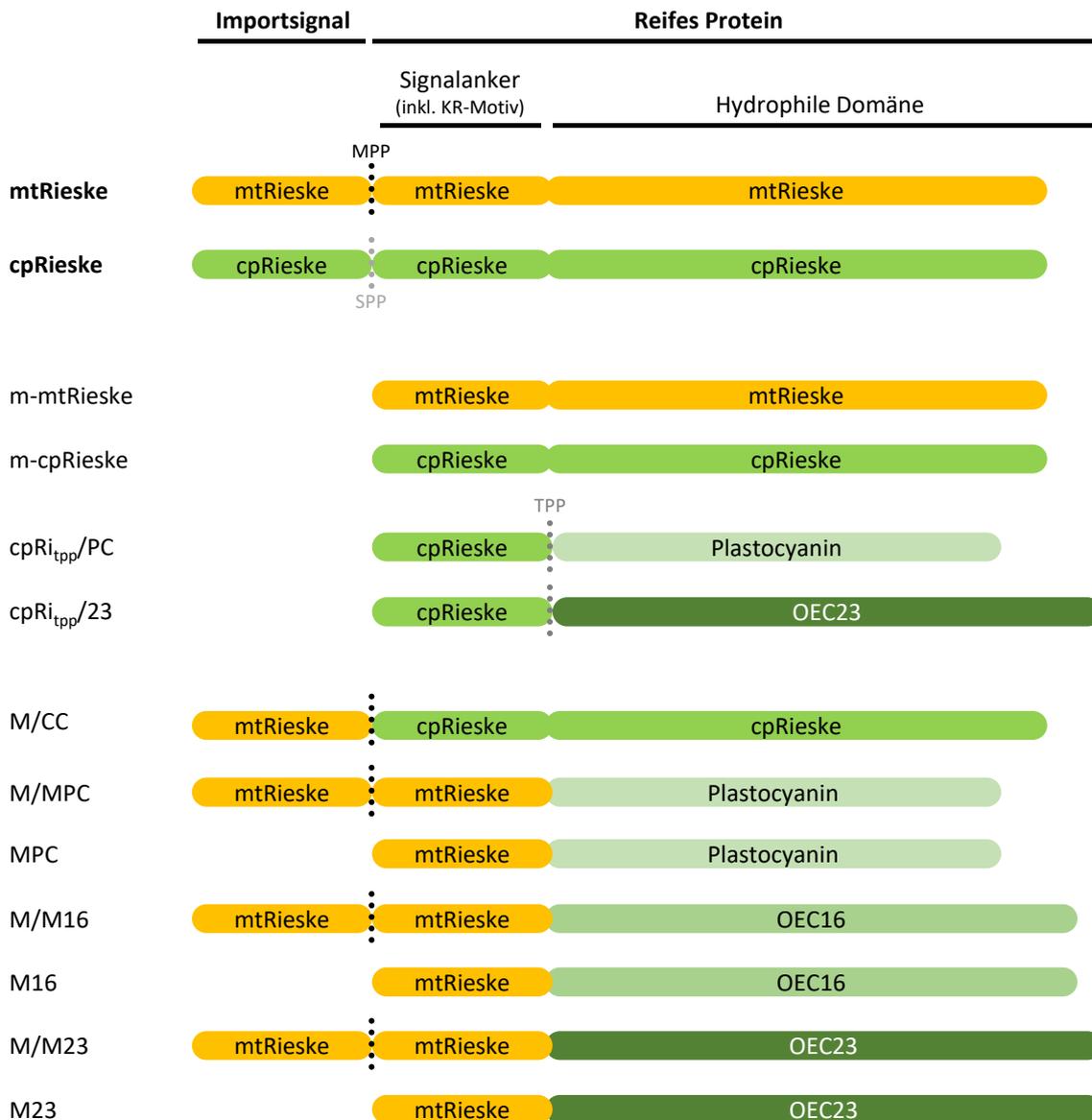
Mitochondrien importierte Vorläuferproteine und die in der Matrix entstehenden Prozessierungsprodukte sind für eine zugesetzte Protease allerdings nicht zugänglich und bleiben daher unversehrt (Schema siehe Abb. E.9).



**Abb. E.9: Schema zur Untersuchung der MPP-Aktivität (sub)mitochondrialer Fraktionen.**

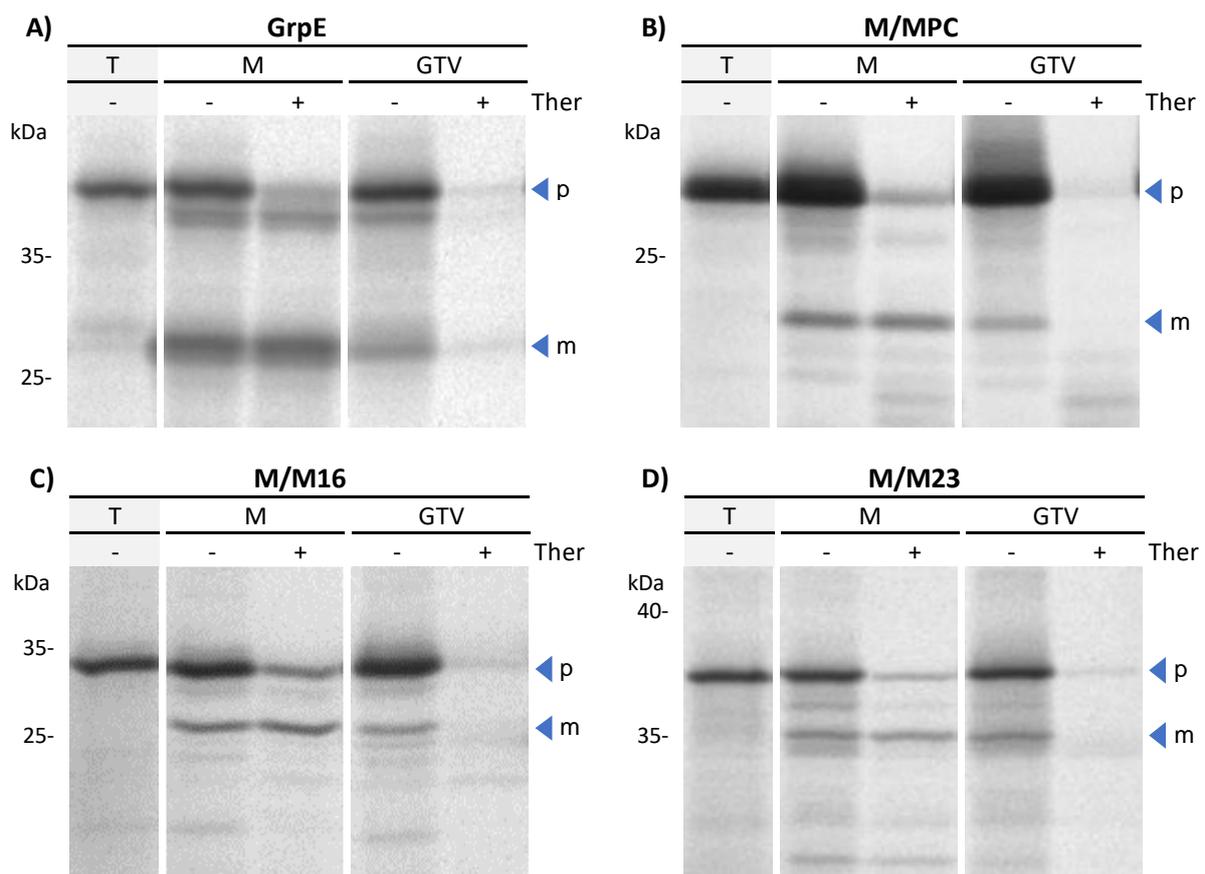
**A** Die Zugabe *in vitro*-synthetisierter und radioaktiv markierter Vorläuferproteine zu verschiedenen (sub)mitochondrialen Fraktionen kann zur Prozessierung der Proteine, also der Abspaltung des N-terminalen Importsignals, führen. Entweder geschieht dies nach dem Import der Substrate in die Matrix intakter Mitochondrien oder an der äußeren Membranoberfläche invertierter Vesikel. **B** Ob Mitochondrien oder invertierte Vesikel eine detektierte Prozessierung verursacht haben, kann durch Zugabe einer Protease (z. B. Thermolysin oder Proteinase K) untersucht werden, welche Proteine im Umgebungsmedium, nicht aber in der Matrix abbauen kann.

Da vorangegangene Untersuchungen für USV bereits gezeigt haben, dass diese für Untersuchungen der mtTat-Translokase vermutlich ungeeignet sind, wurde die MPP-Aktivität ausschließlich an GTV-Fractionen und entsprechenden Kontrollen getestet. Hier gezeigt sind die Ergebnisse einer gemeinsamen Inkubation von GTV mit dem Protein GrpE, sowie mit mehreren artifiziellen Konstrukten, welche jeweils aus dem N-terminalen Teil des mitochondrialen Rieske-Proteins (Importsignal und Signalanker) und den entsprechenden reifen Teilen verschiedener chloroplastidärer Passagierproteine bestehen, darunter Plastocyanin, OEC16 und OEC23 (Konstrukte: M/MPC, M/M16 und M/M23, siehe Schema Abb. E.10). Als Kontrolle wurden die genannten Substrate ebenfalls mit Mitochondrien inkubiert, um so die korrekte Prozessierung und das apparente Molekulargewicht der Prozessierungsprodukte einschätzen zu können. Die verwendeten Proteine wurden während der *in vitro*-Synthese mittels  $^{35}\text{S}$ -Methionin radioaktiv markiert, um eine Visualisierung nach erfolgter Gelelektrophorese zu gewährleisten.



**Abb. E.10: Schematischer Aufbau der Rieske-Fe/S-Proteine (mtRieske bzw. cpRieske) und Darstellung rekombinanter Konstrukte.** Die Rieske-Fe/S-Proteine aus Mitochondrien und Chloroplasten sind elektronenübertragende Untereinheiten des mitochondrialen Cytochrom-*bc*<sub>1</sub>-Komplexes (oder Komplex III) bzw. des plastidären Cytochrom-*b<sub>6</sub>f*-Komplexes und besitzen grundsätzlich einen sehr ähnlichen Aufbau. Ein N-terminales Importsignal der Vorläuferproteine vermittelt den Transport in das jeweilige Zielorganell und wird nach erfolgtem Import abgespalten. In der Matrix erfolgt diese Prozessierung durch die mitochondriale Prozessierungspeptidase (MPP) an der im Importsignal lokalisierten MPP-Schnittstelle (schwarz gepunktet). Analog kommt es im Stroma zu einer Prozessierung durch die stromale Prozessierungspeptidase (SPP, Schnittstelle hellgrau gepunktet). Auf das Importsignal folgt das reife Protein, welches in eine Signalankerdomäne und die C-terminal gelegene hydrophile Domäne gegliedert werden kann. Letztere bindet nach Import und Prozessierung ein [2Fe-2S]-Cluster und wird anschließend gefaltet. Zum einen vermittelt die bifunktionelle Signalankerdomäne als Transportsignal den Weitertransport mittels cpTat- bzw. mtTat-Translokase (der Erkennung dient u. a. ein Lysin-Arginin-Motiv (KR)), und zum anderen fungiert diese Domäne als Transmembrananker. Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben dem mtRieske-Vorläufer auch Varianten genutzt, die dem bereits prozessierten mtRieske (m-mtRieske) und cpRieske (m-cpRieske) entsprechen, sowie einige bereits in der AG Klösgen vorhandene rekombinante Konstrukte: cpRi<sub>tpp</sub>/PC und cpRi<sub>tpp</sub>/23 inklusive eingefügter Schnittstelle für die thylakoidäre Prozessierungspeptidase (TPP, dunkelgrau gepunktet) (Dissertation Molik, 2005), sowie M/CC (Dissertation Kungel, 2020). Zudem wurden im Rahmen dieser Arbeit ausgehend von mtRieske und m-mtRieske durch einen Austausch der hydrophilen Domäne mit reifen Teilen verschiedener Passagierproteine (Plastocyanin, OEC16, OEC23) rekombinante Konstrukte erstellt (inklusive Importsignal: M/MPC, M/M16, M/M23 bzw. ohne Importsignal: MPC, M16, M23; siehe Kap. M.2.2.1.c).

Alle getesteten Substrate binden an die Membran isolierter Mitochondrien und werden mithilfe der Importmaschinerie in die Matrix transportiert (siehe Abb. E.11). Dort erfolgt die Prozessierung zu einem deutlich kleineren Prozessierungsprodukt bzw. reifen Protein. Nach Zugabe einer Protease nimmt die Signalintensität der von außen an die Membran gebundenen Vorläuferproteine deutlich ab, während das Signal der in der Matrix lokalisierten Prozessierungsprodukte unverändert bleibt. Auch bei einer Inkubation der Substrate mit GTV binden diese an die Vesikelmembranen und es entstehen die gleichen Prozessierungsprodukte, welche auch in den mitochondrialen Importkontrollen sichtbar



**Abb. E.11: Überprüfung der MPP-Aktivität submitochondrialer Vesikel durch Inkubation mit radioaktiv markierten Vorläuferproteinen.** Um die Aktivität der mitochondrialen Prozessierungspeptidase (MPP) in den zuvor durch wiederholte Gefrier-Tau-Zyklen aus isolierten Mitochondrien präparierten Vesikelfractionen (GTV) zu überprüfen, wurden diese zusammen mit mitochondrialen und radioaktiv markierten Vorläuferproteinen inkubiert (Durchführung erfolgte analog zum Proteintransport s. Kap. M.2.2.2.2.b Protease-Behandlung). Getestet wurden **A** GrpE, **B** M/MPC, **C** M/M16 und **D** M/M23 (Beschreibung der Konstrukte siehe Abb. E.10). Als Prozessierungskontrolle wurden die jeweiligen Substrate auch mit isolierten Mitochondrien (M) inkubiert. Zur Kontrolle der eingesetzten Substrate wurden die entsprechenden *in vitro*-Translationsprodukte (T) auch ohne Zugabe von Mitochondrien oder GTV überprüft. Alle Ansätze der GTV und Mitochondrien wurden halbiert, wobei jeweils eine Probe unbehandelt blieb (- Ther) und der anderen 0,02 % Thermolysin zugegeben wurde (+ Ther), um den Verbleib entstandener Prozessierungsprodukte bestimmen zu können. Die in den Proben enthaltenen Proteine wurden denaturiert und in einem 10-17,5 %igen SDS-PA-Gradientengel separiert. Das anschließend getrocknete Gel diente der autoradiographischen Detektion der radioaktiv markierten Proteine, darunter die synthetisierten Vorläuferproteine (↓ p) und deren mitochondrialen Prozessierungsprodukte (↓ m). Die Referenzwerte des verwendeten Größenstandards sind jeweils links in kDa angegeben. Weiße Lücken in den Abbildungen verdeutlichen, dass dort verschiedene Bereiche des gleichen Gelbildes zusammengefügt wurden.

sind. Der bedeutende Unterschied zu einer Inkubation der Substrate mit Mitochondrien besteht darin, dass nicht nur die membranassoziierten Vorläuferproteine, sondern auch die entstandenen Prozessierungsprodukte durch die Protease abgebaut werden.

Die erhaltenen Ergebnisse deuten insgesamt auf eine importunabhängige Prozessierung in den Vesikelfractionen hin, was wiederum für die Anwesenheit invertierter und enzymatisch aktiver Vesikel spricht. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen der zuvor beschriebenen Versuche zur Charakterisierung von GTV-Fractionen und unterstützt erneut die Annahme, dass sich Gefrier-Tau-Zyklen zur Präparation invertierter und intakter submitochondrialer Vesikel eignen. Obwohl die Bildung von Eiskristallen und die Dekristallisierung während des Tauprozesses verschiedene Proteine und Proteinkomplexe in ihrer Funktion beeinträchtigen kann (Cao *et al.*, 2003), konnte für alle getesteten Enzyme eine deutliche Aktivität festgestellt werden.

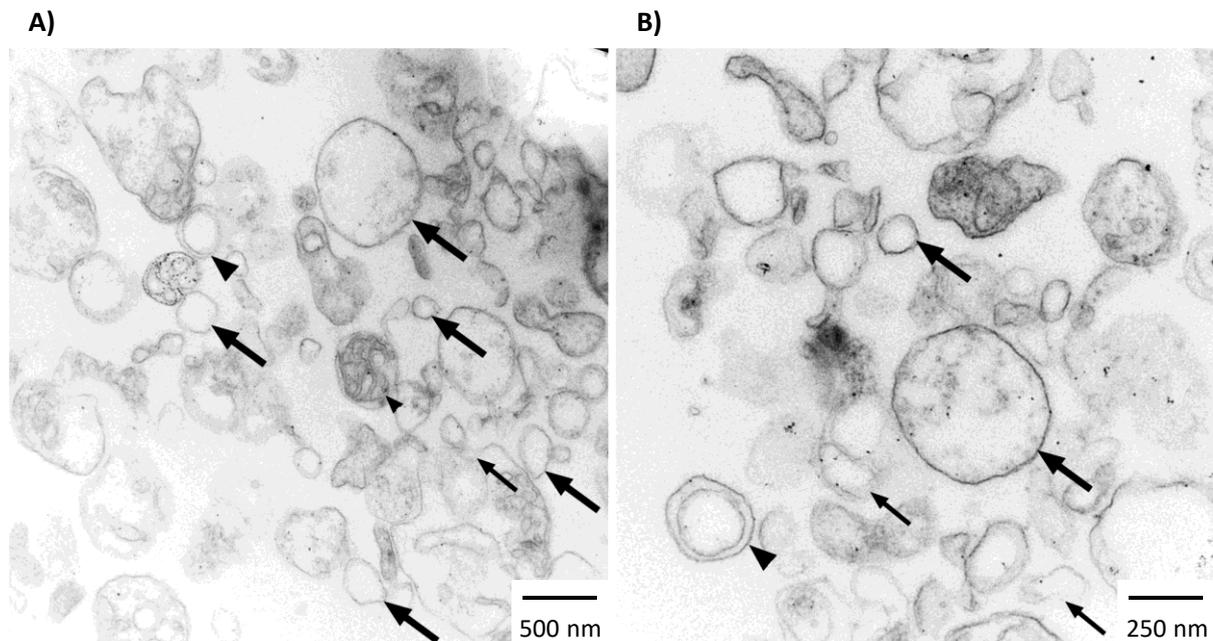
### c) Morphologie (Elektronenmikroskopie)

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ist eine geeignete Methode zur Bestimmung der Morphologie, Qualität und Reinheit der präparierten Vesikelfractionen. In Zusammenarbeit mit Dr. Gerd Hause wurden frisch angefertigte Vesikelfractionen elektronenmikroskopisch untersucht und entsprechende Aufnahmen gemacht. Zur Erhaltung der Ultrastruktur wurden die Proben mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid fixiert, wobei letzteres bereits zu einer Vorfärbung der Membranen führt. Nach der Fixierung wurden die Vesikel mit 4 % Agar immobilisiert, um die Handhabung des Materials bei den folgenden Präparationsschritten zu erleichtern. Danach wurden die kleinen Agar-Blöcke, welche die Vesikel enthielten, mit Ethanol dehydriert und mit einem Epoxidharz infiltriert. Schließlich wurde das Material polymerisiert, und die Proben mittels Ultradünnschnitt aufbereitet. Anschließend konnten die Schnitte auf spezielle TEM-Grids übertragen, mit Schwermetallen nachgefärbt und mikroskopisch analysiert werden.

Bei Betrachtung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen präparierter GTV sind eine Vielzahl von Strukturen erkennbar (siehe Abb. E.12). Darunter befinden sich hauptsächlich Vesikel mit nur einer Hüllmembran und einem Durchmesser von 50 bis 500 nm. Darüber hinaus sind einige wenige Vesikel mit einer doppelten Hüllmembran sowie einige nicht geschlossene Membranfragmente sichtbar. Vereinzelt lassen sich sogar intakt gebliebene Mitochondrien identifizieren, welche sich durch ihre insgesamt dunklere Erscheinung (aufgrund der elektronendichten Matrix) und die sichtbaren Cristae-Querschnitte (kreisförmige Strukturen innerhalb der Matrix) hervorheben (siehe Abb. E.12 A).

Analog zur Komplex V-Aktivitätsmessung (siehe Abb. E.8) wurden verschiedene Subfractionen der GTV mithilfe differentieller Zentrifugation erstellt und mikroskopisch untersucht (siehe Abb. E.13), mit

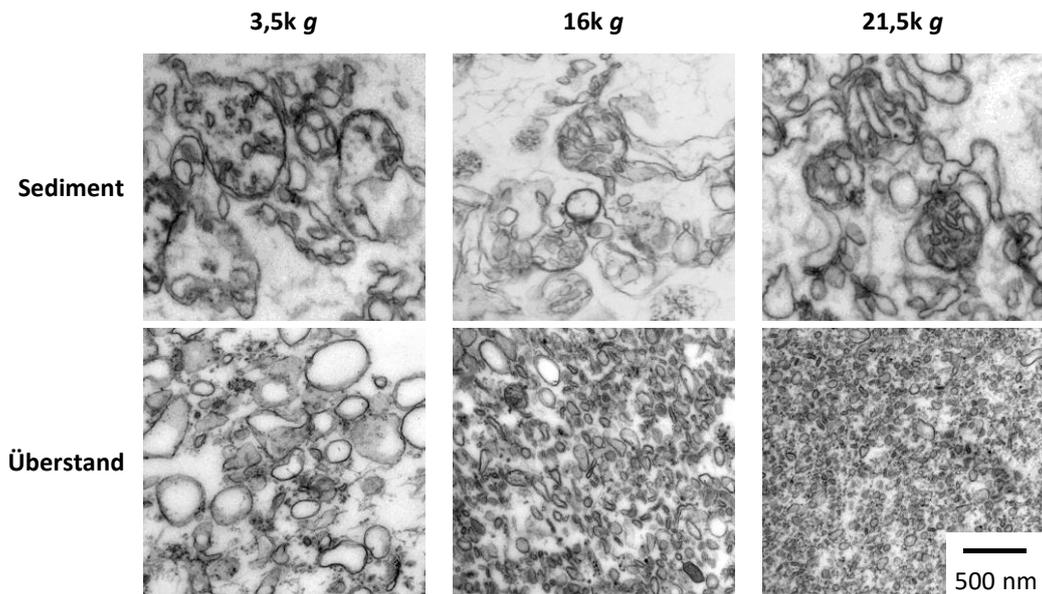
dem Ziel, die Vesikel eventuell von intakten Mitochondrien und großen Membranfragmenten zu befreien.



**Abb. E.12: Kontrastierte elektronenmikroskopische Aufnahmen submitochondrialer Vesikelfractionen.**

Zur visuellen Untersuchung der mittels Gefrier-Tau-Zyklen aus Mitochondrien präparierten Vesikel (GTV) wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Die 70 nm dünnen Schnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat nachgefärbt und mit einem Transmissionselektronenmikroskop untersucht. Es konnten Vesikel mit einzelner Hüllmembran (große Pfeile), doppelter Hüllmembran (große Pfeilspitzen), offene Membranfragmente (kleine Pfeile) und wenige intakte Mitochondrien (kleine Pfeilspitzen) identifiziert werden. Die in **A** und **B** gezeigten Aufnahmen wurden an unterschiedlichen Positionen mit voneinander abweichender Vergrößerung aufgenommen. Eine Maßreferenz ist jeweils unten rechts im Bild angegeben.

Bereits bei der Proben-Aufbereitung fällt auf, dass in den jeweiligen Überstandfraktionen kaum noch Vesikel vorhanden sind. Nur auf sehr wenigen Schnitten können Vesikel entdeckt werden, die sich dort in größeren Gruppen zusammenlagern. Die in den Überstandfraktionen sichtbaren Strukturen sind insgesamt jedoch deutlich homogener und bestehen fast ausschließlich aus kleinen Vesikeln mit einzelner Hüllmembran. Die jeweiligen Sedimentfraktionen enthalten all die bereits oben angesprochenen Strukturen, welche sich in großer Zahl gleichmäßig auf dem gesamten Grid und auf mehrere Schnittebenen verteilen. Es fällt zudem auf, dass mit zunehmender Zentrifugationsgeschwindigkeit immer kleinere Vesikel in den Überstandfraktionen zurückbleiben, während in den Sedimentfraktionen bei bloßer Betrachtung der mikroskopischen Aufnahmen keine offensichtlichen Unterschiede festgestellt werden können.



**Abb. E.13: Kontrastierte elektronenmikroskopische Aufnahmen mitochondrialer Vesikel-Subfraktionen.**

Zur visuellen Untersuchung der durch wiederholte Gefrier-Tau-Zyklen aus Mitochondrien präparierten Vesikel (GTV) und deren Subfraktionierung mittels differentieller Zentrifugation, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Durch die Zentrifugation präparierter GTV-Fractionen jeweils bei 3,5k g, 16k g und 21,5k g wurden entsprechende Sediment- und Überstand-Subfraktionen erstellt. Zur Aufbereitung der Überstand-Fractionen für eine elektronenmikroskopische Auswertung wurden die enthaltenen Strukturen durch Zentrifugation bei 290k g zunächst sedimentiert. Die 70 nm dünnen Schnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat nachgefärbt und mit einem Transmissionselektronenmikroskop untersucht. Eine Maßreferenz ist unten rechts angegeben.

Über die elektronenmikroskopische Analyse von GTV-Fractionen kann also gezeigt werden, dass durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Mitoplasten ein sehr heterogenes Gemisch aus verschiedenen submitochondrialen Strukturen entsteht. Darunter befinden sich in großer Zahl submitochondriale Vesikel verschiedener Größe, mit jeweils nur einer Hüllmembran. Eine rasche Befreiung der generierten Vesikel von intakten Mitochondrien gelingt durch bloße differentielle Zentrifugation anscheinend nicht. Über die Extrusion von GTV-Fractionen durch Membranen mit einer Porengröße von 400 nm bzw. 200 nm wurde versucht, intakte Mitochondrien weiter aufzuschließen und eine homogene Größenverteilung unter den erhaltenen Vesikel zu erreichen. Allerdings führte dieses Verfahren einerseits zu einer stark reduzierten Komplex V-Aktivität und andererseits zu einem deutlichen Materialverlust, bedingt durch die notwendige Probenverdünnung und das verlorene Durchflussvolumen der Extruder-Apparatur (Ergebnisse nicht gezeigt). Es gibt jedoch bereits beschriebene Trennverfahren zur Anreicherung invertierter Vesikel, welche im Rahmen dieser Arbeit nicht zur Anwendung gekommen sind. So könnten beispielsweise ein Zwei-Phasen-System aus Dextran und Polyethylenglycol (Møller *et al.*, 1981), Immunpräzipitation (D'Souza und Lindsay, 1981) oder Affinitätschromatographie (Godinot und Gautheron, 1979) zur Aufreinigung invertierter submitochondrialer Vesikel genutzt werden.

#### d) Zusammenfassung zur Präparation und Charakterisierung

Werden mehrere Subfraktionen der GTV-Präparate über differentielle Zentrifugation angefertigt und für Enzymaktivitätsmessungen verwendet, lässt sich nahezu die komplette Aktivität der ursprünglichen Gesamtfraktion in den jeweiligen Sedimentfraktionen messen, während in den Überstandfraktionen nur noch ein Bruchteil der ursprünglichen Gesamtaktivität messbar ist (siehe Abb. E.5 B, E.8). Diese Beobachtung kann für die Aktivitätsmessungen sowohl von Komplex I als auch von Komplex V gemacht werden. Durch die elektronenmikroskopische Analyse der Subfraktionen konnte festgestellt werden, dass sich in den Sedimentfraktionen neben den vergleichsweise großen Vesikeln auch intakte Mitochondrien und Membranfragmente befinden (siehe Abb. E.13). Diese sollten jedoch nicht für die deutlich höhere Enzymaktivität in den Sedimentfraktionen verantwortlich sein. Vor allem eine messbare Komplex V-Aktivität kann im Falle einzelner Membranfragmente ausgeschlossen werden, denn diese können keinen stabilen Protonengradienten generieren. Da die Kontrollfraktionen mit isolierten Mitochondrien insgesamt deutlich geringere Enzymaktivitäten zeigen als die GTV-Fraktionen (siehe Abb. E.5, E.7), können die vereinzelt im Sediment verbliebenen Mitochondrien ebenfalls als Grund für die hohen Komplex I- und Komplex V-Aktivitäten ausgeschlossen werden. Wahrscheinlich ist es eher der Fall, dass die ebenfalls sedimentierten und vergleichsweise großen Vesikel mit einzelner Hüllmembran für die Aktivität der Sedimentfraktionen, und somit auch den Großteil der Gesamtaktivität der Vesikelfraktionen, verantwortlich sind. Die deutlich kleineren Vesikel in den Überstandfraktionen sind hingegen entweder in einer zu geringen Menge vorhanden, oder besitzen grundsätzlich eine zu geringe Komplex I- und Komplex V-Aktivität, um eine große Rolle in der Gesamtaktivität der Vesikelfraktionen zu spielen. Es wurde bereits postuliert, dass bei der Entstehung submitochondrialer Vesikel der inneren mitochondrialen Hüllmembran tendenziell zwei Subspezies von Vesikeln hervorgehen. Während aus der Grenzregion der inneren Hüllmembran, welche parallel zur äußeren Hüllmembran verläuft, eher kleine und nicht-invertierte Vesikel entstehen, scheinen die Cristae-Regionen der inneren Membran sich vorzugsweise zu größeren und invertierten Vesikeln zusammenzuschließen (Møller *et al.*, 1987). Dies könnte einerseits durch die *cristae junctions*, welche als stabile Verbindungen gegenüberliegender Membranbereiche die eingestülpten Cristae-Bereiche strukturell unterstützen (Perkins *et al.*, 1997), oder durch elektrostatische Wechselwirkungen, welche zu einer „Stapelung“ der Cristae-Membranbereiche beitragen (Møller *et al.*, 1981), hervorgerufen werden. Letzteres könnte auch erklären, weshalb eine Vesikelpräparation unter Salz-Zugabe zu einem erhöhten Anteil invertierter submitochondrialer Vesikel führt (Kay *et al.*, 1985). Die Kationen maskieren vermutlich intrinsische Membranladungen und erlauben so eine noch dichtere „Stapelung“ der Membran, wie es bereits bei der Präparation invertierter Thylakoidvesikel demonstriert werden konnte (Barber, 1982, Andersson *et al.*, 1985). Die innere mitochondriale Hüllmembran besitzt außerdem eine stark ausgeprägte Heterogenität in der lateralen Proteinverteilung. So befinden sich in

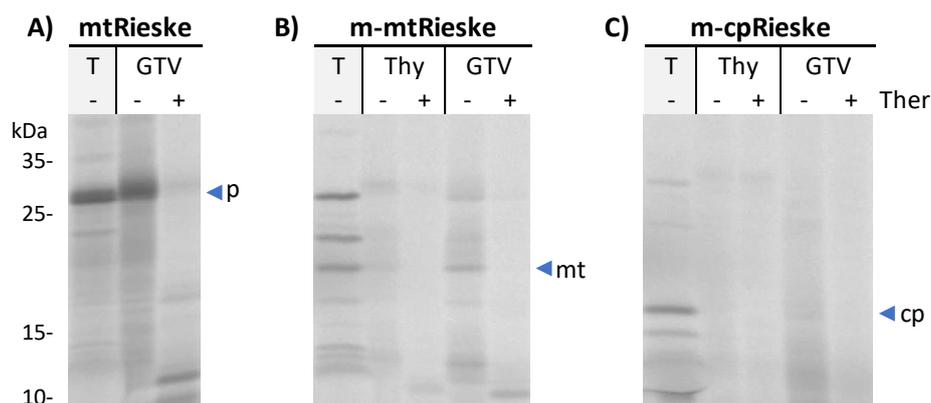
den äußeren Grenzregionen der Membran vermehrt Proteine der Importmaschinerie (beispielsweise TIM23), wohingegen OXPHOS-Komplexe (wie auch Komplex I und Komplex V) hauptsächlich in den Cristae-Regionen lokalisiert sind (Vogel *et al.*, 2006, Wurm und Jakobs, 2006, Davies *et al.*, 2011). Eine derartige Proteinverteilung scheint sich in ähnlicher Form auch zwischen den invertierten und nicht-invertierten Vesikeln zu ergeben (Møller *et al.*, 1987), was ebenfalls auf eine Bildung der jeweiligen Vesikeltypen aus unterschiedlichen Membranbereichen schließen lässt. Insgesamt scheinen die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse der Elektronenmikroskopie und der Enzymaktivitätsmessungen die Annahme weiter zu stärken, dass sich submitochondriale Vesikel in zwei Subspezies einteilen lassen: große, invertierte Vesikel mit vielen ETC-Komplexen und eher kleine, nicht invertierte Vesikel mit vergleichsweise wenigen ETC-Komplexen. Aufgrund der ungleichen Proteinverteilung in der inneren Hüllmembran könnte es nun auch der Fall sein, dass die invertierten Vesikel grundsätzlich einen geringeren Anteil der Tat-Translokase enthalten als nicht-invertierte Vesikel. Da die Position der Proteinkomplexe innerhalb der Membran jedoch stark mit deren Funktion korreliert zu sein scheint (Vogel *et al.*, 2006), ist eine Lokalisierung der Tat-Komplexe in den Cristae-Regionen zusammen mit Komplex III wahrscheinlich, und befindet sich damit tendenziell auch eher in den invertierten Vesikeln. Durch eine geringe Distanz zwischen Tat-Translokase und Komplex III wäre der Weitertransport der mtRieske-Untereinheit und damit die Komplex III-Biogenese deutlich begünstigt.

### **3.1.1.2. Proteintransportversuche mit invertierten submitochondrialen Vesikeln**

Die präparierten GTV konnten zum Großteil als invertiert, intakt und enzymatisch aktiv charakterisiert werden, weshalb sie anschließend für Proteintransportversuche mit potentiellen mtTat-Substraten genutzt wurden. Hierzu wurden die ausgewählten Substrate während der *in vitro*-Synthese radioaktiv markiert und mit den erzeugten Vesikelfractionen inkubiert. Im Gegensatz zu standardmäßig durchgeführten Proteintransportversuchen mit intakten Organellen, ist nach einem Import von Substraten in invertierte Vesikel keine Prozessierung zu erwarten. Dies erschwert die Beurteilung des Transportes deutlich, da die Proteaseresistenz des Substrates als einziges Maß für die Importeffizienz herangezogen werden kann.

Es gibt in Mitochondrien nur ein einziges Protein, für welches der Transport via mtTat-Translokase bisher angenommen und bestätigt wurde: das mitochondriale Rieske-Fe/S-Protein (Hinsley *et al.*, 2001, Schäfer *et al.*, 2020), dessen chloroplastidäres (cpRieske) und bakterielles Homolog ebenfalls über den Tat-Weg transportiert wird (Molik *et al.*, 2001, Bachmann *et al.*, 2006, de Buck *et al.*, 2007, Aldridge *et al.*, 2008). Werden nun das mitochondriale Rieske-Vorläuferprotein (mtRieske) und die den

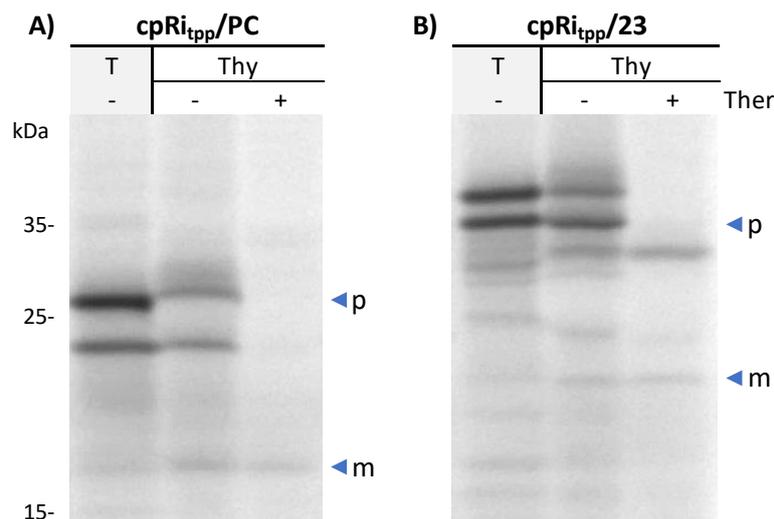
jeweiligen reifen Proteinen von mtRieske (m-mtRieske) und cpRieske (m-cpRieske) entsprechenden Proteine mit GTV inkubiert, sind lediglich die mitochondrialen Substrate anscheinend in der Lage, an die Membran der GTV zu binden, da eine den jeweiligen Substraten entsprechende Bande in den proteaseunbehandelten Spuren zu erkennen ist. Diese Proteinbande verschwindet jedoch infolge der Proteasebehandlung, was gegen einen Import von mtRieske und m-mtRieske ins Vesikelinnere spricht (siehe Abb. E.14 A,B). Zudem kann in keinem der Transportansätze mit isolierten Thylakoiden ein Import festgestellt werden, da alle getesteten Substrate von der zugegebenen Protease Thermolysin abgebaut werden und sich demnach weiterhin außerhalb der Vesikel befinden (siehe Abb. E.14). Dass isolierte Thylakoide nicht dazu in der Lage sind, cpRieske zu importieren konnte bereits experimentell gezeigt werden (Dissertation Molik, 2005). Es wurde postuliert, dass die vermutlich im Stroma stattfindende Assemblierung des [2Fe-2S]-Clusters und anschließende Proteinfaltung (Nuccio *et al.*, 1998) als Transportvorbereitung für eine erfolgreich ablaufende Translokation erforderlich sein könnte. Ein ähnliches Reifungsverhalten könnte auch im Falle des mitochondrialen Rieske-Proteins einen detektierbaren Import in die präparierten Vesikel verhindern. Tatsächlich ist es für mtRieske aus Hefe und Säugern bekannt, dass die Cofaktor-Assemblierung und Proteinfaltung in der mitochondrialen Matrix abläuft (Kispal *et al.*, 1997, Kispal *et al.*, 1999) und das Rieske-Protein hierbei in einem löslichen Zustand in der Matrix vorliegt (Hartl *et al.*, 1986). Auch in pflanzlichen



**Abb. E.14: Proteintransport-Versuche mit Rieske-Proteinvarianten und invertierten submitochondrialen Vesikeln bzw. isolierten Thylakoiden.** Um einen potentiellen Proteintransport in invertierte submitochondriale Vesikel (GTV), welche zuvor durch wiederholte Gefrier-Tau-Zyklen aus isolierten Mitochondrien präpariert wurden, zu detektieren, wurden diese zusammen mit radioaktiv markierten Substraten inkubiert. Getestet wurden **A** das mitochondriale Rieske-Vorläuferprotein (mtRieske), **B** der reife Teil des mitochondrialen Rieske-Proteins (m-mtRieske) und **C** der reife Teil des chloroplastidären Rieske-Proteins (m-cpRieske) (Schema der Rieske-Proteinvarianten siehe Abb. E.10). Die den reifen Rieske-Proteinen entsprechenden Proteine wurden zusätzlich mit isolierten Thylakoiden (Thy) inkubiert, um einen möglichen Import in diese zu überprüfen. Zur Kontrolle der eingesetzten Substrate wurden die entsprechenden *in vitro*-Translationsprodukte (T) auch ohne Zugabe von GTV oder Thylakoiden überprüft. Alle Ansätze der GTV und Thylakoide wurden halbiert, wobei jeweils eine Probe unbehandelt blieb (- Ther) und der anderen 0,02 % Thermolysin zugegeben wurde (+ Ther). Die in den Proben enthaltenen Proteine wurden denaturiert und in einem 10-17,5 %igen SDS-PA-Gradientengel separiert. Das anschließend getrocknete Gel diente der autoradiographischen Detektion der radioaktiv markierten Proteine. Gekennzeichnet sind die Banden, welche den Substraten mtRieske (◀ p), m-mtRieske (◀ mt) und m-cpRieske (◀ cp) entsprechen. Die Referenzwerte des verwendeten Größenstandards sind links in kDa angegeben.

Mitochondrien befinden sich die zur Biogenese von Fe/S-Clustern erforderlichen Proteine und Komponenten in der Matrix (Balk und Pilon, 2011). Sollte die Cofaktor-Assemblierung ein kritischer Schritt in der mtRieske-Translokation sein, muss zur direkten Untersuchung des mitochondrialen Tat-Transportes eine Insertion des [2Fe-2S]-Clusters entweder *in vitro* erfolgen oder die Notwendigkeit der Cluster-Insertion umgangen werden. Der Versuch, das [2Fe-2S]-Cluster *in vitro* nach Freibert *et al.* (2018) unter anaeroben Bedingungen in heterolog synthetisiertes mtRieske zu inserieren, war leider nicht erfolgreich, da sich dieses Membranprotein bislang nicht in ausreichender Menge synthetisieren und aufreinigen lässt.

Da im Gegensatz zum authentischen cpRieske jedoch Fusionsproteine aus dem cpRieske-Signalanker (inklusive eingefügter Schnittstelle für die thylakoidäre Prozessierungspeptidase (TPP)) und den reifen Teilen von Plastocyanin (cpRi<sub>tpp</sub>/PC) oder OEC23 (cpRi<sub>tpp</sub>/23) in isolierte Thylakoide importiert und dort prozessiert werden können (siehe Abb. E.15) (Dissertation Molik, 2005), scheint der Signalanker generell eine Translokation über das Tat-System vermitteln zu können. Vielmehr scheint der C-terminale, hydrophile Teil des cpRieske einen Import in isolierte Thylakoide zu verhindern, vermutlich aufgrund der ausbleibenden Cofaktorinsertion und Proteinfaltung. Ein entsprechender

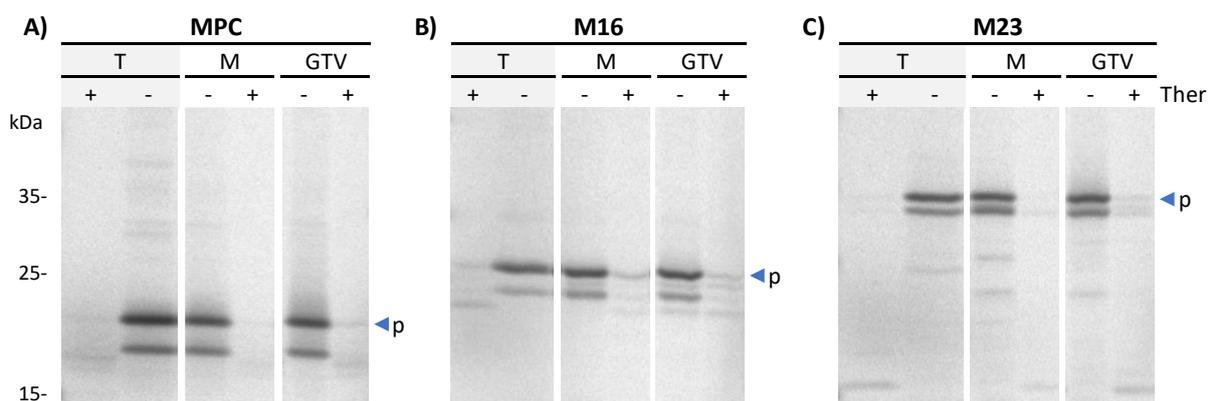


**Abb. E.15: Proteintransport-Versuche mit rekombinanten cpRieske-Konstrukten und isolierten Thylakoiden.**

Um den Proteintransport cpRieske-basierter Konstrukte in isolierte Thylakoide (Thy) zu untersuchen, wurden diese zusammen mit radioaktiv markierten Substraten inkubiert. Getestet wurden **A** ein Konstrukt aus dem cpRieske-Signalanker inklusive eingefügter TPP-Schnittstelle (tpp, thylakoidäre Prozessierungspeptidase) und dem reifen Teil von Plastocyanin (cpRi<sub>tpp</sub>/PC), sowie **B** ein Konstrukt aus dem cpRieske-Signalanker inklusive eingefügter TPP-Schnittstelle und dem reifen Teil von OEC23 (cpRi<sub>tpp</sub>/23). Zur Kontrolle der eingesetzten Substrate wurden die entsprechenden *in vitro*-Translationsprodukte (T) auch ohne Zugabe von Thylakoiden überprüft. Die Transportansätze wurden halbiert, wobei jeweils eine Probe unbehandelt blieb (- Ther) und der anderen 0,02 % Thermolysin zugegeben wurde (+ Ther). Die in den Proben enthaltenen Proteine wurden denaturiert und in einem 10-17,5 %igen SDS-PA-Gradientengel separiert. Das anschließend getrocknete Gel diente der autoradiographischen Detektion der radioaktiv markierten Proteine, darunter die zugegebenen Substrate (◀ p) und die thylakoidären Prozessierungsprodukte (◀ m). Die Referenzwerte des verwendeten Größenstandards sind links in kDa angegeben.

Ansatz, den C-Terminus von mtRieske mit verschiedenen hydrophilen Passagierproteinen zu ersetzen, wurde daher auch für die Transportversuche mit den GTV gewählt. Hierzu wurden rekombinante Konstrukte aus dem mtRieske-Signalanker sowie verschiedenen Passagierproteinen erstellt: darunter Plastocyanin, OEC16 und OEC23 (Konstrukte: MPC, M16 und M23, Schema siehe E.10). Die oben genannten Konstrukte wurden nun zusammen mit Mitochondrien und GTV inkubiert, um anhand eines Vergleichs der festgestellten Proteaseresistenzen der jeweiligen Substrate mit Mitochondrien und GTV auf einen Import in die Vesikel schließen zu können.

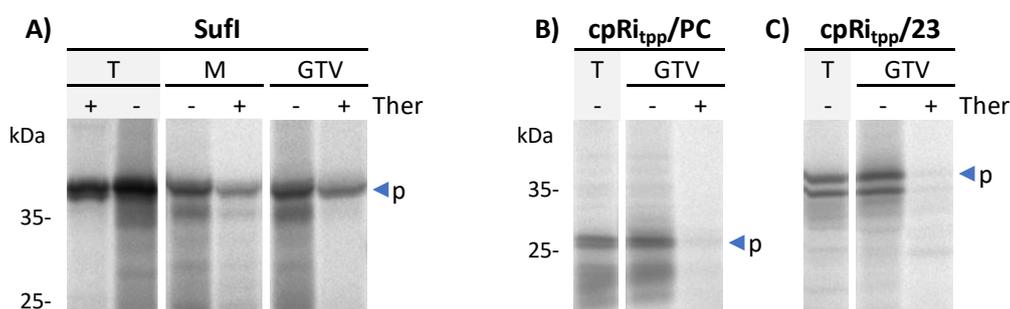
Obwohl die erstellten Konstrukte MPC, M16 und M23 zwar effizient an die Membranen von Mitochondrien und GTV binden, kann kein eindeutiger Import festgestellt werden (siehe Abb. E.16). Da den Konstrukten ein mitochondriales Importsignal fehlt, ist der ausbleibende Import in den mitochondrialen Kontrollfraktionen zu erwarten. Obwohl im Falle von MPC und M23 zwar eine leicht erhöhte Proteaseresistenz des Substrates im Vergleich zur mitochondrialen Kontrolle erkannt werden kann (siehe Abb. E.16 A,C), ist das Signal dennoch insgesamt zu schwach, um zweifelsfrei von einem Import sprechen zu können. Die Proteaseresistenz von M16 bei Inkubation mit GTV fällt zwar stärker aus (siehe Abb. E.16 B), jedoch ist dieses Konstrukt auch bei Inkubation mit intakten Mitochondrien vor der Protease geschützt, eventuell aufgrund einer starken und spontanen Bindung an die Hüllmembran. Ein solches Verhalten konnte zuvor bereits anhand des reifen Teils von OEC16 in



**Abb. E.16: Proteintransport-Versuche mit rekombinanten mtRieske-Konstrukten und invertierten submitochondrialen Vesikeln.** Um den Proteintransport mtRieske-basierter Konstrukte in invertierte Vesikel (GTV), welche durch wiederholte Gefrier-Tau-Zyklen aus zuvor isolierten Mitochondrien präpariert wurden, zu untersuchen, wurden diese zusammen mit radioaktiv markierten Substraten inkubiert. Getestet wurden **A** MPC, **B** M16 und **C** M23 (Schema der mtRieske-Konstrukte siehe Abb. E.10). Als Kontrollen wurden diese Konstrukte auch mit isolierten Mitochondrien (M) inkubiert, und die reinen *in vitro*-Translationsprodukte (T) ohne Zugabe von Mitochondrien oder GTV überprüft. Alle Ansätze wurden halbiert, wobei jeweils eine Probe unbehandelt blieb (- Ther) und der anderen 0,02 % Thermolysin zugegeben wurde (+ Ther). Die in den Proben enthaltenen Proteine wurden denaturiert und in einem 10-17,5 %igen SDS-PA-Gradientengel separiert. Das anschließend getrocknete Gel diente der autoradiographischen Detektion der radioaktiv markierten Proteine. Gekennzeichnet sind die Banden auf Laufhöhe der jeweilig zugegebenen Substrate (◀ p). Die Referenzwerte des verwendeten Größenstandards sind links in kDa angegeben. Weiße Lücken in den Abbildungen verdeutlichen, dass dort verschiedene Bereiche des gleichen Gelbildes zusammengefügt wurden.

Anwesenheit isolierter Thylakoide und generierter Liposomen beobachtet werden (nicht veröffentlichte Ergebnisse der AG Prof. Klösgen).

Auch plastidäre sowie bakterielle Tat-Substrate, welche in der Regel ohne Probleme in isolierte Thylakoide importiert werden (Halbig *et al.*, 1999, Tarry *et al.*, 2009), wurden auf einen möglichen Import in invertierte submitochondriale Vesikel getestet. Hierzu dienten die bereits beschriebenen Konstrukte cpRieske<sub>tp</sub>/PC und cpRieske<sub>tp</sub>/23 und das bakterielle Protein SufI als Substrate für Transportversuche mit präparierten GTV. Das bakterielle SufI zeigt ein ähnliches Verhalten wie das zuvor gezeigte M16, da in allen Fraktionen eine hohe Proteaseresistenz festgestellt werden kann (siehe Abb. E.17 A), was eventuell durch eine spontane Insertion in die Membran erklärt werden könnte (Karlsson *et al.*, 2012). Bei Betrachtung der proteasebehandelten Translationskontrolle fällt allerdings auf, dass die zugesetzte Protease dieses Substrat generell nicht effizient abbauen kann. Neben einer potentiellen Bindung an die Membran kann demnach auch eine substratspezifische Proteaseresistenz, beispielsweise aufgrund einer starken und spontanen Faltung, für das kräftige Signal in den proteasebehandelten Fraktionen verantwortlich sein. Die chloroplastidären Substrate cpRieske<sub>tp</sub>/PC und cpRieske<sub>tp</sub>/23 können zwar an die Vesikelmembran binden, ein Import ist allerdings nicht sichtbar (siehe Abb. E.17 B,C). Es stellt sich die Frage, ob eventuell lösliche Komponenten der mitochondrialen Matrix am mtTat-Transport beteiligt und für diesen erforderlich sind, und aus diesem Grund bisher kein eindeutiger Proteintransport in submitochondriale Vesikel detektiert werden konnte. Während bei einem Import von Tat-Substraten in invertierte Vesikel zwar eine Vielzahl erforderlicher



**Abb. E.17: Proteintransport-Versuche mit bakteriellen bzw. plastidären Tat-Substraten und invertierten submitochondrialen Vesikeln.** Um den Proteintransport bakterieller und chloroplastidärer Tat-Substrate in invertierte Vesikel (GTV), welche durch wiederholte Gefrier-Tau-Zyklen aus zuvor isolierten Mitochondrien präpariert wurden, zu untersuchen, wurden diese zusammen mit radioaktiv markierten Substraten inkubiert. Getestet wurden **A** SufI als bakterielles Tat-Substrat, sowie **B** cpRi<sub>tp</sub>/PC und **C** cpRi<sub>tp</sub>/23 als chloroplastidäre Tat-Substrate. Ebenfalls gezeigt ist ein Kontrollansatz von SufI mit isolierten Mitochondrien (M). Zur Kontrolle der eingesetzten Substrate wurden die entsprechenden *in vitro*-Translationsprodukte (T) auch ohne Zugabe von GTV oder Mitochondrien überprüft. Alle Ansätze wurden halbiert, wobei jeweils eine Probe unbehandelt blieb (- Ther) und der anderen 0,02 % Thermolysin zugegeben wurde (+ Ther). Die in den Proben enthaltenen Proteine wurden denaturiert und in einem 10-17,5 %igen SDS-PA-Gradientengel separiert. Die anschließend getrockneten Gele dienten der autoradiographischen Detektion der radioaktiv markierten Proteine. Gekennzeichnet sind die Banden auf Laufhöhe der jeweilig zugegebenen Substrate (◀ p). Die Referenzwerte des verwendeten Größenstandards sind jeweils links in kDa angegeben. Weiße Lücken in den Abbildungen verdeutlichen, dass dort verschiedene Bereiche des gleichen Gelbildes zusammenggefügt wurden.



gleichermaßen abbaut (siehe Abb. E.18). Es kann daher ausgeschlossen werden, dass alleinig das Fehlen von TatA für das Ausbleiben einer Proteintranslokation in die GTV verantwortlich ist.

Die Zugabe von heterolog synthetisiertem TatA zeigt auf einen Tat-Transport mitochondrialer Substrate in präparierte GTV keinerlei Effekt. Da es neben TatA möglicherweise weitere an der Tat-Translokation beteiligte und lösliche Faktoren im Stroma gibt (Molik *et al.*, 2001, Ouyang *et al.*, 2020), könnte auch im Falle des mitochondrialen Tat-Transportes eine Beteiligung anderer matrixlokalisierter Faktoren erforderlich sein. Aufgrund der benötigten Menge isolierter Mitochondrien war es bisher allerdings nicht möglich, aufkonzentrierte Matrix zu präparieren und zur Re-Isolierung präparierter Vesikelfractionen zu nutzen.

Bisher war es leider nicht möglich, einen Tat-Transport an invertierten submitochondrialen Vesikeln darzustellen und zu untersuchen. Zukünftige Erkenntnisse zur mtTat-Translokase, weitere Ansätze zur Optimierung der Vesikelquantität und -qualität, sowie der Einsatz hochsensitiver und fluoreszenzbasierter Mikroskopietechniken, wie zum Beispiel das optimierte *self-assembling split*-GFP-System (Sharma *et al.*, 2019), könnten zu einem späteren Zeitpunkt eventuell zu einem erfolgreichen Nachweis einer Tat-Translokation in präparierten Vesikeln führen. Auch wenn die im Rahmen dieser Arbeit präparierten Vesikel hauptsächlich zur Untersuchung eines Tat-Systems in pflanzlichen Mitochondrien genutzt werden sollten, lassen sich diese invertierten Vesikel vermutlich für weitere Forschungsschwerpunkte nutzen. Die mitochondriale Prozessierungspeptidase (MPP) in Pflanzen ist zwar bereits gut charakterisiert (Heidorn-Czarna *et al.*, 2022), allerdings erfolgten die meisten Untersuchungen der MPP anhand des solubilisierten und anschließend aufgereinigten Komplex III/MPP. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die präparierten Vesikel eine gut detektierbare MPP-Aktivität besitzen, was eine Analyse der MPP in ihrer Membrenumgebung ermöglicht und so eventuell zu weiteren Erkenntnissen verhilft. Auch bei der Untersuchung der Calcium- und Mangan-Homöostase von Pflanzenzellen könnten die invertierten Vesikel ein interessantes System darstellen, da vor Allem der  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mn}^{2+}$ -Export aus Mitochondrien noch weitestgehend unerforscht ist (He *et al.*, 2021).

Zusätzlich zur Präparation invertierter submitochondrialer Vesikel wurde allerdings eine weitere Methode etabliert, welche sich zur angestrebten Charakterisierung der mitochondrialen Tat-Translokase bereits an intakten Mitochondrien eignet, und daher nicht auf die Subfraktionierung isolierter Mitochondrien angewiesen ist.

### 3.1.2. Cystein-Modifizierung durch Thiol-reaktive Reagenzien

Die Modifizierung freier Cysteinreste von Membranproteinen durch Thiol-reaktive Reagenzien erlaubt die Bestimmung ihrer Topologie hinsichtlich einer *cis*- bzw. *trans*-Orientierung innerhalb der Membran (Bogdanov *et al.*, 2005, Dissertation Schlesier, 2015). Ein solches Verfahren wurde nun im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt, um den mitochondrialen Tat-Transport durch die Topologiebestimmung potentieller Tat-Substrate in intakten Mitochondrien nachzuverfolgen. Hierzu musste allerdings durch die Auswahl geeigneter Thiol-reaktiver Reagenzien sichergestellt werden, dass prozessierte Proteine erst nach erfolgtem Export in den Intermembranraum modifiziert werden können (Schema zum mtTat-Transport siehe Einleitung Abb. I.5). Die chemischen Eigenschaften der Reagenzien müssen also gewährleisten, dass diese lediglich die äußere, jedoch nicht die innere Hüllmembran passieren können (also klein genug, um Porine frei durchqueren zu können und hydrophil genug, um nicht durch die innere Hüllmembran zu diffundieren). Bei den hier verwendeten Reagenzien handelt es sich um AMS (4-Acetamido-4'-Maleimidylstilben-2,2'-disulfonsäure), MalPEG (Methoxypolyethylenglycol-maleimid) mit verschiedenen langen PEG-Polymerketten (mit einem Molekulargewicht von 750 Da, 5 kDa und 10 kDa) und das von Dr. Mario Jakob (AG Prof. Klösgen) synthetisierte Maleimid-Derivat MCCB (4-(*N*-Maleinimidomethyl)-cyclohexan-1-carbonsäurebradykininester).

#### 3.1.2.1. MalPEG

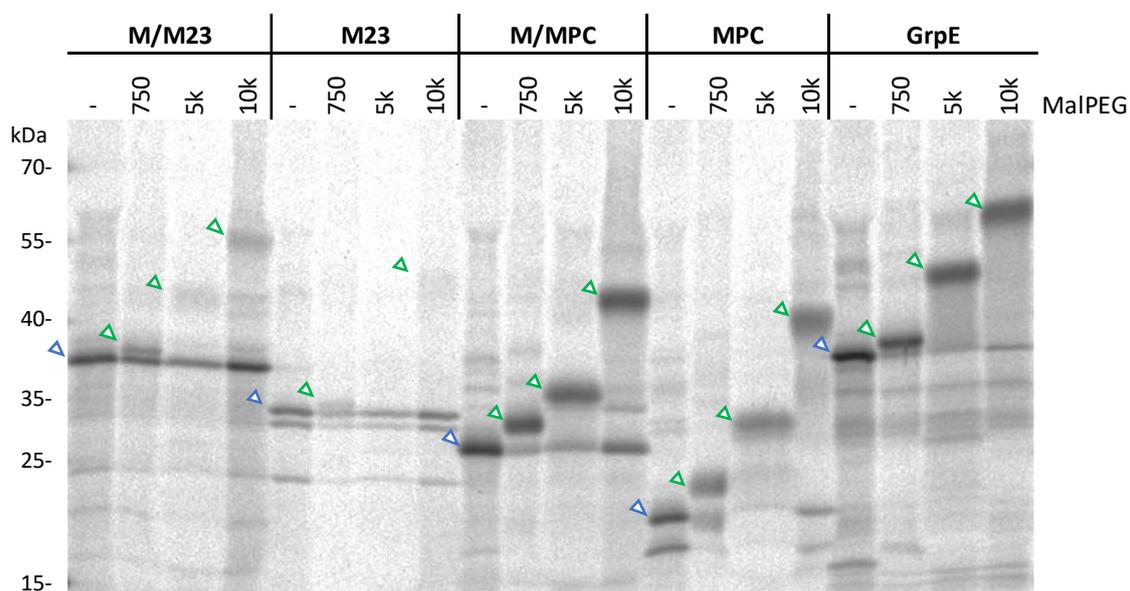
MalPEG ist ein langkettiges Polyethylenglycol-Polymer, welches über eine Maleimidgruppe kovalent an Cysteinreste binden, und somit zur PEGylierung von Proteinen genutzt werden kann (Koch *et al.*, 2012). Ein Vorteil von MalPEG ist, dass es in etlichen Varianten und mit diversen Modifikationen verfügbar ist, was einen sehr vielseitigen Einsatz erlaubt. Hier wurden MalPEG-Derivate mit einem Molekulargewicht von 750 Da, 5 kDa und 10 kDa getestet.

##### a) **Modifizierungskontrolle mit *in vitro*-Translationsprodukten**

Die für die Topologiestudien in Frage kommenden Substrate mit einem potentiell modifizierbaren Cysteinrest in der hydrophilen C-terminalen Region, also die mtRieske basierten Konstrukte (M/M23 und M/MPC) und deren prozessierte Varianten (M23 und MPC) sowie das matrixlokalisierte Kontrollprotein GrpE, wurden zunächst auf ihre Markierbarkeit mittels MalPEG untersucht. Hierzu wurden die entsprechenden radioaktiv markierten Translationsprodukte zusammen mit verschiedenen MalPEG-Derivaten inkubiert, die Proteine im Ansatz ausgefällt und anschließend über eine denaturierende Gelelektrophorese aufgetrennt. Die chimären Konstrukte aus mtRieske und

OEC16 wurden für die Cystein-Modifizierung nicht genutzt, da die resultierenden Konstrukte keine modifizierbaren Cysteinreste enthalten.

Eine erfolgreiche Modifizierung durch die MalPEG-Derivate kann in nahezu allen Kombinationen durch eine entsprechende Änderung des Molekulargewichts der modifizierten Translationsprodukte festgestellt werden (siehe Abb. E.19). Hierdurch wird das Laufverhalten der modifizierten Proteine je nach Molekulargewicht des jeweiligen MalPEG-Derivates stärker oder schwächer beeinflusst, wobei ein stufenartiges Muster entsteht. Dieses wird insbesondere bei einer Modifizierung von M/MPC, MPC und GrpE deutlich, welche sehr effizient von allen getesteten MalPEG-Derivaten modifiziert werden können. Die Modifizierung von M/M23 und M23 fällt im Vergleich deutlich schwächer aus. Eine mögliche Erklärung ist die starke und spontan ablaufende Faltung des reifen Teils von OEC23, welche eventuell zu einer Maskierung des vorhandenen Cysteinrestes führt und diesen damit weniger zugänglich macht (Dissertation Schlesier, 2015).



**Abb. E.19: Kontrolle der Cystein-Modifizierung von *in vitro*-translatierten, rekombinanten mtRieske-Konstrukten und GrpE durch verschiedene MalPEG-Derivate.** Um die Effizienz einer Cystein-Modifizierung durch verschiedene MalPEG-Derivate und deren Auswirkungen auf das Laufverhalten der jeweilig modifizierten Proteine zu überprüfen, wurden die entsprechenden, radioaktiv markierten *in vitro*-Translationsprodukte mit unterschiedlichen MalPEG-Derivaten inkubiert. Getestet wurden mtRieske-basierte Konstrukte mit jeweils einem Cysteinrest, also M/M23 (C300), M23 (C248), M/MPC (C225) und MPC (C173), sowie das Kontrollprotein GrpE (C289). Zur Modifizierung wurden MalPEG-Derivate mit einem Molekulargewicht von etwa 750 Da, 5.000 Da (5k) und 10.000 Da (10k) in einer Konzentration von je 500  $\mu$ M eingesetzt. Die in den Proben enthaltenen Proteine wurden nach erfolgter Inkubation mittels TCA-Präzipitation ausgefällt, denaturiert und in einem 10-17,5 %igen SDS-PA-Gradientengel separiert. Das anschließend getrocknete Gel diente der autoradiographischen Detektion der radioaktiv markierten Proteine. Gekennzeichnet sind die Banden auf Laufhöhe der jeweiligen Translationsprodukte mit ( $\triangleleft$ ) und ohne ( $\triangleleft$ ) Modifizierung durch MalPEG. Die Referenzwerte des verwendeten Größenstandards sind links in kDa angegeben.

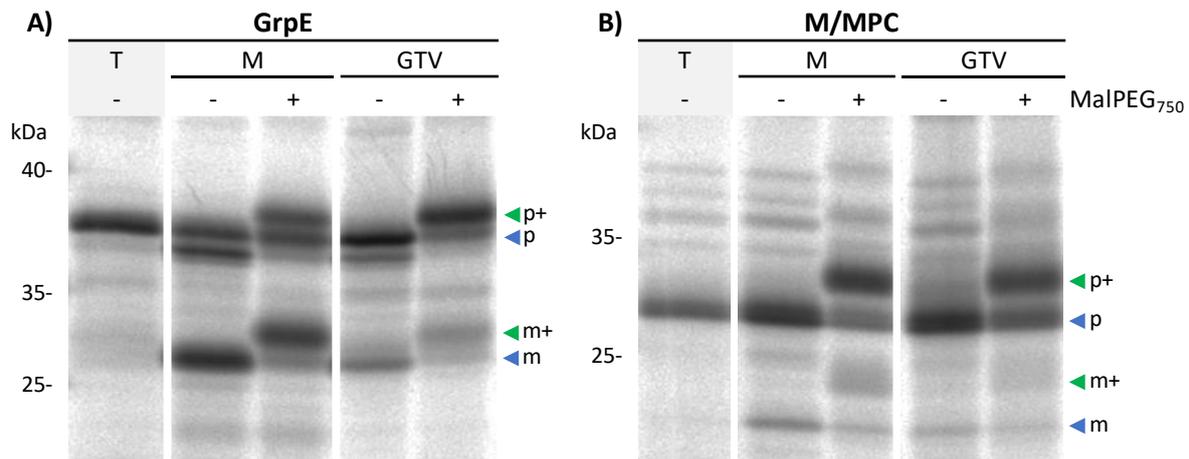
### b) Kontrollversuche zur Bestimmung der Membrantopologie importierter Proteine

Aufgrund der Resultate der Modifizierungskontrollen wurden alle weiteren Versuche hauptsächlich mit M/MPC bzw. MPC durchgeführt, da die Modifizierung dieser Konstrukte besonders effizient abläuft. GrpE wird ebenfalls mit großer Effizienz modifiziert und wurde daher in den nachfolgenden Versuchen als matrixlokalisierte Negativkontrolle genutzt. Eine Inkubation der Substrate zusammen mit präparierten GTV führt, wie in Kapitel 3.1.1.1.b) beschrieben, zu einer Prozessierung der Substrate außerhalb der Vesikel. Dort sollten die Prozessierungsprodukte nicht nur für zugesetzte Proteasen, sondern auch für die Thiol-reaktiven Reagenzien erreichbar sein, weshalb Ansätze inklusive GTV als Positivkontrollen der Cystein-Modifizierung verwendet wurden. Nach erfolgter Inkubation wurden die Mitochondrien bzw. Vesikel zunächst gewaschen, um nicht importierte Vorläuferproteine aus dem Umgebungsmedium zu entfernen, und anschließend in Puffer inklusive der jeweiligen Thiol-reaktiven Reagenzien re-isoliert und zur Cystein-Modifizierung inkubiert.

#### MalPEG<sub>750</sub>

Die Zugabe von MalPEG<sub>750</sub> zu Mitochondrien- bzw. Vesikelfractionen nach erfolgter Inkubation mit M/MPC oder GrpE führt zu einer deutlichen Modifizierung der nicht importierten, aber membranassoziierten Vorläuferproteine (siehe Abb. E.20). Darüber hinaus werden außerdem die jeweiligen Prozessierungsprodukte modifiziert, wobei im Falle des durch GTV prozessierten M/MPC das modifizierte Produkt nur sehr schwach erscheint (siehe Abb. E.20 B). Auch in den Mitochondrienfraktionen wird das importierte und prozessierte M/MPC deutlich modifiziert. Entgegen der Erwartungen kann sogar das reife GrpE, welches nach einem Import in intakte Mitochondrien in der mitochondrialen Matrix verbleibt und daher nicht erreichbar sein sollte, durch zugesetztes MalPEG<sub>750</sub> modifiziert werden (siehe Abb. E.20 A). Da M/MPC als potentiell mtTat-Substrat nach dessen Import in intakte Mitochondrien und anschließender Prozessierung in den Intermembranraum re-exportiert werden könnte, war die deutlich sichtbare Modifizierung des prozessierten M/MPC hier jedoch zu erwarten.

Die Ergebnisse zeigen zwar, dass MalPEG<sub>750</sub> sich auch in Anwesenheit von Mitochondrien und Vesikeln sowie nach Proteintransport und -prozessierung zur Modifizierung der Substrate eignet, aber anscheinend ohne Einschränkung auch in die Matrix gelangen kann. Die polaren Eigenschaften der Maleimid-Kopfgruppe sind vermutlich nicht ausreichend, um das Molekül mit seiner geringen Gesamtgröße an der Diffusion durch die innere Hüllmembran zu hindern.



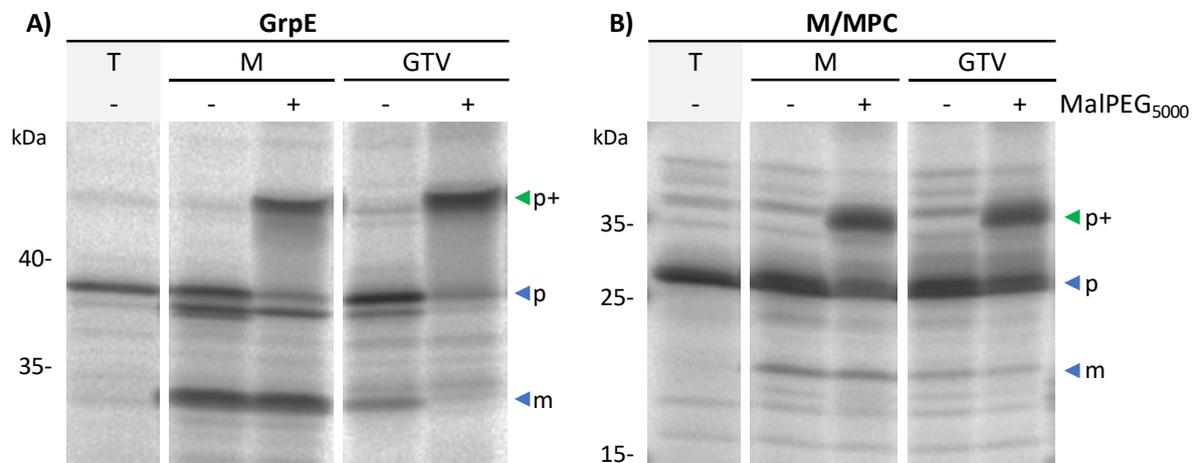
**Abb. E.20: Überprüfung von MalPEG<sub>750</sub> als geeignetes Reagenz zur Topologie-Bestimmung importierter Proteine.**

Um die Eignung von MalPEG<sub>750</sub> zur Topologie-Bestimmung der von isolierten Mitochondrien importierten und potentiell re-exportierten Proteine zu überprüfen, wurden isolierte Mitochondrien (M) zunächst mit radioaktiv markierten Vorläuferproteinen (**A** GrpE, **B** M/MPC) und anschließend zur Cystein-Modifizierung mit MalPEG<sub>750</sub> inkubiert. Zur Modifizierungskontrolle mitochondrial prozessierter Proteine wurden beide Substrate zusätzlich mit invertierten Vesikeln (GTV) und anschließend mit MalPEG<sub>750</sub> inkubiert, da invertierte Vesikel die zugegebenen Substrate im Umgebungsmedium prozessieren (siehe Abb. E.11), und diese dort folglich für eine Modifizierung zugänglich sein sollten. Nach erfolgter Inkubation von Mitochondrien bzw. GTV mit den jeweiligen Substraten wurden alle Ansätze halbiert, wobei jeweils eine Probe in 1x IP und die andere in 1x IP inklusive 500 µM MalPEG<sub>750</sub> re-isoliert und inkubiert wurde (-/+ MalPEG<sub>750</sub>). Anschließend wurden die in den Proben enthaltenen Proteine denaturiert und in einem 10-17,5 %igen SDS-PA-Gradientengel separiert. Die anschließend getrockneten Gele dienen der autoradiographischen Detektion der radioaktiv markierten Proteine. **A** Mithilfe von GrpE wurde getestet, ob matrixlokalisierte Prozessierungsprodukte wie erwartet unmodifiziert bleiben. **B** Für M/MPC wurde hingegen, im Falle eines Re-Exportes nach erfolgter Prozessierung, eine Modifizierung des reifen Proteins (im Intermembranraum) erwartet. Zur Kontrolle der eingesetzten Substrate wurden die entsprechenden *in vitro*-Translationsprodukte (T) auch ohne Zugabe von Mitochondrien bzw. GTV überprüft. Gekennzeichnet sind die Banden auf Laufhöhe der jeweiligen Vorläuferproteine mit (◀ p+) und ohne (◀ p) Modifizierung durch MalPEG<sub>750</sub>, sowie der mitochondrialen Prozessierungsprodukte mit (◀ m+) und ohne (◀ m) Modifizierung durch MalPEG<sub>750</sub>. Die Referenzwerte des verwendeten Größenstandards sind jeweils links in kDa angegeben. Weiße Lücken in den Abbildungen verdeutlichen, dass dort verschiedene Bereiche des gleichen Gelbildes zusammengefügt wurden.

### MalPEG<sub>5.000</sub>

Wird die Cystein-Modifizierung nach erfolgtem Proteintransport nun stattdessen mit MalPEG<sub>5.000</sub> durchgeführt, erfolgt auch hier eine effiziente Modifizierung beider getesteter Vorläuferproteine; sowohl in Anwesenheit isolierter Mitochondrien als auch präparierter Vesikel (siehe Abb. E.21). Die Modifizierung eines Prozessierungsproduktes lässt sich hingegen lediglich bei dem von GTV prozessierten GrpE vermuten, da die Bande des Prozessierungsproduktes infolge der MalPEG-Addition zwar verschwindet, aber keine weitere Bande in Erscheinung tritt, die einem modifizierten Protein entsprechen könnte. Die ausbleibende Modifizierung von prozessiertem M/MPC in den Vesikelfractionen könnte eventuell mit einer potentiellen Maskierung der zur Modifizierung erforderlichen Cysteinseitenkette infolge der Membranassoziation erklärt werden. MalPEG<sub>5.000</sub> ist ein deutlich größeres Molekül als das zuvor genutzte MalPEG<sub>750</sub> und bildet in wässriger Umgebung mit

hoher Wahrscheinlichkeit Tertiärstrukturen aus, die in manchen Fällen eine effiziente Modifizierung membranassoziierter Proteine erschweren könnte. Die Größe von MalPEG<sub>5.000</sub> sowie die vermutete Ausbildung räumlicher Strukturen könnte unter Umständen auch eine ungehinderte Passage der Porine erschweren.



**Abb. E.21: Überprüfung von MalPEG<sub>5.000</sub> als geeignetes Reagenz zur Topologie-Bestimmung importierter Proteine.**

Um die Eignung von MalPEG<sub>5.000</sub> zur Topologie-Bestimmung der von isolierten Mitochondrien importierten und potentiell re-exportierten Proteine zu überprüfen, wurden isolierte Mitochondrien (M) zunächst mit radioaktiv markierten Vorläuferproteinen (A GrpE, B M/MPC) und anschließend zur Cystein-Modifizierung mit MalPEG<sub>5.000</sub> inkubiert. Zur Modifizierungskontrolle mitochondrial prozessierter Proteine wurden beide Substrate zusätzlich mit invertierten Vesikeln (GTV) und anschließend mit MalPEG<sub>5.000</sub> inkubiert, da invertierte Vesikel die zugegebenen Substrate im Umgebungsmedium prozessieren (siehe Abb. E.11) und diese dort folglich für eine Modifizierung zugänglich sein sollten. Nach erfolgter Inkubation von Mitochondrien bzw. GTV mit den jeweiligen Substraten wurden alle Ansätze halbiert, wobei jeweils eine Probe in 1x IP und die andere in 1x IP inklusive 500  $\mu$ M MalPEG<sub>5.000</sub> re-isoliert und inkubiert wurde (-/+ MalPEG<sub>5.000</sub>). Anschließend wurden die in den Proben enthaltenen Proteine denaturiert und in einem 10-17,5 %igen SDS-PA-Gradientengel separiert. Die anschließend getrockneten Gele dienten der autoradiographischen Detektion der radioaktiv markierten Proteine. A Mithilfe von GrpE wurde getestet, ob matrixlokalisierte Prozessierungsprodukte wie erwartet unmodifiziert bleiben. B Für M/MPC wurde hingegen, im Falle eines Re-Exportes nach erfolgter Prozessierung eine Modifizierung des reifen Proteins (im Intermembranraum) erwartet. Zur Kontrolle der eingesetzten Substrate wurden die entsprechenden *in vitro*-Translationsprodukte (T) auch ohne Zugabe von Mitochondrien bzw. GTV überprüft. Gekennzeichnet sind die Banden auf Laufhöhe der jeweiligen Vorläuferproteine mit ( $\blacktriangleleft$  p+) und ohne ( $\blacktriangleleft$  p) Modifizierung durch MalPEG<sub>5.000</sub>, sowie der mitochondrialen Prozessierungsprodukte mit ( $\blacktriangleleft$  m+) und ohne ( $\blacktriangleleft$  m) Modifizierung durch MalPEG<sub>5.000</sub>. Die Referenzwerte des verwendeten Größenstandards sind jeweils links in kDa angegeben. Weiße Lücken in den Abbildungen verdeutlichen, dass dort verschiedene Bereiche des gleichen Gelbildes zusammengefügt wurden.

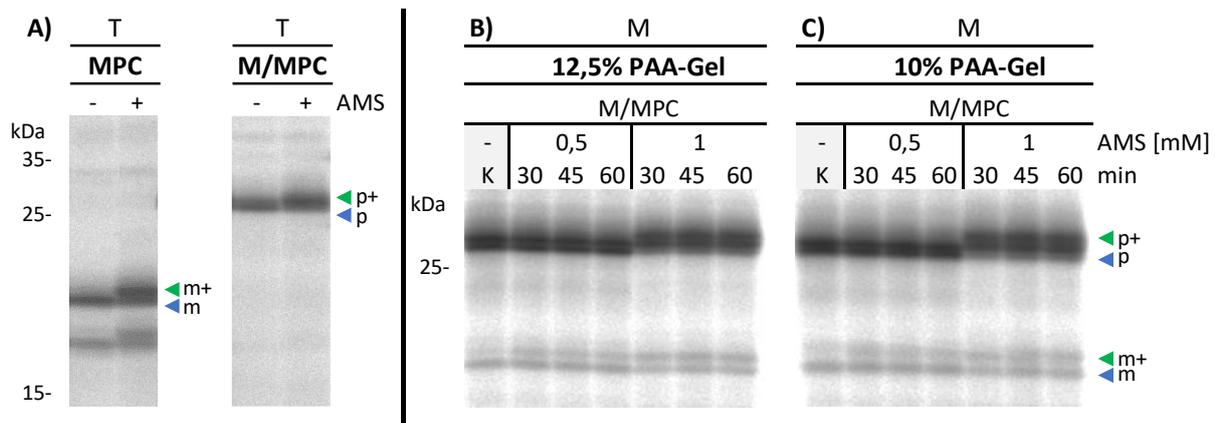
Insgesamt scheint MalPEG für eine Darstellung des Proteinexports gefalteter mtTat-Substrate nicht optimal geeignet zu sein, da die genutzten Derivate, wie im Falle von MalPEG<sub>5.000</sub> (und somit vermutlich auch MalPEG<sub>10.000</sub>), aufgrund ihrer Größe Membranproteine entweder nur ineffizient modifizieren oder die Porine nicht passieren können. Auch MalPEG<sub>750</sub> ist aufgrund seiner Membrangängigkeit für die hier angestrebten Membrantopologiestudien ungeeignet, weshalb einige weitere Alternativen getestet wurden.

### 3.1.2.2. AMS

AMS ist ein vergleichsweise kleines, Thiol-reaktives Reagenz mit einer Masse von ca. 540 Da und ist aufgrund seiner hohen Polarität nicht membrangängig (Chan *et al.*, 2007, Denoncin *et al.*, 2013). Es erfüllt damit einige kritische Anforderungen, die für Topologie-Analysen von Membranproteinen relevant sind. Die Modifizierung freier Cysteinreste geschieht auch im Falle von AMS über eine Maleimid-Kopfgruppe. Zudem enthält AMS das polysulfonierte Stilben, welches aufgrund seiner fluoreszierenden Eigenschaften (Hillis und Ishikura, 1968) eventuell auch die Durchführung von Topologiestudien mittels Laserscanning-Mikroskopie ermöglichen könnte.

#### a) **Modifizierungskontrolle mit *in vitro*-Translationsprodukten und Optimierungsansätze**

Um zu überprüfen, ob eine Cystein-Modifizierung mittels AMS möglich und trotz dessen geringer Masse nach erfolgter Gelelektrophorese gut detektierbar ist, wurde die Modifizierung der Translationsprodukte von M/MPC und MPC, analog zur Modifizierungskontrolle der verschiedenen MalPEG-Derivate, getestet und ausgewertet. Bei Betrachtung der erhaltenen Ergebnisse kann festgestellt werden, dass eine Modifizierung von MPC und M/MPC stattgefunden hat (siehe Abb. E.22 A). Die daraus resultierende Änderung im Migrationsverhalten der modifizierten Proteine fällt aufgrund der niedrigen Masse von AMS allerdings nur sehr gering aus. Die Modifizierung von M/MPC ist hier zudem aufgrund der diffus erscheinenden Banden nicht eindeutig erkennbar. Um eine bessere Differenzierbarkeit zwischen modifiziertem und unmodifiziertem Protein zu ermöglichen, wurden verschiedene Faktoren überprüft und so festgestellt, dass die Modifizierung optimalerweise für mindestens 30 Minuten durchgeführt wird, und die Elektrophorese in einem isokratischen SDS-Gel mit 12.5% Acrylamid erfolgt (siehe Abb. E.22 B,C). Bei dieser Gelkonzentration wird das insgesamt beste Verhältnis zwischen Fokussierung und Separation der einzelnen Proteinbanden erzielt. Durch eine auf bis zu 60 Minuten verlängerte Inkubationszeit kann keine effektivere Modifizierung erreicht werden, und die Erhöhung der AMS-Konzentration von 0,5 auf 1 mM bewirkt vor allem eine effizientere Modifizierung des Vorläuferproteins M/MPC, wohingegen das prozessierte Protein nur geringfügig effizienter modifiziert wird.

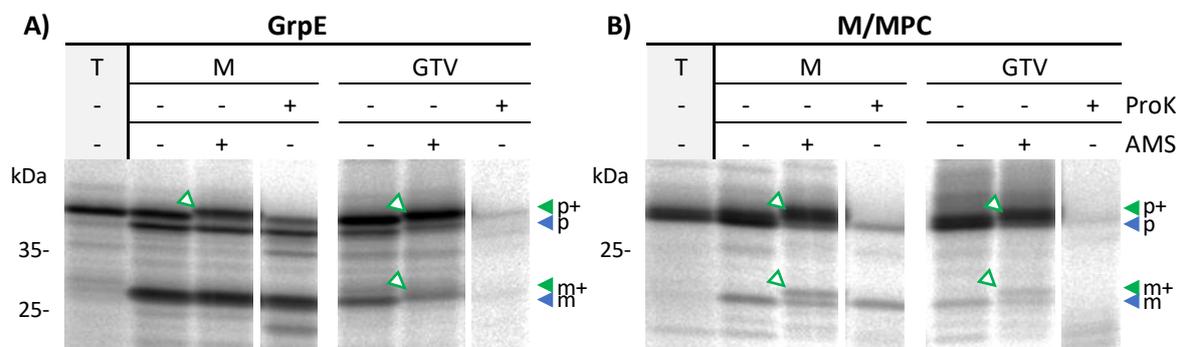


**Abb. E.22: Kontrolle der Cystein-Modifizierung von *in vitro*-translatiertem MPC und M/MPC durch AMS, sowie mögliche Anpassungen zur besseren Differenzierbarkeit modifizierter und unmodifizierter Proteine.** **A** Um die Effizienz der MPC- bzw. M/MPC-Modifizierung durch AMS und deren Auswirkungen auf das Laufverhalten der modifizierten Proteine zu überprüfen, wurden die entsprechenden, radioaktiv markierten *in vitro*-Translationsprodukte (T) mit 500  $\mu$ M AMS inkubiert. Die in den Proben enthaltenen Proteine wurden nach erfolgter Inkubation mittels TCA-Präzipitation ausgefällt, denaturiert und in einem 10-17,5 %igen SDS-PA-Gradientengel separiert. Das anschließend getrocknete Gel diente der autoradiographischen Detektion der radioaktiv markierten Proteine. Gekennzeichnet sind die Banden auf Laufhöhe der jeweiligen Translationsprodukte mit ( $\blacktriangleleft$  m+,  $\blacktriangleleft$  p+) und ohne ( $\blacktriangleleft$  m,  $\blacktriangleleft$  p) Modifizierung durch AMS. **B/C** Das radioaktiv markierte mtRieske-Konstrukt M/MPC wurde zunächst mit Mitochondrien (M) unter Proteintransport-Bedingungen inkubiert und nach Abstoppen des Proteintransportes durch Zugabe von 1  $\mu$ M Valinomycin und 100  $\mu$ M CCCP in 1x IP inklusive 0,5 oder 1 mM AMS re-isoliert. Die Cystein-Modifizierung erfolgte für 30, 45 oder 60 min. Als Kontrolle (K) wurden Mitochondrien in 1x IP (ohne AMS) re-isoliert. Nach erfolgter Inkubation wurden die in allen Ansätzen enthaltenen Proteine denaturiert und in einem **B** 12,5 %igen oder **C** 10 %igen SDS-PA-Gel separiert. Die anschließend getrockneten Gele dienten der autoradiographischen Detektion der radioaktiv markierten Proteine. Gekennzeichnet sind die Banden auf Laufhöhe des M/MPC-Vorläuferproteins mit ( $\blacktriangleleft$  p+) und ohne ( $\blacktriangleleft$  p) Modifizierung durch AMS, und des mitochondrialen Prozessierungsproduktes mit ( $\blacktriangleleft$  m+) und ohne ( $\blacktriangleleft$  m) Modifizierung durch AMS. Die Referenzwerte des verwendeten Größenstandards sind links in kDa angegeben.

### b) Kontrollversuche zur Bestimmung der Membrantopologie importierter Proteine

Erneut wurden M/MPC sowie GrpE (als matrixlokalisierte Negativkontrolle) genutzt, um AMS als geeignetes Reagenz für Proteinexportanalysen zu überprüfen. Als Positivkontrolle wurden die genannten Substrate außerdem mit präparierten GTV inkubiert, um das jeweilige Prozessierungsprodukt auf der Außenseite der Membran für AMS und Proteasen zu exponieren. Wie in Abbildung E.23 zu sehen, ist das zugesetzte AMS dazu in der Lage, die getesteten Vorläuferproteine in allen Ansätzen effizient zu modifizieren, was in einer leichten, aber dennoch gut sichtbaren Verschiebung der entsprechenden Banden resultiert. Das reife GrpE kann lediglich in den GTV-Fractionen modifiziert werden, nicht jedoch in den Mitochondrien-Fractionen (siehe Abb. E.23 A). Auch die zugesetzte Protease kann nur im Falle der GTV das reife GrpE abbauen, während das Prozessierungsprodukt in den Mitochondrien-Fractionen unbeeinflusst bleibt. Dies deutet darauf hin, dass GrpE nach einem Import in die mitochondriale Matrix nicht nur vor der extern zugefügten Protease, sondern auch vor einer Modifizierung durch AMS geschützt ist. AMS scheint demnach nicht

in die Matrix intakter Mitochondrien zu gelangen. Trotzdem kann das in Mitochondrien entstehende Prozessierungsprodukt von M/MPC durch AMS modifiziert werden (siehe Abb. E.23 B). Da das Prozessierungsprodukt jedoch nicht von der zugesetzten Protease degradiert wird, ist das reife Protein mindestens durch die äußere Hüllmembran geschützt. Eine Modifizierung des reifen Proteins, sowie dessen Abbau durch die zugeführte Protease, ist auch nach erfolgter Inkubation von M/MPC mit invertierten Vesikeln erkennbar.

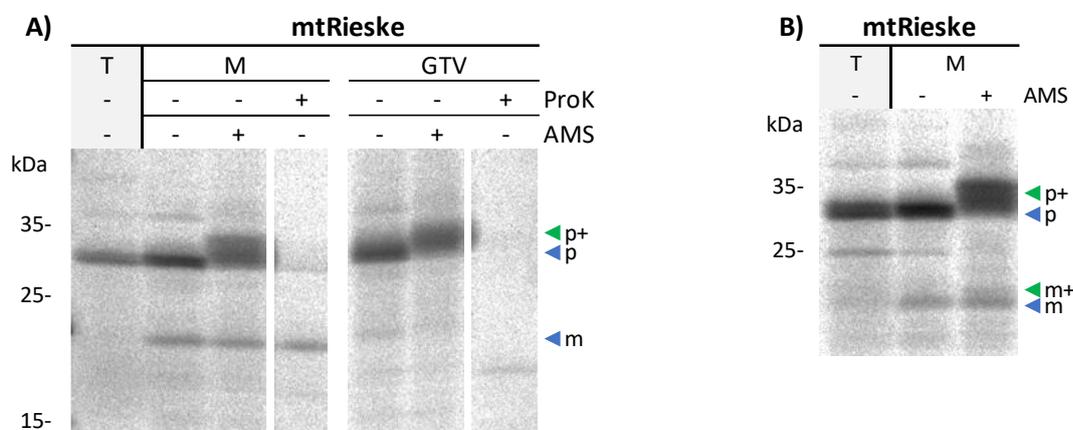


**Abb. E.23: Überprüfung von AMS als geeignetes Reagenz zur Topologie-Bestimmung importierter Proteine.**

Um die Eignung von AMS zur Topologie-Bestimmung der von isolierten Mitochondrien importierten und potentiell re-exportierten Proteine zu überprüfen, wurden isolierte Mitochondrien (M) zunächst mit radioaktiv markierten Vorläuferproteinen (**A** GrpE, **B** M/MPC) und anschließend zur Cystein-Modifizierung mit AMS inkubiert. Einem weiteren Ansatz wurde Protease zugegeben, um die innermitochondriale Lokalisation der getesteten Proteine zu bestätigen. Zur Modifizierungskontrolle mitochondrial prozessierter Proteine wurden beide Substrate zusätzlich mit invertierten Vesikeln (GTV) und anschließend mit AMS inkubiert, da invertierte Vesikel die zugegebenen Substrate im Umgebungsmedium prozessieren (siehe Abb. E.11), und diese dort folglich für eine Modifizierung zugänglich sein sollten. Nach erfolgter Inkubation von Mitochondrien bzw. GTV mit den jeweiligen Substraten wurden alle Ansätze in drei gleiche Proben geteilt, wobei jeweils eine Probe in 1x IP, eine weitere in 1x IP inklusive 500  $\mu$ M AMS und die dritte in 1x IP inklusive 0,02 % Proteinase K re-isoliert und inkubiert wurde (angezeigt durch -/+ AMS bzw. ProK). Anschließend wurden die in den Proben enthaltenen Proteine denaturiert und in einem 12,5%igen SDS-PA-Gel separiert. Die anschließend getrockneten Gele dienten der autoradiographischen Detektion der radioaktiv markierten Proteine. **A** Mithilfe von GrpE wurde getestet, ob matrixlokalisierte Prozessierungsprodukte wie erwartet unmodifiziert bleiben. **B** Für M/MPC wurde hingegen, im Falle eines Re-Exportes nach erfolgter Prozessierung, eine Modifizierung des reifen Proteins (im Intermembranraum) erwartet. Zur Kontrolle der eingesetzten Substrate wurden die entsprechenden *in vitro*-Translationsprodukte (T) auch ohne Zugabe von Mitochondrien bzw. GTV überprüft. Gekennzeichnet sind die Banden auf Laufhöhe der jeweiligen Vorläuferproteine mit ( $\blacktriangleleft$  p+ bzw.  $\triangleleft$ ) und ohne ( $\blacktriangleleft$  p) Modifizierung durch AMS, sowie der mitochondrialen Prozessierungsprodukte mit ( $\blacktriangleleft$  m+ bzw.  $\triangleleft$ ) und ohne ( $\blacktriangleleft$  m) Modifizierung durch AMS. Die Referenzwerte des verwendeten Größenstandards sind jeweils links in kDa angegeben. Weiße Lücken in den Abbildungen verdeutlichen, dass dort verschiedene Bereiche des gleichen Gelbildes zusammengefügt wurden.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass M/MPC zunächst in die isolierten Mitochondrien importiert, und der C-Terminus nach erfolgter Prozessierung in den Intermembranraum re-exportiert wird. Dort kann zwar eine Cystein-Modifizierung mittels AMS erfolgen, eine Protease erreicht das reife Protein allerdings nicht.

Die erzielten Resultate wurden im Anschluss am mtRieske-Protein überprüft. Dieses besitzt insgesamt vier Cysteinreste, die potentiell durch AMS modifiziert werden könnten. Bei der Modifizierung des Vorläuferproteins kommt es zu einem sehr diffus erscheinenden Signal, vermutlich aufgrund der Überlagerung mehrerer Banden, die eventuell dem Vorläuferprotein mit einem bis vier gebundenen AMS-Molekülen entsprechen (siehe Abb. E.24). Das reife Protein bleibt hingegen meist unmodifiziert und kann auch von der Protease nicht abgebaut werden (siehe Abb. E.24 A). In weiteren Versuchen konnte jedoch auch eine schwache Modifizierung des reifen mtRieske nach einem Import in Mitochondrien beobachtet werden (siehe Abb. E.24 B). Bei Inkubation von mtRieske mit invertierten Vesikeln kann nur eine geringe Menge reifes Protein detektiert werden. Die Bande des reifen Proteins ist nach Zugabe von AMS allerdings zu schwach, um eine eindeutige Aussage über eine potentielle Modifizierung treffen zu können (siehe Abb. E.24 A). Eine Degradierung durch die extern zugefügte Protease findet jedoch zweifelsfrei statt. Eine mögliche Erklärung, weshalb das reife mtRieske in



**Abb. E.24: Import von mtRieske und anschließende Topologie-Bestimmung mittels Cystein-Modifizierung durch AMS.**

**A** und **B** zeigen zwei unterschiedliche Ergebnisse eines vergleichbaren Versuchs. Um die Eignung von AMS zur Topologie-Bestimmung des authentischen mtRieske-Proteins nach dessen Import und potentiellm Re-Export in isolierten Mitochondrien (M) zu überprüfen, wurden diese zunächst mit dem radioaktiv markierten mtRieske-Vorläuferprotein und anschließend zur Cystein-Modifizierung mit AMS inkubiert. Gegebenenfalls wurde einem weiteren Ansatz eine Protease zugegeben, um die innermitochondriale Lokalisation von mtRieske zu bestätigen. Zur Modifizierungskontrolle des reifen mtRieske wurde das Substrat zusätzlich mit invertierten Vesikeln (GTV) und anschließend mit AMS inkubiert, da invertierte Vesikel die zugegebenen Substrate im Umgebungsmedium prozessieren (siehe Abb. E.9, E.11), und diese dort folglich für eine Modifizierung zugänglich sein sollten. Nach erfolgter Inkubation von Mitochondrien bzw. GTV mit den jeweiligen Substraten wurden alle Ansätze in **A** drei bzw. **B** zwei gleiche Proben geteilt, wobei jeweils eine Probe in 1x IP, eine weitere in 1x IP inklusive 500  $\mu$ M AMS und eine (im Falle von **A**) dritte in 1x IP inklusive 0,02 % Proteinase K re-isoliert und inkubiert wurde (angezeigt durch -/+ AMS bzw. ProK). Anschließend wurden die in den Proben enthaltenen Proteine denaturiert und in einem 12,5 %igen SDS-PA-Gel separiert. Die anschließend getrockneten Gele dienten der autoradiographischen Detektion der radioaktiv markierten Proteine. Für mtRieske wurde, im Falle eines Re-Exportes nach erfolgter Prozessierung, eine Modifizierung des reifen Proteins (im Intermembranraum) erwartet. Zur Kontrolle der eingesetzten Substrate wurden die entsprechenden *in vitro*-Translationsprodukte (T) auch ohne Zugabe von Mitochondrien bzw. GTV überprüft. Gekennzeichnet sind die Banden auf Laufhöhe der jeweiligen Vorläuferproteine mit ( $\blacktriangleleft$  p+) und ohne ( $\blacktriangleleft$  p) Modifizierung durch AMS, sowie der mitochondrialen Prozessierungsprodukte mit ( $\blacktriangleleft$  m+) und ohne ( $\blacktriangleleft$  m) Modifizierung durch AMS. Die Referenzwerte des verwendeten Größenstandards sind jeweils links in kDa angegeben. Weiße Lücken in den Abbildungen verdeutlichen, dass dort verschiedene Bereiche des gleichen Gelbildes zusammengefügt wurden.

intakten Mitochondrien nicht zuverlässig von AMS modifiziert werden konnte, ist die Bindung des [2Fe-2S]-Clusters, dessen Assemblierung vor der Proteinfaltung vermutlich in der Matrix abläuft (Lill und Mühlenhoff, 2006, Mühlenhoff *et al.*, 2011). Zwei der vier Cysteinreste (C159 und C178) sind im reifen Protein aktiv an der Bindung dieses Cofaktors beteiligt (Schmidt und Shaw, 2001, Valer *et al.*, 2022) und somit vermutlich durch AMS nicht effizient modifizierbar, während die zwei weiteren Cysteine (C164 und C180) sich ebenfalls im gefalteten C-Terminus des reifen Proteins befinden und daher möglicherweise auch nur schwer zugänglich sind.

Anhand der hier durchgeführten Kontrollen konnte bisher gezeigt werden, dass das potentielle mtTat-Substrat M/MPC sowie mtRieske nach deren Import in die mitochondriale Matrix und der dort ablaufenden Prozessierung durch äußerlich zugegebenes AMS modifiziert werden können. Da AMS, wie am matrixlokalisierten GrpE überprüft, nicht in die Matrix intakter Mitochondrien diffundiert, müssen die in M/MPC und mtRieske C-terminal lokalisierten Cysteinreste stattdessen wieder aus der Matrix auf die zum Intermembranraum gewandten Membranseite gelangt sein. Dies geschieht vermutlich über einen Re-Export der C-terminalen Proteinbereiche mittels mtTat-Translokase. Die Modifizierung von mtRieske durch AMS ist im Vergleich zu M/MPC nicht sehr zuverlässig und wird vermutlich durch die Bindung des [2Fe-2S]-Clusters beeinträchtigt.

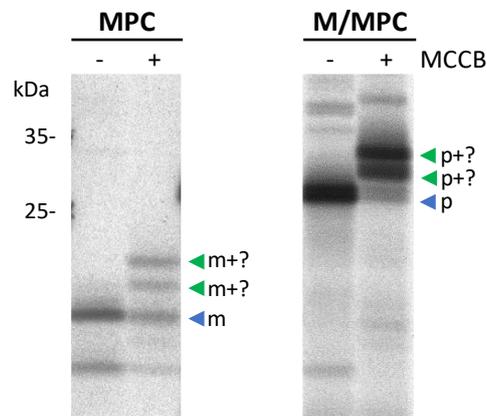
### 3.1.2.3. MCCB

Da die Modifizierung von Proteinen mit AMS nur zu einer geringfügigen Änderung des Laufverhaltens führt, wurde nach einer Alternative gesucht, die die polaren Eigenschaften von AMS mit einem höheren Molekulargewicht verbindet. Durch die Veresterung von Sulfo-SMCC (Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat) mit dem Peptidhormon Bradykinin mittels N-Hydroxysuccinimid (NHS), konnte Dr. Mario Jakob (AG Prof. Klösgen) ein polares Thiol-reaktives Reagenz mit einem Molekulargewicht von ca. 1,2 kDa synthetisieren, welches im Folgenden als MCCB (4-(N-Maleinimidomethyl)-cyclohexan-1-carbonsäurebradykininester) bezeichnet wird.

#### a) Modifizierungskontrolle mit *in vitro*-Translationsprodukten

Mittels Inkubation der Translationsprodukte von M/MPC bzw. MPC zusammen mit MCCB wurden zunächst dessen Modifizierungseigenschaften überprüft. Sowohl M/MPC als auch MPC lassen sich recht effizient durch MCCB modifizieren und ändern dadurch ihr Laufverhalten in der Gelelektrophorese (siehe Abb. E.25). Hierbei fällt auf, dass die Modifizierung durch das im Vergleich zu AMS größere MCCB zu einer wie erhofft besseren Separation der unmodifizierten und modifizierten

Substrate führt. Allerdings entstehen für MPC und M/MPC jeweils zwei neue Banden, die vermutlich auf eine Modifizierung weiterer Translationsprodukte durch MCCB oder auf Spaltprodukte zurückzuführen sind. Da MPC bzw. M/MPC je nur einen Cysteinrest besitzen und MCCB keine Möglichkeit zur Selbstmodifizierung hat, kann die zweite auftretende Bande allerdings bisher nicht eindeutig erklärt werden.

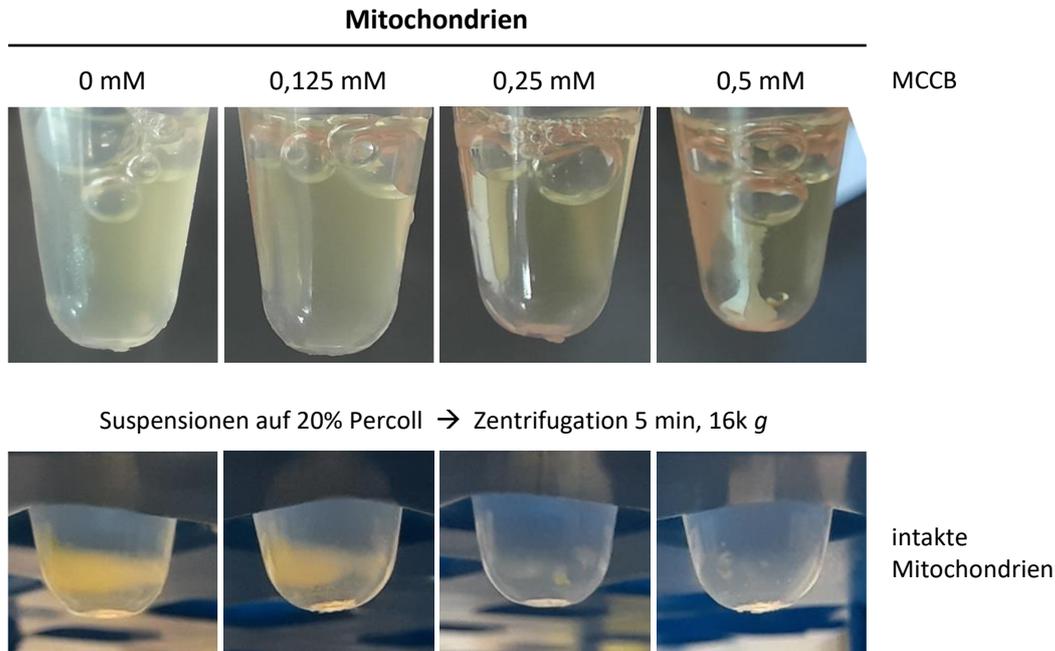


**Abb. E.25: Kontrolle der Cystein-Modifizierung von *in vitro*-translatiertem MPC und M/MPC durch MCCB.**

Um die Effizienz der MPC- bzw. M/MPC-Modifizierung durch MCCB und deren Auswirkungen auf das Laufverhalten der modifizierten Proteine zu überprüfen, wurden die entsprechenden, radioaktiv markierten *in vitro*-Translationsprodukte mit 500  $\mu$ M MCCB inkubiert. Die in den Proben enthaltenen Proteine wurden nach erfolgter Inkubation mittels TCA-Präzipitation ausgefällt, denaturiert und in einem 10-17,5%igen SDS-PA-Gradientengel separiert. Das anschließend getrocknete Gel diente der autoradiographischen Detektion der radioaktiv markierten Proteine. Gekennzeichnet sind die Banden auf Laufhöhe der jeweiligen Translationsprodukte mit ( $\blacktriangleleft$  m+?,  $\blacktriangleleft$  p+?) und ohne ( $\blacktriangleleft$  m,  $\blacktriangleleft$  p) Modifizierung durch MCCB. Die Referenzwerte des verwendeten Größenstandards sind links in kDa angegeben.

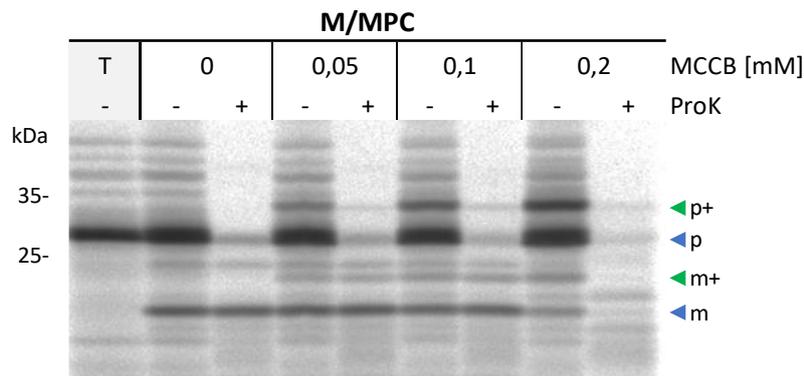
## b) MCCB als Alternative zu AMS: Vor- und Nachteile

Wird nun nach dem erfolgten Import von M/MPC in isolierte Mitochondrien das Reagenz MCCB zur Cystein-Modifizierung zum Ansatz hinzugegeben, ist bei einer Konzentration von 0,5 mM (die in dieser Arbeit standardmäßig für AMS und MalPEG genutzte Konzentration) eine Lyse der Mitochondrien zu beobachten. Dies äußert sich im Aufklaren der üblicherweise durch die vorhandenen Mitochondrien trüb erscheinende Suspension (siehe Abb. E.26). Zudem können anschließend kaum intakte Mitochondrien durch differentielle und Dichtegradienten-Zentrifugation re-isoliert werden. Die Untersuchung des Re-Exportes von M/MPC bei MCCB-Konzentrationen von 0,05 bis 0,2 mM zeigen allerdings, dass die Modifizierung des prozessierten Proteins bis zu einer Konzentration von 0,2 mM möglich und gut erkennbar ist (siehe Abb. E.27). Im Gegensatz zu den Modifizierungskontrollen in Abbildung E.25 tritt die Modifizierung in Anwesenheit von Mitochondrien in jeweils nur einer weiteren



**Abb. E.26: Lyse isolierter Mitochondrien bei steigender MCCB-Konzentration.**

Gleiche Mengen sedimentierte Mitochondrien wurden in 1x IP inklusive MCCB in unterschiedlichen Konzentrationen re-suspendiert. Nach kurzer Inkubationszeit konnte eine Verringerung im Trübungsgrad der Suspension mit steigender MCCB-Konzentration beobachtet werden. Die Intaktheit der in der Suspension befindlichen Mitochondrien wurde durch eine anschließende Dichtezentrifugation überprüft. Hierzu wurden die jeweiligen Suspensionen auf 1x SRM inklusive 20 % Percoll aufgeschichtet und bei 16k g zentrifugiert. Intakte Mitochondrien, mit einer entsprechend höheren Dichte als lysierte Organellen, gelangen während der Zentrifugation durch die Percollphase und sammeln sich im unteren Bereich der Probe.



**Abb. E.27: Überprüfung von MCCB als geeignetes Reagenz zur Topologie-Bestimmung von importiertem M/MPC und Kontrolle der kritischen MCCB-Konzentration.**

Um die Eignung von MCCB zur Topologie-Bestimmung des von isolierten Mitochondrien importierten und potentiell re-exportierten M/MPC zu überprüfen, wurden isolierte Mitochondrien (M) zunächst mit dem radioaktiv markierten Vorläuferprotein und anschließend zur Cystein-Modifizierung mit MCCB inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in vier gleiche Proben geteilt, und die darin enthaltenen Mitochondrien in 1x IP inklusive 0,05 mM, 0,1 mM, 0,2 mM MCCB bzw. ohne MCCB als Kontrolle re-isoliert und zur Cystein-Modifizierung inkubiert. Anschließend wurden alle Proben nochmals halbiert, wobei jeweils einer Probe 0,02 % Proteinase K zugegeben wurde (-/+ ProK). Anschließend wurden die in den Proben enthaltenen Proteine denaturiert und in einem 10-17,5 %igen SDS-PA-Gradientengel separiert. Die anschließend getrockneten Gele dienten der autoradiographischen Detektion der radioaktiv markierten Proteine. Zur Kontrolle des eingesetzten *in vitro*-Translationsproduktes (T) wurde dieses auch ohne Zugabe von Mitochondrien überprüft. Gekennzeichnet sind die Banden auf Laufhöhe des M/MPC-Vorläuferproteins mit (◀ p+) und ohne (◀ p) Modifizierung durch MCCB, sowie des mitochondrialen Prozessierungsproduktes mit (◀ m+) und ohne (◀ m) Modifizierung durch MCCB. Die Referenzwerte des verwendeten Größenstandards sind links in kDa angegeben.

Bande für Vorläuferprotein und Prozessierungsprodukt in Erscheinung, statt den zuvor beobachteten zwei Banden. Die Hüllmembranen scheinen ab einer MCCB-Konzentration zwischen 0,1 und 0,2 mM derartig beeinträchtigt zu sein, dass der Zusatz einer Protease zum Abbau eines Großteils der in der Probe vorhandenen Proteine führt. Aus diesem Grund wurde für weitere Experimente mit einer Konzentration von maximal 0,1 mM gearbeitet, um falsch-positive Modifizierungen aufgrund geschädigter mitochondrialer Hüllmembranen zu vermeiden.

Mit MCCB konnten die zuvor mit AMS erzielten Ergebnisse eines Re-Exportes von M/MPC nach dessen Prozessierung in der Matrix nochmals bestätigt werden. Da die Thiol-reaktiven Reagenzien MCCB und AMS für Topologiestudien mittels Cystein-Modifizierung geeignet sind, wurde der Re-Export mitochondrialer Tat-Substrate anhand isolierter Mitochondrien auf diese Weise eingehender untersucht.

## **3.2. Charakterisierung der pflanzlichen mtTat-Translokase**

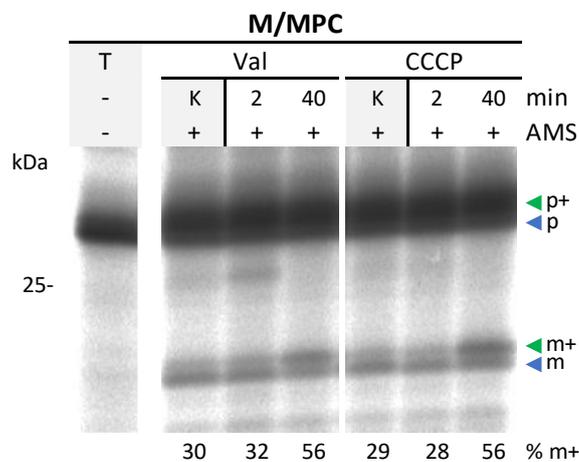
Bisher ist nur wenig über die Eigenschaften der mitochondrialen Tat-Translokase in Pflanzen bekannt. Wie zuvor in Kapitel 3.1.2 beschrieben, konnte eine Methode zur Analyse der mitochondrialen Tat-Translokase an isolierten Mitochondrien anhand der Modifizierung transportierter mtTat-Substrate etabliert werden. Die dort beschriebenen Vorversuche haben zudem bereits gezeigt, dass radioaktiv markierte mtTat-Substrate nach dessen Import in Mitochondrien einerseits in der Matrix prozessiert werden, und dass andererseits der Re-Export der Prozessierungsprodukte in den Intermembranraum nachverfolgt werden kann (siehe Abb. E.23, E.27). Dies geschieht über die AMS- bzw. MCCB-vermittelte Modifizierung von Cysteinresten, anhand derer sich die Membranproteintopologie der eingesetzten Substrate untersuchen lässt. Im folgenden Kapitel wird unter anderem die beschriebene Cystein-Modifizierung genutzt, um die mitochondriale Tat-Translokase und den von ihr durchgeführten Translokationsprozess genauer zu charakterisieren.

### **3.2.1. Energetisierung der Translokation**

Ob es sich bei der Energiequelle zur mtTat-Translokation um die protonenmotorische Kraft (PMK) handelt, wurde über den Einfluss spezifischer Inhibitoren getestet. Hier verwendet wurden Valinomycin, ein für Kalium selektiver Ionophor, und Carbonylcyanid-*m*-chlorphenylhydrazon (CCCP), ein Protonophor, welches als Entkoppler die oxidative Phosphorylierung hemmt. Beide Reagenzien wirken sich inhibierend auf die PMK, also den Protonengradienten und den elektrochemischen

Gradienten, der inneren Hüllmembran aus. Um den Einfluss dieser Inhibitoren auf den Re-Export zu testen, wurden *in vitro*-Proteintransportansätze für insgesamt 40 Minuten zur Proteintranslokation inkubiert. Verschiedenen Ansätzen wurde zu Beginn (nach 2 Minuten) oder nach Ablauf der kompletten Inkubationszeit 1  $\mu$ M Valinomycin bzw. 100  $\mu$ M CCCP zugegeben. Kontrollfraktionen wurden ebenfalls nach 2 Minuten mit einem jeweiligen Inhibitor versetzt und anschließend bis zur weiteren Bearbeitung für 15 Minuten auf Eis gelagert, um einen Proteintransport zusätzlich zu minimieren. Der Re-Export der prozessierten Proteine wurde anschließend in allen Ansätzen mittels Cystein-Modifizierung durch AMS analysiert. Quantifiziert wurden jeweils die Signalintensitäten des modifizierten und unmodifizierten Prozessierungsproduktes, um anschließend den Anteil der Intensität des modifizierten Prozessierungsproduktes an der Gesamtintensität der Prozessierungsprodukte (modifiziert und unmodifiziert) zu berechnen.

In allen Ansätzen sind sowohl unmodifizierte als auch modifizierte Prozessierungsprodukte sichtbar (siehe Abb. E.28). Allerdings fallen bei einem Vergleich der zu einem frühen und zu einem späten



**Abb. E.28: Einfluss von Valinomycin und CCCP auf den mitochondrialen Re-Export von zuvor importiertem M/MPC.**

Um einen inhibitorischen Effekt von Valinomycin und CCCP auf den Re-Export von zuvor importiertem M/MPC zu überprüfen, wurden isolierte Mitochondrien für insgesamt 40 min mit radioaktiv markiertem M/MPC-Vorläuferprotein unter Transportbedingungen inkubiert. Nach jeweils 2 min und den kompletten 40 min Inkubationszeit wurde dem Transportansatz eine Probe entnommen, diese mit 1  $\mu$ M Valinomycin (Val) bzw. 100  $\mu$ M CCCP versetzt, und weiter unter Transportbedingungen bis Ablauf der insgesamt 40 min weiter inkubiert. Die Kontrollproben (K) wurden ebenfalls nach 2 min Inkubationszeit mit einem entsprechenden Inhibitor versetzt, allerdings anschließend bis zur weiteren Aufbereitung auf Eis gelagert, um zusätzlich einen Proteintransport zu minimieren. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Proben in 1x IP inklusive 0,5 mM AMS re-isoliert und zur Cystein-Modifizierung inkubiert. Zur Kontrolle des eingesetzten *in vitro*-Translationsproduktes (T) wurde dieses auch ohne Zugabe von Mitochondrien überprüft. Die in den Proben enthaltenen Proteine wurden anschließend denaturiert und in einem 12,5 %igen SDS-PA-Gel separiert. Das anschließend getrocknete Gel diente der autoradiographischen Detektion der radioaktiv markierten Proteine. Gekennzeichnet sind die Banden auf Laufhöhe des M/MPC-Vorläuferproteins mit (▶ p+) und ohne (▶ p) Modifizierung durch AMS, sowie des mitochondrialen Prozessierungsproduktes mit (▶ m+) und ohne (▶ m) Modifizierung durch AMS. Quantifiziert wurden jeweils die Signalintensitäten des modifizierten und unmodifizierten Prozessierungsproduktes, um anschließend den Anteil der Intensität des modifizierten Prozessierungsproduktes an der Gesamtintensität der Prozessierungsprodukte zu berechnen (% m+). Die Referenzwerte des verwendeten Größenstandards sind links in kDa angegeben. Weiße Lücken in den Abbildungen verdeutlichen, dass dort verschiedene Bereiche des gleichen Gelbildes zusammengefügt wurden.

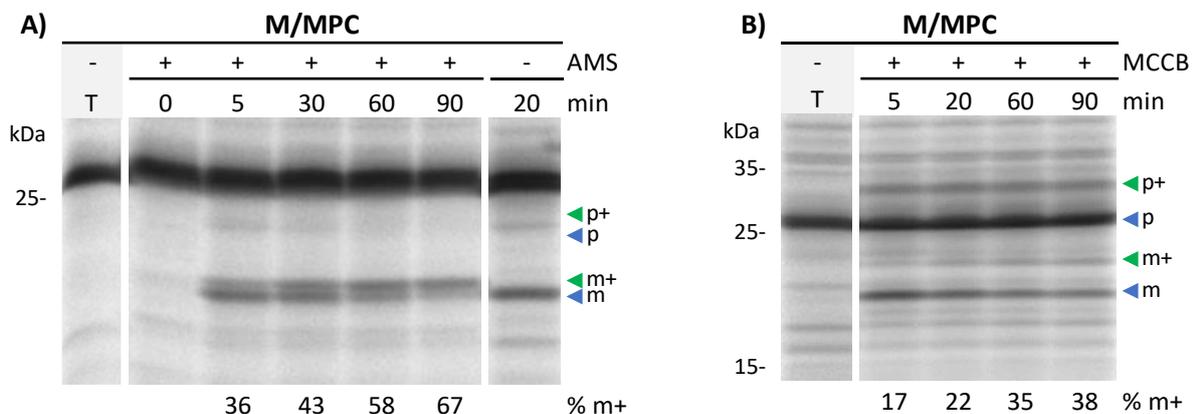
Zeitpunkt mit Inhibitor behandelten Fraktionen deutliche Unterschiede in der Verteilung zwischen modifizierten und unmodifizierten Proteinen auf. Ein wesentlich größerer Anteil der prozessierten Proteine kann von AMS modifiziert werden, wenn die jeweiligen Inhibitoren erst am Ende der Inkubationszeit zugegeben werden (ca. 50 % modifiziert). Im Gegensatz dazu führt eine frühe Zugabe der einzelnen Inhibitoren zu einem höheren Anteil unmodifizierten Proteins und deutlich weniger modifiziertem Protein (ca. 30 % modifiziert). Dabei spielt es anscheinend keine Rolle, ob die Proben anschließend weiter im Wasserbad oder auf Eis inkubieren, da es keine erkennbaren Unterschiede im Anteil modifizierter Proteine gibt. Bei den zwei getesteten Ionophoren Valinomycin und CCCP gibt es ebenfalls keine deutlichen Unterschiede in der Verteilung zwischen modifiziertem zu nicht modifiziertem Protein.

Beide Reagenzien führen folglich zu einer Hemmung der PMK, was sich gleichermaßen in einer verringerten Re-Exporteffizienz widerspiegelt. Der inhibitorische Effekt beider Ionophore scheint den Proteintransport nahezu komplett zu unterdrücken, da behandelte Mitochondrien im Wasserbad etwa die gleiche Menge prozessiertes (also importiertes) und modifiziertes (also re-exportiertes) Protein aufweisen wie die Mitochondrien auf Eis. Der in den frühzeitig mit Inhibitor behandelten Fraktionen ablaufende Re-Export findet mit großer Wahrscheinlichkeit bereits innerhalb der 2 Minuten Inkubationszeit statt, in denen noch kein Inhibitor im Ansatz vorhanden ist. Würde der Inhibitor allerdings bereits vor Beginn der Reaktion zugesetzt werden, könnte der Import und damit folglich indirekt kein Re-Export mehr stattfinden. Der direkte Einfluss der Inhibitoren auf den Re-Export könnte auf diese Weise demnach nicht veranschaulicht werden.

### **3.2.2. Re-Export prozessierter Tat-Substrate im zeitlichen Verlauf**

Um zu untersuchen, mit welcher Geschwindigkeit importierte und prozessierte mtTat-Substrate exportiert werden, wurde einem Importansatz zu verschiedenen Zeitpunkten (zwischen 0 und 90 Minuten) Proben entnommen, und diese mittels Cystein-Modifizierung analysiert. Um zu verhindern, dass Vorläuferproteine erst modifiziert und anschließend importiert und re-exportiert werden können, muss vor Zugabe der Thiol-reaktiven Reagenzien der Proteintransport abgestoppt werden. Dies erfolgte durch die Inkubation der Probe zusammen mit den zuvor getesteten Inhibitoren (siehe Kap. 3.2.1.1). Anschließend wurden die Organellen in Puffer inklusive AMS bzw. MCCB re-isoliert. Quantifiziert wurden erneut die jeweiligen Signalintensitäten des modifizierten und unmodifizierten Prozessierungsproduktes, und anschließend erfolgte die Berechnung der anteiligen Intensität des modifizierten Prozessierungsproduktes an der Gesamtintensität der Prozessierungsprodukte (modifiziert und unmodifiziert).

Wird der Proteintransport direkt von Beginn an (nach 0 Minuten) abgestoppt, kann kein Import stattfinden und somit kein Prozessierungsprodukt detektiert werden, da der Import von Vorläuferproteinen ebenfalls von der PMK abhängt (siehe Abb. E.29 A). Daher wird hier lediglich das Vorläuferprotein vom zugesetzten AMS modifiziert. In allen weiteren Ansätzen mit einer Transportzeit von mindestens 5 Minuten wird das Vorläuferprotein ähnlich effizient importiert und prozessiert. Zudem kann in all diesen Ansätzen durch die Cystein-Modifizierung festgestellt werden, dass ein Re-Export der prozessierten Proteine stattfindet. Hierbei fällt deutlich auf, dass der Anteil an modifiziertem Protein mit längerer Transportzeit zunimmt, was sich in einer schrittweisen Verschiebung des Prozessierungsproduktes von überwiegend unmodifiziert (ca. 36 % modifiziert nach 5 Minuten) zu überwiegend modifiziert (ca. 67 % nach 90 Minuten) äußert. Allerdings kann innerhalb von 90 Minuten nicht die gesamte Menge an prozessiertem Protein re-exportiert werden, da weiterhin etwa ein Drittel unmodifiziert vorliegt und sich demnach mindestens mit dem C-Terminus auf der Matrixseite der Membran befindet. Die Importkontrolle von M/MPC ohne AMS-Behandlung zeigt nochmal sehr deutlich, dass das importierte und prozessierte M/MPC ein anderes Migrationsverhalten



**Abb. E.29: Proteintransport-Zeitreihe und Cystein-Modifizierung zur Untersuchung des Re-Exportes von M/MPC im zeitlichen Verlauf.** Um den Re-Export von importiertem und prozessiertem M/MPC im zeitlichen Verlauf zu untersuchen, wurde zunächst das radioaktiv markierte Vorläuferprotein mit isolierten Mitochondrien unter Transportbedingungen inkubiert. Den jeweiligen Ansätzen wurde dann nach **A** 0, 5, 20, 30, 60 oder 90 min bzw. **B** 5, 20, 60 oder 90 min eine Probe entnommen und diese mit 1  $\mu$ M Valinomycin und 100  $\mu$ M CCCP versetzt, um den Proteintransport abzustoppen. Anschließend wurden die in den Proben enthaltenen Mitochondrien in 1x IP inklusive **A** 0,5 mM AMS (mit Ausnahme des 20 min-Ansatzes) bzw. **B** 0,1 mM MCCB re-isoliert und zur Cystein-Modifizierung inkubiert. Zur Kontrolle des eingesetzten *in vitro*-Translationsproduktes (T) wurde dieses auch ohne Zugabe von Mitochondrien überprüft. Die in den Proben enthaltenen Proteine wurden anschließend denaturiert und in einem **A** 12,5 %igen SDS-PA-Gel bzw. **B** 10-17,5 %igen SDS-PA-Gradientengel separiert. Die anschließend getrockneten Gele dienen der autoradiographischen Detektion der radioaktiv markierten Proteine. Gekennzeichnet sind die Banden auf Laufhöhe des M/MPC-Vorläuferproteins mit ( $\blacktriangleleft$  p+) und ohne ( $\blacktriangleleft$  p) Modifizierung durch AMS bzw. MCCB, sowie des mitochondrialen Prozessierungsproduktes mit ( $\blacktriangleleft$  m+) und ohne ( $\blacktriangleleft$  m) Modifizierung durch AMS bzw. MCCB. Quantifiziert wurden jeweils die Signalintensitäten des modifizierten und unmodifizierten Prozessierungsproduktes, um anschließend den Anteil der Intensität des modifizierten Prozessierungsproduktes an der Gesamtintensität der Prozessierungsprodukte zu berechnen (% m+). Die Referenzwerte des verwendeten Größenstandards sind jeweils links in kDa angegeben. Weiße Lücken in den Abbildungen verdeutlichen, dass dort verschiedene Bereiche des gleichen Gelbildes zusammengefügt wurden.

in der SDS-PAGE zeigt als das prozessierte Protein nach Modifizierung mit AMS, wie nach 90 Minuten Import und anschließender AMS-Behandlung zu sehen ist. Wird nun MCCB zur Cystein-Modifizierung verwendet, fällt ein ähnlicher Zusammenhang zwischen dem Anteil modifizierter Prozessierungsprodukte und der Transportzeit auf (siehe Abb. E.29 B). Allerdings werden mit MCCB generell geringere Mengen des Prozessierungsproduktes modifiziert. Nach 5 Minuten sind es lediglich ca. 17 % und maximal können nach 90 Minuten ca. 38 % des Prozessierungsproduktes modifiziert werden, zudem gibt es zwischen 60 und 90 Minuten Transport nur noch eine Steigerung um etwa 3 %. Die Ergebnisse der Cystein-Modifizierung zu verschiedenen Zeitpunkten der Transportreaktion deuten darauf hin, dass auf den raschen Import der potentiellen Tat-Substrate und deren Prozessierung in der Matrix ein vergleichsweise langsamer Re-Export dieser Substrate in den Intermembranraum erfolgt, da auch nach 90 Minuten noch etwa ein Drittel der prozessierten Proteine unmodifiziert vorliegt. Die zeitliche Abhängigkeit dieser Translokation kann sowohl mit AMS als auch mit MCCB, wenn auch weniger effizient, nachverfolgt werden.

### **3.2.3. Mitochondrial lokalisiertes TatA**

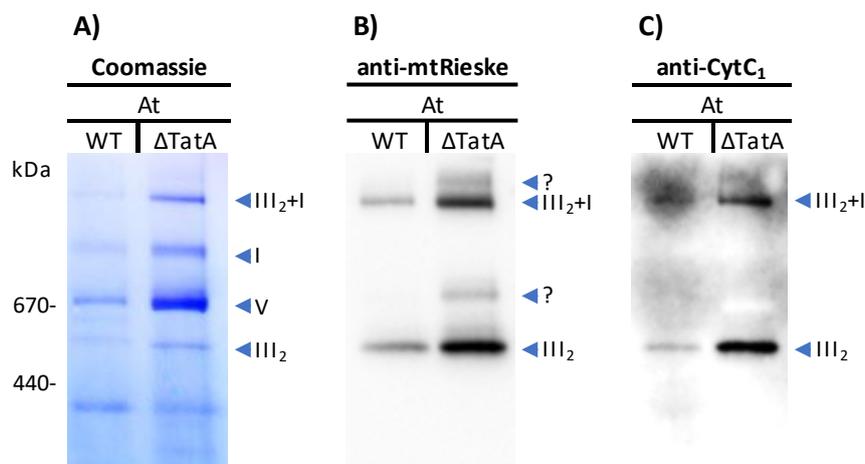
Für das kernkodierte TatA in Pflanzen konnte zwar vor kurzem nachgewiesen werden, dass es dual-lokalisiert ist und in beide endosymbiontischen Organellen importiert wird (Bennewitz *et al.*, 2020), über eine mitochondriale Funktion von TatA gab es bisher jedoch keinerlei Hinweise. Deshalb war es das Ziel, eine Beteiligung von TatA an der mitochondrialen Tat-Translokation genauer zu untersuchen.

#### **3.2.3.1. Abwesenheit von mitochondrial lokalisiertem TatA**

Eine Möglichkeit um zu überprüfen, welche Auswirkungen das Fehlen von TatA in Mitochondrien auf die Funktion der mtTat-Translokase haben könnte, besteht im Einsatz von *TatA*-Deletionsmutanten. Der Arbeitsgruppe stehen bereits heterozygote *TatA*-Deletionsmutanten von *A. thaliana* zur Verfügung, welche im Rahmen der Dissertation von Dr. Mayank Sharma (AG Prof. Klösgen) mittels CRISPR/Cas-Methode generiert wurden (Dissertation Sharma, 2019). Die homozygote Deletion von *TatA* führt zu Albinismus, Zwergwuchs und der Letalität im frühen Keimlingsstadium. Bei einer Aufzucht der F2-Generation auf Saccharose-Platten, überleben die homozygoten Deletionsmutanten deutlich länger und entwickeln ausreichend Gewebematerial, um aus diesen nach Selektion und Vereinigung Mitochondrien zu isolieren. Mithilfe von Antikörpern gegen mtRieske wurde untersucht, ob sich diese Komplex III- Untereinheit auch in den *TatA*-Deletionsmutanten im Komplex III und den

Komplex III enthaltenden Superkomplexen detektieren lässt. Die mitochondrialen Membranproteinkomplexe wurden durch Zugabe von Digitonin solubilisiert und mittels *Blue Native*-Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE) voneinander separiert. Anschließend erfolgte der Transfer der Proteinkomplexe auf PVDF-Membranen, an welchen die Detektion verschiedener Proteine über spezifische Antikörper und eine nachfolgende ECL-Reaktion durchgeführt wurde.

Zunächst wurden die anti-mtRieske-Antikörper anhand isolierter Mitochondrien und Chloroplasten aus *A. thaliana* und *Pisum sativum* nach erfolgter Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE getestet und auf Spezifität und potentielle Kreuzreaktivität überprüft (siehe Anhang Abb. A.2). Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass die Antikörper gegen mtRieske mit chloroplastidären Proteinen, beispielsweise cpRieske, kreuzreagieren. Nach Auftrennung und Transfer der solubilierten Membrankomplexe aus *A. thaliana*-Wildtyp und *TatA*-Deletionsmutanten auf PVDF-Membranen, wurden diese für Coomassie®-Färbung und Antikörperdetektion genutzt. Da die Gesamtmenge der aus den Deletionsmutanten isolierten Mitochondrien für eine Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford nicht ausreichend war, wurde stattdessen über das eingesetzte Frischgewicht normalisiert. Die Coomassie®-Färbung der Membran gibt zu erkennen, dass im Vergleich zum Wildtyp insgesamt deutlich mehr Gesamtprotein in den Proben der Deletionsmutanten vorhanden ist (siehe Abb. E.30 A). Demnach lässt sich mehr Protein aus den Deletionsmutanten als aus der gleichen Menge Material vom Wildtyp extrahieren. Die gegen mtRieske gerichteten Antikörper detektieren zwei Proteinkomplexe in



**Abb. E.30: Immundetektion von mtRieske und Cytochrom  $c_1$  in mitochondrialen Proteinkomplexen aus Wildtyp und *TatA*-Deletionsmutanten von *A. thaliana*.** Aus 10 Tage alten *A. thaliana* (At) Wildtyppflanzen (WT) und *TatA*-Deletionsmutanten ( $\Delta$ TatA) wurden Mitochondrien isoliert und anschließend deren Membrankomplexe durch Inkubation mit 5 % Digitonin solubilisiert. Die Proteinkomplexe wurden in einem 4,5-16 %igen BN-PA-Gradientengel separiert und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Jede Gelspur enthält die solubilierten Membrankomplexe isolierter Mitochondrien aus ca. 200 mg Pflanzenmaterial. **A** Zur unspezifischen Proteinfärbung wurde die Membran für wenige Minuten in Coomassie®(R250)-Färbelösung inkubiert und der Hintergrund anschließend entfärbt. Die Immundetektion von **B** mtRieske und **C** Cytochrom  $c_1$  (CytC<sub>1</sub>) wurde über eine HRP-vermittelte ECL-Reaktion visualisiert. Detektiert wurden hierbei unter anderem der Komplex III-Dimer ( $\blacktriangleleft$  III<sub>2</sub>), Komplex V ( $\blacktriangleleft$  V), Komplex I ( $\blacktriangleleft$  I) und der Superkomplex aus dem Komplex III-Dimer und Komplex I ( $\blacktriangleleft$  III<sub>2</sub>+I). Die Referenzwerte des verwendeten Größenstandards sind links in kDa angegeben.

den Mitochondrien aus Wildtyp und insgesamt vier Komplexe, darunter die gleichen zwei im Wildtyp detektierten Komplexe, in den Mitochondrien der Deletionsmutanten (siehe Abb. E.30 B). Dass es sich bei den zwei in beiden Fraktionen detektierten Proteinkomplexen um Komplex III und einen Komplex III-beinhaltenen Superkomplex handelt, kann mithilfe von Antikörpern gegen Cytochrom  $c_1$ , einer weiteren Untereinheit von Komplex III, bestätigt werden, diese wird in den gleichen zwei Proteinkomplexen detektiert (siehe Abb. 32 E.30 C). Die insgesamt stärkeren Signale in den Proben der Deletionsmutanten können vermutlich mit der größeren Gesamtproteinmenge dieser Proben erklärt werden.

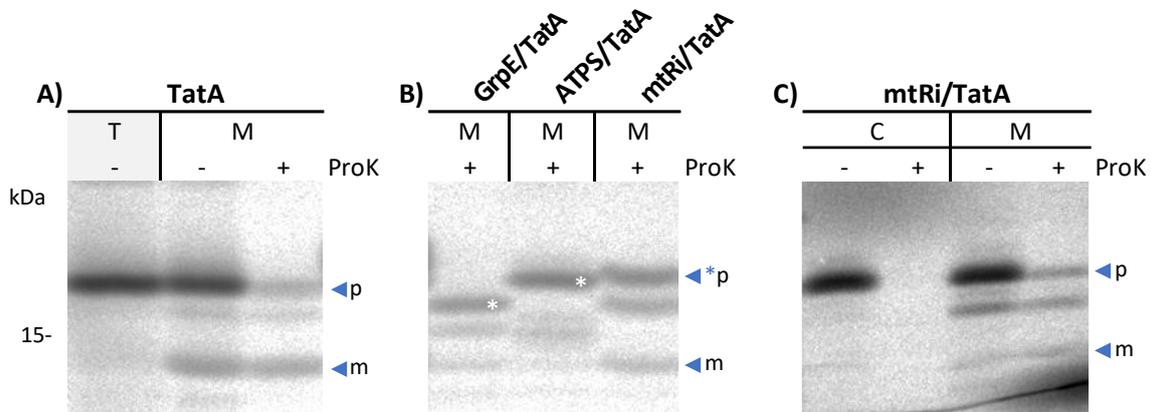
Der Nachweis von mtRieske in Komplex III der *TatA*-Deletionsmutante belegt, dass *TatA* für die Translokation von mtRieske und die Komplex III-Biogenese nicht essentiell ist.

### **3.2.3.2. Überschuss von mitochondrial lokalisiertem *TatA***

Die im vorangehenden Kapitel beschriebenen Ergebnisse deuten zwar darauf hin, dass *TatA* für eine Funktion der mitochondrialen *Tat*-Translokase nicht essentiell ist, allerdings stellt sich weiterhin die Frage, ob die Anwesenheit von *TatA* bzw. zusätzliches *TatA* einen positiven Einfluss auf die Translokationseffizienz hat. Um dies zu beantworten, wurde erneut auf den Transport radioaktiv markierter *Tat*-Substrate und die anschließende Cystein-Modifizierung zurückgegriffen, welche einerseits an unbehandelten Mitochondrien und andererseits an *TatA*-vorbeladenen Mitochondrien durchgeführt wurde. Die Vorbeladung der mitochondrialen Matrix mit reifem *TatA* erfolgte über einen initialen Import von ebenfalls *in vitro*-synthetisierten *TatA*-Konstrukten, da für diese im Vergleich zum authentischen *TatA* ein spezifischer Import in Mitochondrien gewährleistet werden kann und eine erhöhte Importrate erzielt werden sollte.

Es wurden verschiedene *TatA*-Konstrukte zur Vorbeladung der Mitochondrien erstellt und zunächst getestet. Die Sequenz des reifen C-terminalen Teils von *TatA* wurde hierzu mit den Importsignalen des dual-lokalisierten, aber zu großen Mengen in Mitochondrien importierten Proteins GrpE, und der spezifisch in Mitochondrien importierten Proteine ATPS und mtRieske fusioniert und deren Importeffizienz überprüft. Hierbei zeigt sich, dass die Transporte von GrpE/*TatA* und ATPS/*TatA* zu den geringsten Mengen an prozessiertem Protein führen, während mtRieske/*TatA* von allen Konstrukten am effizientesten importiert und prozessiert wird (siehe Abb. E.31 B). Bei einem Import vom authentischen *TatA* wird zwar die insgesamt größte Menge prozessiertes Protein detektiert (siehe Abb. E.31 A), allerdings kann eine chloroplastidäre Kontamination nicht ausgeschlossen werden, da sich das chloroplastidäre und mitochondriale Prozessierungsprodukt des authentischen *TatA* in ihrem Molekulargewicht nicht voneinander unterscheiden (Bennewitz *et al.*, 2020). Im Falle von

mtRieske/TatA konnte ein spezifischer Import in die Mitochondrien experimentell allerdings bestätigt werden (siehe Abb. E.31 C), weshalb dieses Konstrukt zur Vorbeladung isolierter Mitochondrien mit TatA genutzt wurde.

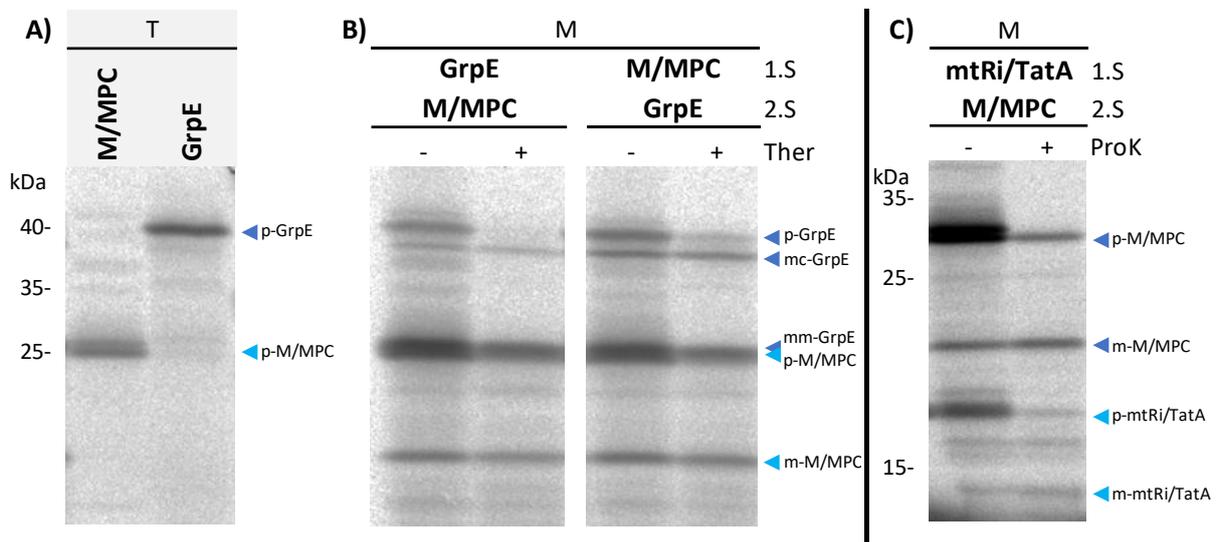


**Abb. E.31: Proteintransport-Versuche mit TatA bzw. rekombinanten TatA-Konstrukten und isolierten Mitochondrien.**

Um den Proteintransport von TatA und rekombinanten TatA-Konstrukten in isolierte Mitochondrien (M) zu überprüfen, wurden diese zusammen mit radioaktiv markierten Substraten inkubiert. Getestet wurden **A** das authentische TatA (inklusive *in vitro*-Translationskontrolle, T), sowie **B** artifizielle Konstrukte aus dem reifen Teil von TatA und den jeweiligen Importsignalen von GrpE (GrpE/TatA), ATPS (ATPS/TatA) und mtRieske (mtRi/TatA). **C** Das Konstrukt mtRi/TatA wurde zur Kontrolle der Importspezifität zusätzlich zu Mitochondrien auch mit isolierten Chloroplasten (C) inkubiert. Die Ansätze wurden halbiert, wobei jeweils eine Probe unbehandelt blieb (- ProK) und der anderen 0,02 % Proteinase K zugegeben wurde (+ ProK). Die in den Proben enthaltenen Proteine wurden denaturiert und in einem 10-17,5 %igen SDS-PA-Gradientengel separiert. Das anschließend getrocknete Gel diente der autoradiographischen Detektion der radioaktiv markierten Proteine. Gekennzeichnet sind die Banden auf Laufhöhe der jeweilig zugegebenen Substrate (◀ p) und der entsprechenden mitochondrialen Prozessierungsprodukte (◀ m). Die Referenzwerte des verwendeten Größenstandards sind links in kDa angegeben.

Als nächstes musste überprüft werden, ob zwei Substrate in aufeinanderfolgenden Reaktionen von den Mitochondrien importiert werden können und ob diese Importe sich gegenseitig beeinflussen. Hierzu wurden als Kontrolle zunächst GrpE und M/MPC direkt nacheinander für je 20 Minuten und in unterschiedlicher Reihenfolge in isolierte Mitochondrien importiert, wobei in einem Zwischenschritt das jeweils erste Substrat entfernt und die Mitochondrien in frischem Importpuffer re-isoliert wurden, und die erhaltenen Resultate miteinander verglichen. Tatsächlich lassen sich sowohl bei GrpE als erstem Imports substrat als auch bei M/MPC als erstem Substrat Prozessierungsprodukte beider Substrate erkennen (siehe Abb. E.32 B). Allerdings läuft das prozessierte GrpE nahezu auf gleicher Höhe wie das M/MPC-Vorläuferprotein, sodass hier ein Vergleich der Signalintensität erschwert wird (siehe Abb. E.32 A,B). Vergleicht man die jeweiligen Signalintensitäten des prozessierten M/MPC (als erstes bzw. zweites Substrat), fallen keine deutlichen Unterschiede in der Intensität auf. Dies deutet darauf hin, dass eine vorangehende Inkubation eines in Mitochondrien importierten Proteins den Import eines zweiten Proteins kaum einschränkt. Der konsekutive Import zweier Substrate ist

demnach ohne großen Effizienzverlust möglich. Die gleiche Kontrolle wurde nun mit mtRieske/TatA, welches zur TatA-Vorbeladung als erstes Substrat importiert wird, und M/MPC, welches als Zielsubstrat an zweiter Stelle importiert und über den Tat-Weg re-exportiert werden soll, durchgeführt. Auch hier können für beide Proteine deutlich die jeweiligen Prozessierungsprodukte erkannt werden, was gegen eine Konkurrenz der zwei nacheinander importierten Substrate spricht, auch wenn diese das gleiche Importsignal besitzen (siehe Abb. E.32 C).



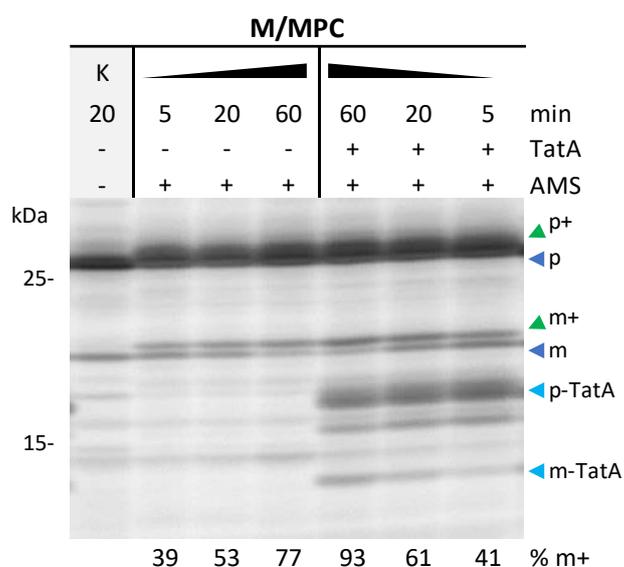
**Abb. E.32: Konsekutive Proteintransport-Versuche mit isolierten Mitochondrien.**

Um zu überprüfen, ob isolierte Mitochondrien zwei verschiedene Substrate in aufeinanderfolgenden Proteintransport-Versuchen importieren können, und ob ein initialer Import die Effizienz eines nachfolgenden Importes beeinflusst, wurden isolierte Mitochondrien (M) zunächst mit einem ersten, radioaktiv markierten Substrat (1.S), also **B** GrpE, M/MPC oder **C** einem artifizialen Konstrukt aus dem Importsignal von mtRieske und dem reifen Teil von TatA (mtRi/TatA), unter Importbedingungen inkubiert. Anschließend wurde dieses erste Substrat entfernt und die Mitochondrien in frischem Importpuffer re-isoliert, um mit einem zweiten, ebenfalls radioaktiv markierten Substrat (2.S), also M/MPC oder GrpE, inkubiert zu werden. Alle Ansätze wurden halbiert, wobei jeweils eine Probe unbehandelt blieb und der anderen 0,02 % **B** Thermolysin bzw. **C** Proteinase K zugegeben wurde (gekennzeichnet durch -/+). **A** Zur Kontrolle der eingesetzten *in vitro*-Translationsprodukte (T) wurden diese auch ohne Zugabe von Mitochondrien überprüft. Die in den Proben enthaltenen Proteine wurden denaturiert und in einem 10-17,5 %igen SDS-PA-Gradientengel separiert. Das anschließend getrocknete Gel diente der autoradiographischen Detektion der radioaktiv markierten Proteine. Gekennzeichnet sind die Banden auf Laufhöhe der jeweilig zugegebenen Substrate (◀ p-GrpE, ▶ p-M/MPC und ▶ p-mtRi/TatA), der entsprechenden mitochondrialen Prozessierungsprodukte (◀ mm-GrpE, ▶ m-M/MPC) (◀ m-mtRi/TatA) und des plastidären Prozessierungsproduktes von GrpE (◀ mc-GrpE). Die Referenzwerte des verwendeten Größenstandards sind jeweils links in kDa angegeben. Weiße Lücken in den Abbildungen verdeutlichen, dass dort verschiedene Bereiche des gleichen Gelbildes zusammengefügt wurden.

Um nun den Einfluss der TatA-Vorbeladung auf die Re-Exporteffizienz zu untersuchen, wurden zwei wie in Kapitel 3.2.2 beschriebene Proteintransport-Zeitreihen (5 bis 60 Minuten) mit anschließender Cystein-Modifizierung miteinander verglichen. Für die jeweiligen Import-Stammansätze wurden hierzu Mitochondrien entweder für 20 Minuten mit mtRieske/TatA vorbehandelt, oder als Leerkontrolle analog dazu ohne Translationsprodukt inkubiert. Nach einem Waschschrift erfolgte die Re-Isolierung

der Stammsätze in frischem Importpuffer, und das Zielsubstrat M/MPC wurde zugegeben. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde den jeweiligen Stammsätzen ein Aliquot entnommen und der Transport mit Valinomycin und CCCP abgestoppt. Quantifiziert wurden die jeweiligen Signalintensitäten des modifizierten und unmodifizierten Prozessierungsproduktes, um anschließend die anteilige Intensität des modifizierten Prozessierungsproduktes an der Gesamtintensität der Prozessierungsprodukte (modifiziert und unmodifiziert) zu berechnen.

Der Kontrollansatz zeigt im zeitlichen Verlauf ein ähnliches Proteintransportverhalten wie zuvor in Kapitel 3.2.2 in Abb. E.29 beschrieben (siehe Abb. E.33). M/MPC wird importiert, prozessiert, und das Prozessierungsprodukt re-exportiert. Nach 5 Minuten können etwa 39 % des reifen Proteins mit AMS



**Abb. E.33: Konsekutiver Proteintransport zur initialen Vorbeladung isolierter Mitochondrien mit TatA und einer anschließenden Untersuchung des Re-Exportes von M/MPC im zeitlichen Verlauf.** Um zu überprüfen, ob eine Vorbeladung isolierter Mitochondrien mit reifem TatA einen Einfluss auf die Re-Export-Effizienz des prozessierten M/MPC hat, wurde ein konsekutiver Proteintransport durchgeführt. Zunächst wurden isolierte Mitochondrien (M) zur TatA-Vorbeladung mit einem artifiziellem Konstrukt aus dem Importsignal von mtRieske und dem reifen Teil von TatA (mtRi/TatA) unter Importbedingungen inkubiert (+ TatA). In einem Kontrollansatz wurden isolierte Mitochondrien lediglich in Importpuffer ohne Substrat inkubiert (- TatA). Anschließend wurden die Mitochondrien in frischem Importpuffer re-isoliert, um mit dem potentiellen mtTat-Substrat M/MPC inkubiert zu werden. Den Transportansätzen wurde jeweils nach 5, 20 und 60 min eine Probe entnommen und diese mit 1  $\mu$ M Valinomycin und 100  $\mu$ M CCCP versetzt, um den Proteintransport abzustoppen. Anschließend wurden die in den Proben enthaltenen Mitochondrien in 1x IP inklusive 0,5 mM AMS re-isoliert und zur Cystein-Modifizierung inkubiert. Als unmodifizierte Kontrolle (K) wurde einem Transportansatz ohne TatA-Vorbeladung kein AMS zugegeben. Die in den Proben enthaltenen Proteine wurden anschließend denaturiert und in einem 12,5 %igen SDS-PA-Gel separiert. Das anschließend getrocknete Gel diente der autoradiographischen Detektion der radioaktiv markierten Proteine. Gekennzeichnet sind die Banden auf Laufhöhe des M/MPC-Vorläuferproteins mit ( $\blacktriangleleft$  p+) und ohne ( $\blacktriangleleft$  p) Modifizierung durch AMS und des mtRi/TatA-Vorläuferproteins ( $\blacktriangleleft$  p-TatA), sowie des mitochondrialen M/MPC-Prozessierungsproduktes mit ( $\blacktriangleleft$  m+) und ohne ( $\blacktriangleleft$  m) Modifizierung durch AMS und des reifen TatA ( $\blacktriangleleft$  m-TatA). Quantifiziert wurden jeweils die Signalintensitäten des modifizierten und unmodifizierten M/MPC-Prozessierungsproduktes, um anschließend den Anteil der Intensität des modifizierten Prozessierungsproduktes an der Gesamtintensität der Prozessierungsprodukte zu berechnen (% m+). Die Referenzwerte des verwendeten Größenstandards sind links in kDa angegeben.

modifiziert werden, nach 20 Minuten sind es schon ca. 53 % und nach 60 Minuten etwa 77 %. Ähnlich verhält es sich bei einer vorangehenden Vorbeladung mit reifem TatA, da auch hier ein Re-Export des prozessierten M/MPC im zeitlichen Verlauf erkennbar ist. In der TatA-vorbehandelten Fraktion ist der Anteil des modifizierten Prozessierungsproduktes allerdings zu jedem Zeitpunkt höher als in der Kontrollfraktion. Die Differenz ist hierbei nach einer kurzen Transportzeit von 5 Minuten mit nur 2 % eher vernachlässigbar. Mit zunehmender Inkubationszeit steigt die Differenz jedoch auf 8 % nach 20 Minuten, und 16 % nach 60 Minuten. Die steigende Differenz scheint mit einer ebenfalls steigenden Gesamtmenge an reifem TatA einherzugehen, da auch das Signal des reifen TatA von 5 bis 60 Minuten deutlich stärker wird. Auch wenn das Vorläuferprotein mtRieske/TatA zwar nach dessen initialen Import durch Waschen entfernt wird, scheint dennoch membrangebundenes mtRi/TatA zurückzubleiben, welches im weiteren experimentellen Verlauf importiert werden kann.

TatA scheint, wie in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben, für die Funktion der mtTat-Translokase zwar nicht essentiell zu sein, insgesamt deuten die erhaltenen Ergebnisse allerdings darauf hin, dass zusätzliches, reifes TatA in der Matrix einen positiven und effizienzsteigernden Einfluss auf den Re-Export mitochondrialer Tat-Substrate hat. Dies ist ein erster Hinweis auf eine mögliche Funktion der dual lokalisierten Tat-Untereinheit TatA in pflanzlichen Mitochondrien, zusätzlich zu der bereits bekannten Funktion in Chloroplasten.

### **3.2.4. Gelelektrophoretische und immunologische Analyse pflanzlicher mtTat-Komplexe**

Bei der Charakterisierung von Proteinkomplexen, wie im konkreten Fall der mtTat-Translokase, ist es grundsätzlich interessant und wichtig herauszufinden, in welcher relativen Menge und mit welchem Molekulargewicht der zu analysierende Proteinkomplex vorliegt, und ob es zu potentiellen Interaktionen mit anderen Proteinkomplexen oder der Ausbildung von Oligomeren kommt. Hierzu eignet sich beispielsweise eine Analyse mittels BN-PAGE. Die auf diese Weise separierten Membranproteinkomplexe können anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert und dort mithilfe von Antikörpern identifiziert werden. Auch die Interaktion radioaktiv markierter Substrate mit Proteinkomplexen bzw. deren Einbau in solche Proteinkomplexe lässt sich nach einer BN-PAGE gut nachvollziehen. In Kapitel 3.2.2 konnte gezeigt werden, dass der Re-Export von Tat-Substraten einen sehr zeitintensiven Prozess darstellt. Dies lässt die Vermutung zu, dass innerhalb des betrachteten Zeitraumes (meist 5 bis 90 Minuten) die Translokase-Komplexe mit radioaktiv markierten Substraten abgesättigt und daher eine Interaktion nachweisbar sein sollte. Zur immunologischen Detektion mitochondrialer Tat-Komplexe kommen zunächst nur Antikörper gegen die Untereinheit mtTatB in

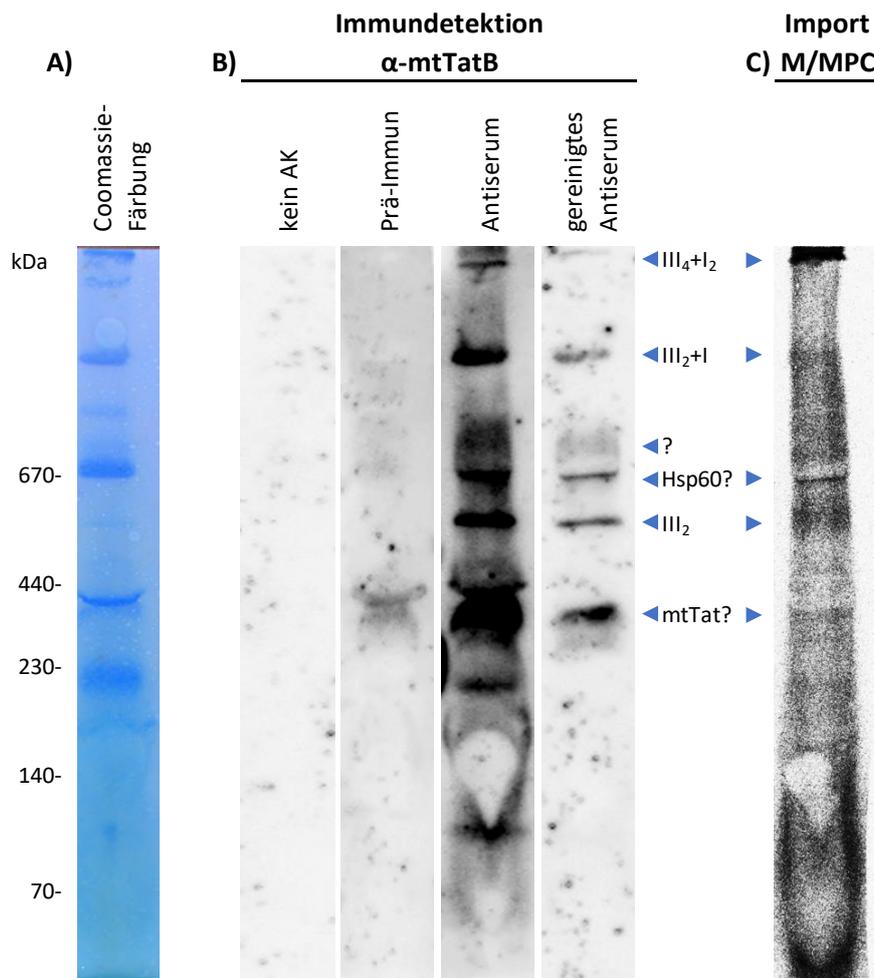
Frage, da gegen mtTatC, besonders aufgrund der sechs Transmembrandomänen, bisher keine Antikörper generiert werden konnten. Eine Antikörper-vermittelte Detektion von TatA war in Mitochondrien vermutlich aufgrund der geringen Menge bisher nicht erfolgreich, zudem konnte TatA auch in Thylakoiden nie im Komplex nachgewiesen werden (Jakob *et al.*, 2009, Dissertation Reimers, 2020).

#### 3.2.4.1. Comigration von mtTat-Substraten mit mtTatB

Mithilfe spezifischer Antikörper gegen mtTatB wurde untersucht, ob über dessen Immundetektion die gleichen Proteinkomplexe wie mit radioaktiv markierten Vorläuferproteinen zu erkennen sind. Im Rahmen der Masterarbeit von M.Sc. Anna Krüger (in der AG Prof. Klösgen) wurden Antikörperseren unter anderem gegen *Spinacia oleracea*-mtTatB generiert. Da keine Reaktivität dieser Antikörper mit mtTatB aus *P. sativum* festgestellt werden konnte (Ergebnisse nicht gezeigt), wurden für die Detektion von mtTatB in mitochondrialen Membrankomplexen Mitochondrien aus *S. oleracea* verwendet. Im Zuge dieser Arbeit wurde die Spezifität des Antiserums von Dr. Mario Jakob (AG Prof. Klösgen) über eine Antigen-Affinitätsreinigung weiter optimiert.

Bei einer vorangehenden Kontrolle der Antikörper nach denaturierender SDS-PAGE mitochondrialer Proteine aus *S. oleracea* konnte mtTatB mit einem ungefähren Molekulargewicht von 33 kDa durch die affinitätsgereinigten Antikörper deutlich detektiert werden (siehe Anhang Abb. A.3). Demnach erkennen die erzeugten Antikörper mit relativ hoher Genauigkeit und Spezifität mtTatB aus *S. oleracea*. Nach erfolgter Auftrennung der Digitonin-solubilisierten, mitochondrialen Membrankomplexe mittels BN-PAGE wurde zunächst das Prä-Immuneserum als Kontrolle getestet, durch welches lediglich auf Höhe von etwa 440 kDa ein Komplex detektiert werden kann (siehe Abb. E.34 B). Eine deutlich größere Anzahl an Proteinkomplexen wird hingegen durch das Antiserum detektiert, darunter der vom Prä-Immuneserum erkannte 440 kDa-Komplex. Die affinitätsgereinigten Antikörper erkennen deutlich weniger, dafür wesentlich spezifischer mtTatB-beinhaltende Proteinkomplexe mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 350 kDa, 550 kDa, 670 kDa, 690 kDa, >1.000 kDa und, nur schwach zu erkennen, >2.000 kDa; der durch das Prä-Immuneserum und das Antiserum erkannte 440 kDa-Komplex ist allerdings nicht darunter. Der Komplex auf Höhe von 550 kDa sowie die zwei hochmolekularen Superkomplexe entsprechen etwa dem erwarteten Molekulargewicht von Komplex III-Dimeren bzw. Superkomplexen bestehend aus Komplex III und Komplex I in jeweils unterschiedlicher Anzahl (Eubel *et al.*, 2003). Bei der Detektion mitochondrialer Proteinkomplexe durch eine antikörpervermittelte ECL-Reaktion weisen Komplex III und dessen Superkomplexe häufig eine endogene Peroxidaseaktivität auf, welche vermutlich durch den zentralen

Häm-Cofaktor in Komplex III hervorgerufen wird (Smet *et al.*, 2011, Weber-Lotfi *et al.*, 2015). Da dies zu entsprechenden falsch-positiven Signalen führen kann, wurde den Membranen während der Blockierung 0,09 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugesetzt, was im Falle chloroplastidärer Cytochrom-*b<sub>6</sub>f*-Komplexe die Häm-Cofaktoren inaktiviert (Dissertation Reimers, 2020). Zur Kontrolle der Inaktivierung wurde eine weitere Spur der mitochondrialen Membranproteine ohne Antikörper behandelt. In dieser Spur sind keinerlei Signale sichtbar, weshalb unspezifische Signale aufgrund der Komplex III-Peroxidaseaktivität in den antikörperbehandelten Spuren ebenfalls ausgeschlossen werden kann.



**Abb. E.34: Comigration von mtTatB und dem importierten mtTat-Substrat M/MPC in mitochondrialen Membrankomplexen aus *S. oleracea*.** Isolierte Mitochondrien ( $\approx 200 \mu\text{g}$  Gesamtprotein) aus *Spinacia oleracea* wurden zum Proteintransport mit radioaktiv markiertem M/MPC inkubiert. Die mitochondrialen Membrankomplexe wurden anschließend durch Inkubation mit 5 % Digitonin solubilisiert und in einem 5-13,5 %igen BN-PA-Gradientengel separiert. Darauf folgte der Proteintransfer auf eine PVDF-Membran, welche im Anschluss entlang der separierten Proben in Streifen geschnitten wurde. A Zur unspezifischen Proteinfärbung wurde die Membran für wenige Minuten in Coomassie®(R250)-Färbelösung inkubiert und der Hintergrund anschließend entfärbt. B Die Immundetektion von mtTatB wurde über eine HRP-vermittelte ECL-Reaktion visualisiert. Getestet wurden das affinitätsgereinigte und ungereinigte Antiserum, sowie das Prä-Immunsereum und eine unbehandelte Membran (kein AK) als Kontrolle. C Das radioaktive Signal des zuvor importierten M/MPC wurde autoradiographisch detektiert. Es konnten unter anderem ein potentieller mtTat-Komplex ( $\blacktriangleleft$  mtTat?), der Komplex III-Dimer ( $\blacktriangleleft$  III<sub>2</sub>), Superkomplexe aus Komplex III und Komplex I ( $\blacktriangleleft$  III<sub>2</sub>+I bzw.  $\blacktriangleleft$  III<sub>4</sub>+I<sub>2</sub>) und eventuell Hsp60 ( $\blacktriangleleft$  Hsp60?) erkannt werden. Die Referenzwerte des verwendeten Größenstandards sind links in kDa angegeben.

Um eine Interaktion des potentiellen Tat-Substrates M/MPC mit einem mitochondrialen Tat-Komplex nachzuweisen, wurde dieses radioaktiv markierte Protein vor der BN-PAGE in die isolierten Mitochondrien importiert. Dies erlaubt nach dem erfolgten Transfer der Proteinkomplexe auf eine PVDF-Membran die Detektion von Komplexen, an welche das radioaktive Substrat gebunden hat. Die ausgelesenen Signale sind insgesamt vergleichsweise schwach. Es können allerdings einige Banden erkannt werden, die auf eine Interaktion des radioaktiven Substrates mit Proteinkomplexen auf Höhe von ca. 350 kDa, 550 kDa, 670 kDa, >1.000 kDa und >2.000 kDa hindeuten (siehe Abb. E.34 C). Es handelt sich dabei vermutlich um die gleichen Proteinkomplexe, die auch durch den affinitätsgereinigten mtTatB-Antikörper detektiert werden.

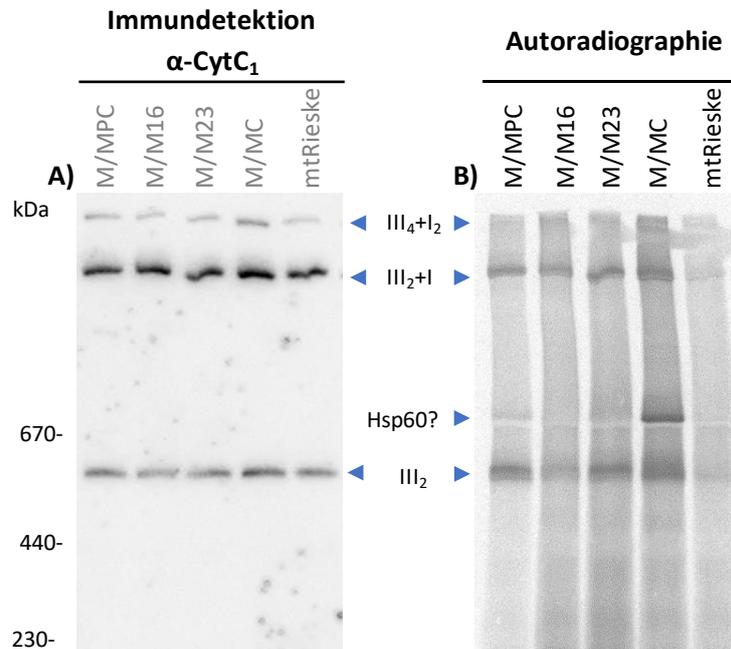
Die hier beschriebenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein mitochondrialer Tat-Komplex eventuell nicht nur vereinzelt, sondern auch im Verbund mit Komplex III und einigen Komplex III-enthaltenden Superkomplexen vorliegen könnte.

#### **3.2.4.2. Comigration von mtTat-Substraten mit Cytochrom $c_1$**

Aus Kapitel 3.2.4.1 geht hervor, dass mitochondriale Tat-Komplexe in Pflanzenzellen zum Teil an Komplex III und dessen Superkomplexe gebunden vorliegen könnten. Um diese Vermutung genauer zu untersuchen, wurden erneut nach einem Import potentieller Tat-Substrate (hier M/MPC, M/M16, M/M23, M/MC und mtRieske) die mitochondrialen Membrankomplexe durch Digitonin solubilisiert und mittels BN-PAGE separiert. Nach einem Transfer der aufgetrennten Proteinkomplexe auf eine PVDF-Membran wurden einerseits die radioaktiven Signale der importierten Substrate ausgelesen, und andererseits Antikörper, gerichtet gegen die Komplex III-Untereinheit Cytochrom  $c_1$ , für eine Detektion von Komplex III und den Komplex III-beinhaltenden Superkomplexen genutzt. Da die hier genutzten Antikörper bei initialen Tests kein Cytochrom  $c_1$  in Mitochondrien aus *S. oleracea* (Ergebnisse nicht gezeigt), dafür jedoch in Mitochondrien aus *P. sativum* detektieren konnten (siehe Anhang Abb. A.4), wurden nun wieder Mitochondrien aus *P. sativum* für die nachfolgenden Versuche verwendet.

Die Antikörper erkennen in allen mitochondrialen Proben Proteinkomplexe mit apparenten Molekulargewichten von ca. 550 kDa, vermutlich >1.000 kDa und >2.000 kDa (siehe Abb. E.35 A). Dies entspricht mit großer Wahrscheinlichkeit einer Detektion von Komplex III-Dimeren und Superkomplexen, zusammengesetzt aus unterschiedlichen Mengen Komplex III und Komplex I ( $III_2+$  bzw.  $III_4+I_2$ ). Mit Ausnahme des größten detektierten Proteinkomplexes bei geschätzt >2.000 kDa können alle mittels Cytochrom  $c_1$ -Antikörper erhaltenen Signale auch in der Autoradiographie der markierten Tat-Substrate wiedergefunden werden (siehe Abb. E.35 B). Zusätzlich ist bei einem

Transport von M/MC ein Proteinkomplex bei ca. 670 kDa sichtbar, welcher im Vergleich zu den anderen Proteinkomplexen besonders stark in Erscheinung tritt.



**Abb. E.35: Comigration von Cytochrom  $c_1$  und importierten mtTat-Substraten in mitochondrialen Membrankomplexen aus *P. sativum*.** Isolierte Mitochondrien ( $\cong 200 \mu\text{g}$  Gesamtprotein) aus *Pisum sativum* wurden zum Proteintransport mit radioaktiv markierten mtTat-Substraten (M/MPC, M/M16, M/M23, M/MC und mtRieske) inkubiert. Die mitochondrialen Membrankomplexe wurden anschließend durch Inkubation mit 5 % Digitonin solubilisiert und in einem 5-13,5%igen BN-PA-Gradientengel separiert. Darauf folgte der Proteintransfer auf eine PVDF-Membran. **B** Die Immundetektion von Cytochrom  $c_1$  wurde über eine HRP-vermittelte ECL-Reaktion visualisiert. **C** Die radioaktiven Signale der zuvor importierten Substrate wurden autoradiographisch detektiert. Es konnten unter anderem der Komplex III-Dimer ( $\blacktriangleleft$  III<sub>2</sub>), Superkomplexe aus Komplex III und Komplex I ( $\blacktriangleleft$  III<sub>2</sub>+I bzw.  $\blacktriangleleft$  III<sub>4</sub>+I<sub>2</sub>) und eventuell Hsp60 ( $\blacktriangleleft$  Hsp60?) erkannt werden. Die Referenzwerte des verwendeten Größenstandards sind links in kDa angegeben.

Die hier beschriebenen Ergebnisse scheinen die Hypothese einer Interaktion von mtTat und Komplex III zu unterstützen. Es wurde bestätigt, dass die importierten und potentiell mit mtTat interagierenden Tat-Substrate in Proteinkomplexen detektiert werden können, welche auch Cytochrom  $c_1$  enthalten (III<sub>2</sub>, III<sub>2</sub>+I).

### 3.3. Charakterisierung potentieller mtTat-Substrate

Auch die zu transportierenden Substrate der mtTat-Translokase können wichtige Erkenntnisse zur Funktionsweise des Transportkomplexes liefern. Die Eigenschaften des mitochondrialen Rieske-Proteins und einiger daraus abgeleiteter Proteinvarianten wurden daher genauer untersucht und

werden im folgenden Kapitel beschrieben. So wurden die Notwendigkeit des üblicherweise zur Translokation erforderlichen Tat-Motivs sowie die Kompatibilität der pflanzlichen mtTat-Translokase mit nicht-pflanzlichen mtRieske- und dem chloroplastidären cpRieske-Protein überprüft.

### **3.3.1. Das Erkennungsmotiv**

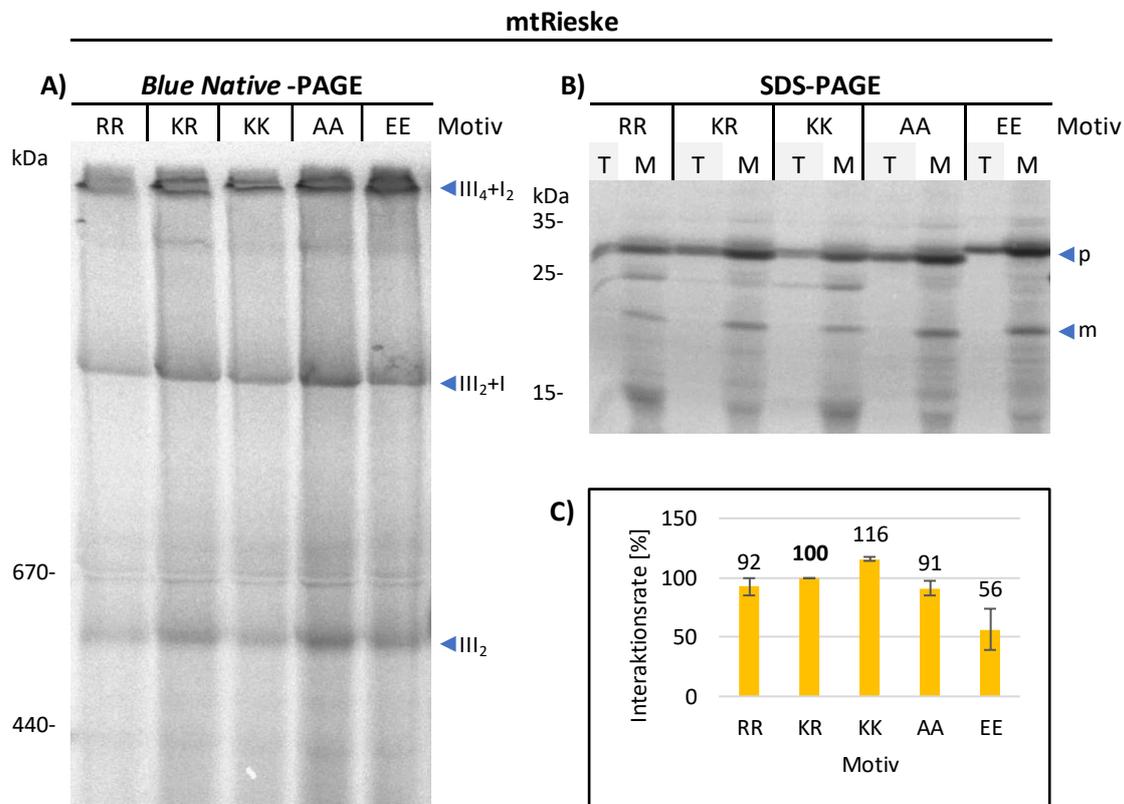
In der Sequenz des Transmembranankers von cpRieske befindet sich ein Lysin-Arginin-Motiv (KR), welches anstelle des für Tat-Substrate üblichen Zwillingsarginin-Motivs (RR) eine Tat-Translokation vermittelt. Ein solches Motiv ist auch im Transmembrananker von mtRieske vorhanden. Um die Rolle dieses KR-Motivs im Falle des mtRieske genauer zu untersuchen, wurden ausgehend von mtRieske und dem M/MPC-Konstrukt verschiedene Mutanten generiert. Diese besitzen statt des KR-Motivs die Aminosäurepaare RR bzw. KK (positive Seitenketten), AA (Alanin; neutrale Seitenketten) oder EE (Glutaminsäure; negative Seitenketten). Die so erzeugten Erkennungsmotiv-Mutanten wurden nun, nach erfolgter *in vitro*-Synthese und radioaktiver Markierung, für Proteintransportversuche genutzt und diese mittels nativer BN-PAGE und denaturierender SDS-PAGE analysiert. Da beide Analysen mit dem gleichen Importansatz durchgeführt wurden, konnten die Signale von Komplex III und den Superkomplexen in der BN-PAGE mit den auf Höhe der Prozessierungsprodukte erhaltenen Signale in der SDS-PAGE in Relation gesetzt werden. Dies gibt Aufschluss über die Effizienz, mit der die entsprechenden Mutanten nach Import und Prozessierung in Komplex III eingebaut bzw. mit dem mtTat-Komplex interagieren können.

#### **3.3.1.1. mtRieske: Einfluss von Mutationen im potentiellen Erkennungsmotiv**

Bei Betrachtung der Importresultate in der SDS-PAGE fällt zunächst auf, dass alle Mutanten erfolgreich in die isolierten Mitochondrien importiert und in deren Matrix zum reifen mtRieske prozessiert werden können (siehe Abb. E.36 B). Im Falle von mtRieske-EE wird deutlich, dass der Aminosäureaustausch zu einem leicht veränderten Migrationsverhalten während der Gelelektrophorese führt, wovon insbesondere das Vorläuferprotein betroffen ist. In der BN-PAGE können mit allen Erkennungsmotiv-Mutanten radioaktiv markierte Proteinkomplexe detektiert werden, bei welchen es sich potentiell um einen Komplex III-Dimer (ca. 550 kDa) und zwei Superkomplexe, zusammengesetzt aus unterschiedlichen Mengen Komplex III und Komplex I ( $III_2+I$  mit  $>1.000$  kDa bzw.  $III_4+I_2$  mit  $>2.000$  kDa), handeln könnte (siehe Abb. E.36 A). Die einzelnen Banden sind jedoch unterschiedlich kräftig ausgeprägt. Am stärksten erscheinen die entsprechenden Signale nach einem Import von

mtRieske-AA und mtRieske-KR, gefolgt von mtRieske-EE und etwas schwächer im Falle von mtRieske-RR und -KK.

Werden die Ergebnisse der BN-PAGE und SDS-PAGE nun quantifiziert und miteinander in Bezug gesetzt, lässt sich daraus die relative Einbaurrate der prozessierten Substrate in Komplex III, bzw. die Interaktionsrate der Substrate mit mtTat, ableiten. Hierzu werden die Signalintensitäten vom



**Abb. E.36: Interaktionsrate zwischen mtRieske bzw. dessen Erkennungsmotiv-Mutanten und Komplex III.**

Um den Einfluss einer Mutation im potentiell zur mtTat-Translokation erforderlichen KR-Erkennungsmotiv auf die Interaktionsfähigkeit von mtRieske mit Komplex III zu untersuchen, wurden isolierte Mitochondrien (M) zunächst mit radioaktiv markierten Vorläuferproteinen entsprechender mtRieske-Mutanten inkubiert. Ausgehend vom authentischen KR-Motiv (K49, R50) wurden Mutanten generiert, die an der entsprechenden Position ebenfalls zwei positiv geladene Reste (RR bzw. KK), zwei ungeladene Reste (AA) oder zwei negativ geladene Reste (EE) aufweisen. Nach erfolgtem Proteintransport wurden alle Ansätze zur Analyse mittels **A** 5-13,5 % BN-PA-Gradientengel (jeweils Mitochondrien  $\cong$  200  $\mu$ g Gesamtprotein eingesetzt, solubilisiert in 5 % Digitonin) und **B** 10-17,5 % SDS-PA-Gradientengel (jeweils M  $\cong$  50  $\mu$ g Gesamtprotein eingesetzt) in jeweils zwei Proben geteilt. Zur Kontrolle der eingesetzten Substrate wurden die entsprechenden *in vitro*-Translationsprodukte (T) auch ohne Zugabe von Mitochondrien überprüft. Die getrockneten Gele dienen der autoradiographischen Detektion der radioaktiv markierten Proteine. Es konnten nach erfolgter BN-PAGE unter anderem der Komplex III-Dimer ( $\llcorner$  III<sub>2</sub>) und Superkomplexe aus Komplex III und Komplex I ( $\llcorner$  III<sub>2</sub>+I bzw.  $\llcorner$  III<sub>4</sub>+I<sub>2</sub>) erkannt werden. Gekennzeichnet sind außerdem die Banden auf Laufhöhe der jeweiligen Vorläuferproteine ( $\llcorner$  p) und der mitochondrialen Prozessierungsprodukte ( $\llcorner$  m). Die Referenzwerte des verwendeten Größenstandards sind jeweils links in kDa angegeben. **C** Zur Berechnung der relativen Interaktionsrate [%] der prozessierten Substrate mit Komplex III wurden die quantifizierten Signalintensitäten vom Komplex III-Dimer ( $\llcorner$  III<sub>2</sub>) und dem Superkomplex ( $\llcorner$  III<sub>2</sub>+I) einer jeweiligen Erkennungsmotiv-Mutante summiert, und anschließend der Anteil dieser Summe an der Signalintensität des dazugehörigen prozessierten Proteins ( $\llcorner$  m) berechnet. Grafisch dargestellt sind die relativen Interaktionsraten der mtRieske-Mutanten, mit dem authentischen mtRieske (KR) als Bezugsgröße (n = 2, inklusive Standardabweichung).

Komplex III-Dimer ( $III_2$ ) und dem Superkomplex ( $III_2+I$ ) einer jeweiligen Erkennungsmotiv-Mutante (in der BN-PAGE) quantifiziert, summiert und anschließend der Anteil dieser Summe an der Signalintensität des dazugehörigen prozessierten Proteins (in der SDS-PAGE) berechnet (siehe Abb. E.36 C). Wird der errechnete Wert des authentischen mtRieske (also mit KR-Motiv) als Bezugsgröße (100 %) festgelegt, erreichen mtRieske-RR und -AA etwa 90 % von dessen Interaktionsrate. Mit etwa 115 % kann mtRieske-KK anscheinend am effizientesten mit mtTat interagieren, während mtRieske-EE zwar in großer Menge importiert und prozessiert, aber nur mit ca. 55 % der ursprünglichen Effizienz mit mtTat interagieren kann.

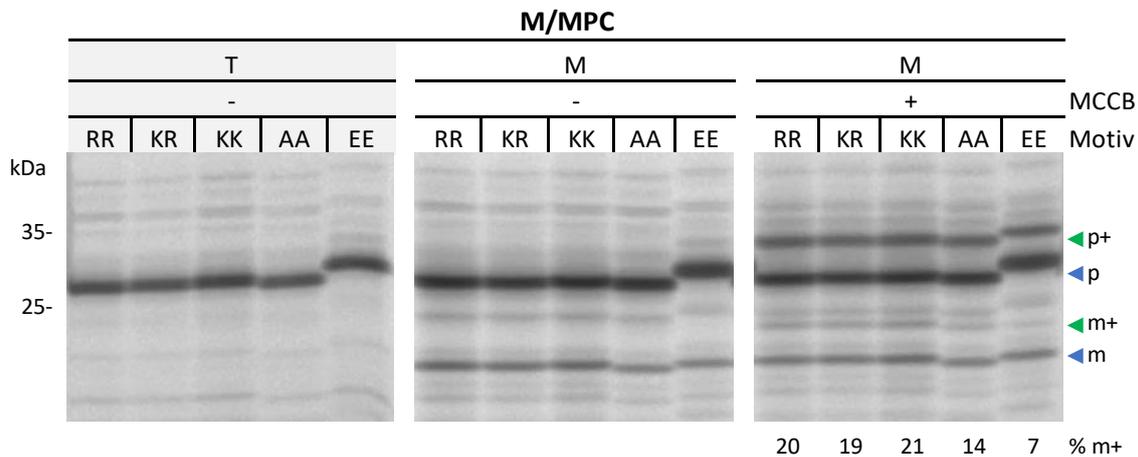
Die Mutationen im potentiellen Erkennungsmotiv von mtRieske haben überwiegend nur einen geringfügigen Effekt auf die Interaktionsrate mit mtTat. Lediglich bei einer Mutation von KR zu EE kann eine deutlich verringerte Interaktion beobachtet werden.

### **3.3.1.2. M/MPC: Einfluss von Mutationen im potentiellen Erkennungsmotiv**

Die unter 3.3.1.1 beschriebenen Versuche wurden neben mtRieske auch mit dem mtRieske-basierten Konstrukt M/MPC durchgeführt. Dieses artifizielle Substrat erlaubt allerdings zusätzlich eine Untersuchung des Re-Exportes mittels Cystein-Modifizierung.

Alle M/MPC-Mutanten können ähnlich effizient in isolierte Mitochondrien importiert und dort prozessiert werden (siehe Abb. E.37). Auch hier gibt es Veränderungen der Migrationseigenschaften infolge des Aminosäureaustausches. So migrieren M/MPC-AA und dessen Prozessierungsprodukt etwas weiter durch die Gelmatrix, während M/MPC-EE und dessen Prozessierungsprodukt während der Elektrophorese weniger weit migrieren. Werden die Proben nun mit MCCB inkubiert, modifiziert dies einerseits die Vorläuferproteine aller M/MPC-Mutanten und andererseits deren Prozessierungsprodukte. Der relative Anteil der modifizierten Prozessierungsprodukte an der Gesamtheit prozessierter Proteine unterscheidet sich allerdings zwischen den jeweiligen Mutanten. Während etwa 20 % der prozessierten Proteine nach Import von M/MPC-RR, -KR und -KK durch MCCB modifiziert werden können, sinkt dieser Anteil im Falle von M/MPC-AA auf ca. 14 % und noch einmal um die Hälfte auf etwa 7 % bei M/MPC-EE.

Demnach scheinen die Mutationen bei Beibehaltung der positiven Gesamtladung keinen Einfluss auf die Re-Exporteffizienz zu haben, während sich der Austausch des KR-Motivs durch ein AA-Motiv und besonders durch ein EE-Motiv eher negativ auf die Re-Exporteffizienz auszuwirken scheint.



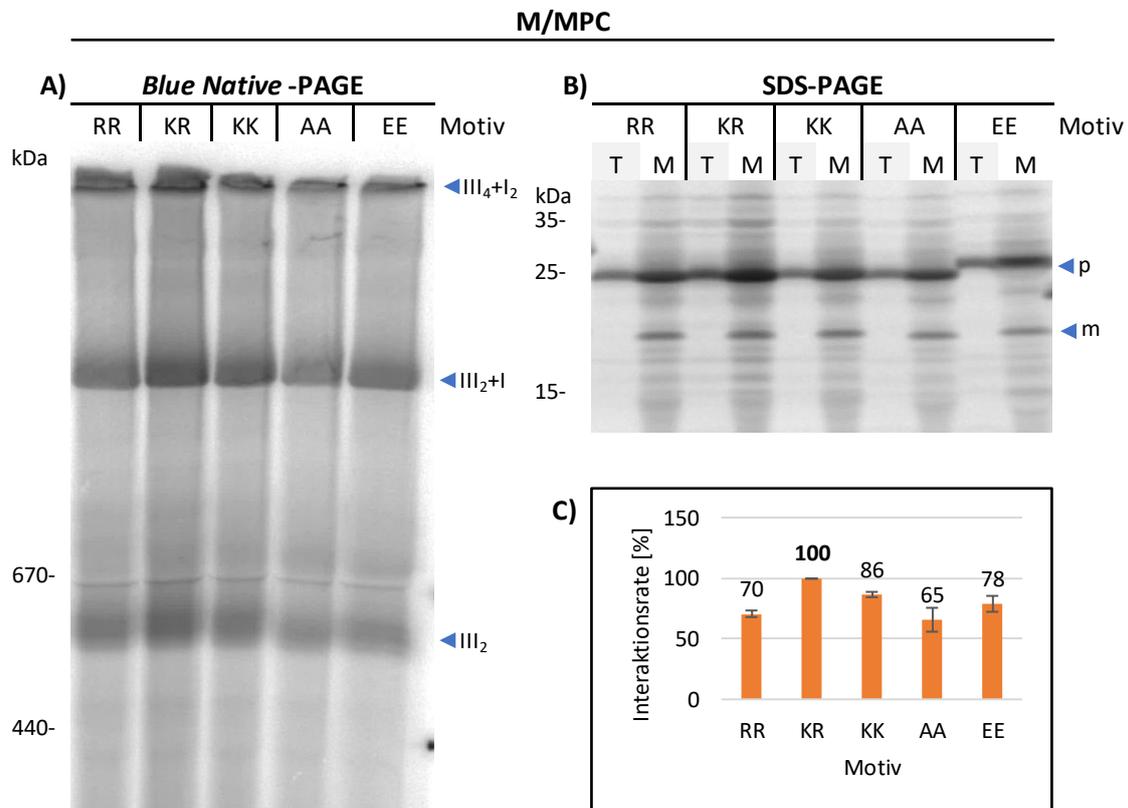
**Abb. E.37: Import und Re-Export von M/MPC und dessen Erkennungsmotiv-Mutanten.**

Um den Einfluss einer Mutation im potentiell zur mtTat-Translokation erforderlichen KR-Erkennungsmotiv auf den Re-Export von M/MPC zu untersuchen, wurden isolierte Mitochondrien (M) mit radioaktiv markierten Vorläuferproteinen entsprechender M/MPC-Mutanten inkubiert, gefolgt von einer Cystein-Modifizierung zur Überprüfung der Protein-Topologie. Ausgehend vom authentischen KR-Motiv (K49, R50) wurden Mutanten generiert, die an der entsprechenden Position ebenfalls zwei positiv geladene Reste (RR bzw. KK), zwei ungeladene Reste (AA) oder zwei negativ geladene Reste (EE) aufweisen. Nach erfolgter Inkubation dieser Substrate mit Mitochondrien wurden alle Ansätze halbiert und die enthaltenen Mitochondrien entweder in 1x IP oder in 1x IP inklusive 0,1 mM MCCB re-isoliert und inkubiert. Zur Kontrolle der eingesetzten Substrate wurden die entsprechenden *in vitro*-Translationsprodukte (T) auch ohne Zugabe von Mitochondrien überprüft. Anschließend wurden die in allen Proben enthaltenen Proteine denaturiert und in einem 10-17,5 %igen SDS-PA-Gradientengel separiert. Die anschließend getrockneten Gele dienen der autoradiographischen Detektion der radioaktiv markierten Proteine. Gekennzeichnet sind die Banden auf Laufhöhe der jeweiligen Vorläuferproteine mit (◀ p+) und ohne (◀ p) Modifizierung durch MCCB, sowie der mitochondrialen Prozessierungsprodukte mit (◀ m+) und ohne (◀ m) Modifizierung durch AMS. Quantifiziert wurden jeweils die Signalintensitäten des modifizierten und unmodifizierten Prozessierungsproduktes, um anschließend den Anteil der Intensität des modifizierten Prozessierungsproduktes an der Gesamtintensität der Prozessierungsprodukte zu berechnen (% m+). Die Referenzwerte des verwendeten Größenstandards sind links in kDa angegeben. Weiße Lücken in den Abbildungen verdeutlichen, dass dort verschiedene Bereiche des gleichen Gelbildes zusammengefügt wurden.

Werden nun die mitochondrialen Proteine nach erfolgtem Import der jeweiligen M/MPC-Mutanten mittels BN-PAGE und SDS-PAGE aufgetrennt und analysiert, fällt erneut der erfolgreiche Import und die Prozessierung der entsprechenden Substrate mit ähnlicher Effizienz auf (siehe Abb. E.38 B). Beim Auslesen der radioaktiven Signale nach erfolgter BN-PAGE sind Proteinkomplexe auf gleicher Laufhöhe, wie sie zuvor im Kapitel 3.3.1.1 in Abb. E.37 A zu den mtRieske-Mutanten beschrieben wurden, sichtbar (siehe Abb. E.38 A). Die Banden erscheinen im Falle der M/MPC-Mutanten zwar deutlich stärker, sind teilweise allerdings etwas diffus. Am stärksten sind die Banden auf Höhe von ca. 550 kDa und >1.000 kDa nach einem Import von M/MPC-KR ausgeprägt, etwas schwächer bei M/MPC-RR und -KK und am schwächsten bei einem Import von M/MPC-AA und -EE.

Werden die quantifizierten Mengen an prozessiertem Protein mit der daraus jeweils resultierenden Signalintensität detektierter Komplex III-Dimere und Superkomplexe III<sub>2</sub>+I in Relation gesetzt und die Werte für M/MPC-KR aufgrund des authentischen KR-Motivs als 100 %-Bezugsgröße gewählt, kann für alle getesteten Erkennungsmotivmutanten eine verringerte Interaktion mit mtTat ermittelt werden

(siehe Abb. E.38 C). Die Signalintensitäten in Abhängigkeit zum jeweiligen prozessierten Protein belaufen sich dabei auf ca. 65 % (M/MPC-AA), 70 % (RR), 86 % (EE) und 78 % (KK) der Interaktionsrate des Referenzproteins M/MPC-KR. Interessanterweise ist die Interaktionsrate von M/MPC-EE trotz der zwei negativen Aminosäurereste höher als die von M/MPC-AA bzw. -RR und reicht fast an die Interaktionsrate von M/MPC-KK heran.



**Abb. E.38: Interaktionsrate zwischen M/MPC bzw. dessen Erkennungsmotiv-Mutanten und Komplex III.**

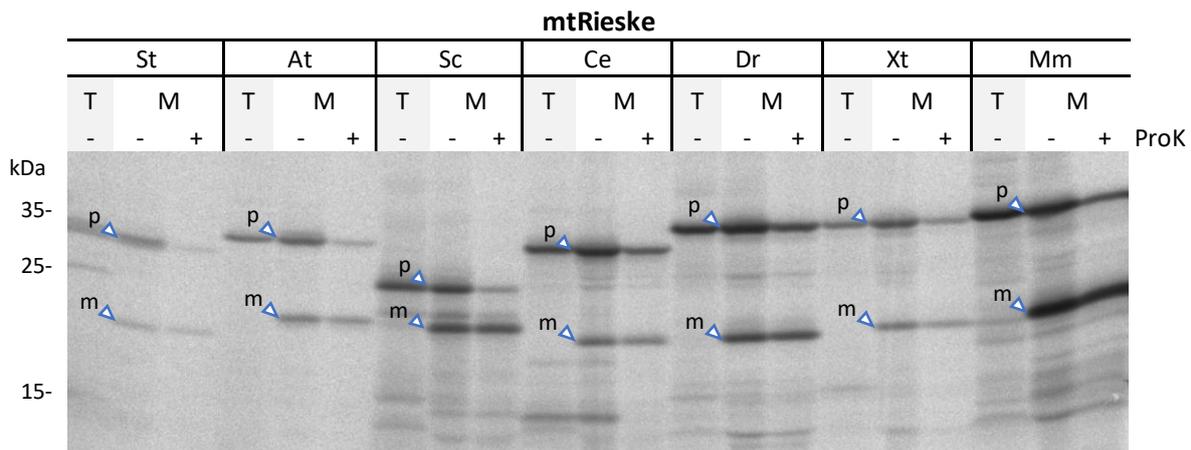
Um den Einfluss einer Mutation im potentiell zur mtTat-Translokation erforderlichen KR-Erkennungsmotiv auf die Interaktionsfähigkeit von M/MPC mit Komplex III zu untersuchen, wurden isolierte Mitochondrien (M) zunächst mit radioaktiv markierten Vorläuferproteinen entsprechender M/MPC-Mutanten inkubiert. Ausgehend vom authentischen KR-Motiv (Position 49 bis 50) wurden Mutanten generiert, die an der entsprechenden Position ebenfalls zwei positiv geladene Reste (RR bzw. KK), zwei ungeladene Reste (AA) oder zwei negativ geladene Reste (EE) aufweisen. Nach erfolgtem Proteintransport wurden alle Ansätze zur Analyse mittels **A** 5-13,5 % BN-PA-Gradientengel (jeweils Mitochondrien  $\pm$  200  $\mu$ g Gesamtprotein eingesetzt, solubilisiert in 5 % Digitonin) und **B** 10-17,5 % SDS-PA-Gradientengel (jeweils Mitochondrien  $\pm$  50  $\mu$ g Gesamtprotein eingesetzt) in jeweils zwei Proben geteilt. Zur Kontrolle der eingesetzten Substrate wurden die entsprechenden *in vitro*-Translationsprodukte (T) auch ohne Zugabe von Mitochondrien überprüft. Die getrockneten Gele dienten der autoradiographischen Detektion der radioaktiv markierten Proteine. Es konnten nach erfolgter BN-PAGE unter anderem der Komplex III-Dimer ( $\blacktriangleleft$  III<sub>2</sub>) und Superkomplexe aus Komplex III und Komplex I ( $\blacktriangleleft$  III<sub>2</sub>+I bzw.  $\blacktriangleleft$  III<sub>4</sub>+I<sub>2</sub>) erkannt werden. Gekennzeichnet sind außerdem die Banden auf Laufhöhe der jeweiligen Vorläuferproteine ( $\blacktriangleleft$  p) und der mitochondrialen Prozessierungsprodukte ( $\blacktriangleleft$  m). Die Referenzwerte des verwendeten Größenstandards sind jeweils links in kDa angegeben. **C** Zur Berechnung der relativen Interaktionsrate [%] der prozessierten Substrate mit Komplex III wurden die quantifizierten Signalintensitäten vom Komplex III-Dimer ( $\blacktriangleleft$  III<sub>2</sub>) und dem Superkomplex ( $\blacktriangleleft$  III<sub>2</sub>+I) einer jeweiligen Erkennungsmotiv-Mutante summiert und anschließend der Anteil dieser Summe an der Signalintensität des dazugehörigen prozessierten Proteins ( $\blacktriangleleft$  m) berechnet. Grafisch dargestellt sind die relativen Interaktionsraten der M/MPC-Mutanten mit Komplex III, mit M/MPC (KR) als Bezugsgröße (n = 2, inklusive Standardabweichung).

Eine Mutation im potentiellen Erkennungsmotiv von M/MPC scheint sich negativ auf den Re-Export dieses Substrats auszuwirken, sollte die Ladung des Proteins an dieser Position dadurch geändert werden. Insgesamt zeigten alle M/MPC-Mutanten allerdings eine vergleichsweise starke Interaktion mit dem mitochondrialen Tat-System. Die Mutationen wirken sich hierbei unterschiedlich stark auf die Interaktionseffizienz der entsprechenden Substrate aus.

### **3.3.2. In vitro-Transportversuche mit heterologen Rieske-Proteinen**

Eine ebenfalls spannende Frage befasst sich mit der Interaktionsfähigkeit nicht-pflanzlicher mtRieske-Proteine bzw. plastidärer Rieske-Proteine mit dem Tat-System pflanzlicher Mitochondrien. Dies ist besonders vor dem Hintergrund der Existenz eines alternativen Translokationssystems (Bcs1) zum Transport von mtRieske in den Mitochondrien von Hefe und Säugern interessant. Um also zu untersuchen, ob die Rieske-Proteine aus Mitochondrien nicht-pflanzlicher Organismen und aus Plastiden mit der mtTat-Translokase isolierter Mitochondrien aus *P. sativum* interagieren können, wurden wie in Kapitel 3.3.1 beschriebene Versuche durchgeführt, welche einen Vergleich der Interaktionseffizienz der getesteten Substrate nach Import und Prozessierung zulassen. Bei diesen Substraten handelt es sich um mtRieske aus *Solanum tuberosum* (St), *Arabidopsis thaliana* (At), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Caenorhabditis elegans* (Ce), *Xenopus tropicalis* (Xt), *Danio rerio* (Dr) und *Mus musculus* (Mm). Die zur *in vitro*-Synthese der hier genutzten mtRieske-Proteine benötigten Klone, mit Ausnahme von St-mtRieske, wurden von M.Sc. Ditya Larasati (AG Prof. Klösigen) angefertigt und freundlicherweise bereitgestellt. Zur Untersuchung des chloroplastidären Rieske-Proteins aus *S. tuberosum* wurde ein Konstrukt aus dem mtRieske-Importsignal und dem reifen Teil des cpRieske-Proteins genutzt (M/CC; siehe Schema Abb. E.10), welches im Rahmen der Dissertation von Dr. Jana Kungel (AG Prof. Klösigen) hergestellt wurde (Dissertation Kungel, 2020).

Zunächst wurden die generellen Importeigenschaften aller mitochondrialen Rieske-Proteine mit pflanzlichen Mitochondrien getestet. Sowohl der Import als auch die Prozessierung der importierten Vorläuferproteine kann, wenn auch mit unterschiedlicher Effizienz, erfolgen (siehe Abb. E.39). Die jeweiligen Prozessierungsprodukte sind vor einer extern zugegebenen Protease geschützt, was einen Import der Substrate bestätigt. Das kräftigste Signal eines reifen Proteins wird nach einem Import des Mm-mtRieske erhalten, gefolgt von Sc- und Dr-mtRieske. Die geringste Menge an reifem Protein wird bei einem Import von St-mtRieske detektiert. Allerdings hängt die Menge an importiertem Protein und dem daraus resultierenden Prozessierungsprodukt auch stark mit der jeweiligen Translationseffizienz der Substrate zusammen, da dies die Gesamtmenge an zugegebenem Vorläuferprotein beeinflusst.



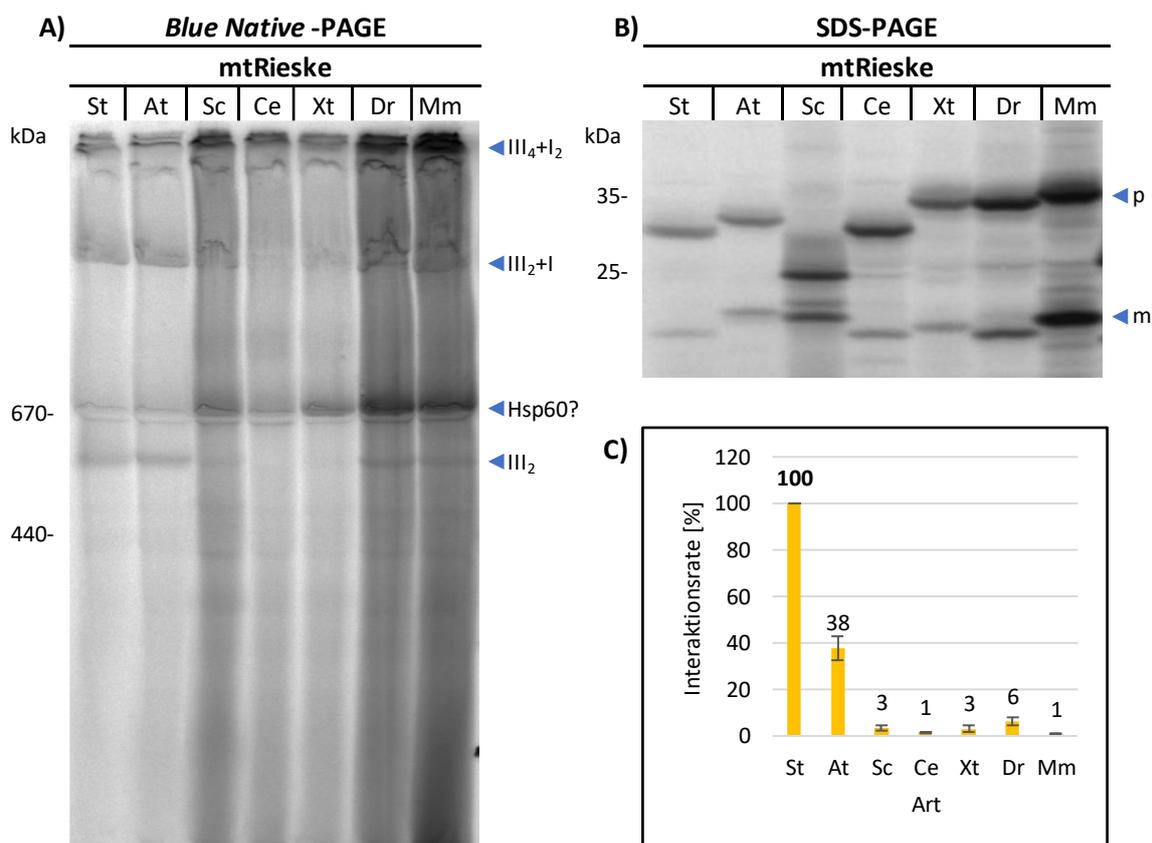
**Abb. E.39: Proteintransport-Versuche mit isolierten Mitochondrien aus *P. sativum* und pflanzlichen, sowie nicht-pflanzlichen mtRieske-Proteinen.**

Um den Proteintransport mitochondrialer Rieske-Proteine aus verschiedenen pflanzlichen und nicht-pflanzlichen Spezies mit isolierten Mitochondrien aus *Pisum sativum* (M) zu überprüfen, wurden diese zusammen mit radioaktiv markierten Vorläuferproteinen inkubiert. Getestet wurden die mtRieske-Proteine aus *Solanum tuberosum* (St), *Arabidopsis thaliana* (At), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Caenorhabditis elegans* (Ce), *Xenopus tropicalis* (Xt), *Danio rerio* (Dr) und *Mus musculus* (Mm). Zur Kontrolle der eingesetzten Substrate wurden die entsprechenden *in vitro*-Translationsprodukte (T) auch ohne Zugabe von Mitochondrien überprüft. Die Importansätze wurden halbiert, wobei jeweils eine Probe unbehandelt blieb (- ProK) und der anderen 0,02 % Proteinase K zugegeben wurde (+ ProK). Die in den Proben enthaltenen Proteine wurden denaturiert und in einem 10-17,5 %igen SDS-PA-Gradientengel separiert. Das anschließend getrocknete Gel diente der autoradiographischen Detektion der radioaktiv markierten Proteine. Gekennzeichnet sind die Banden auf Laufhöhe der jeweilig zugegebenen Substrate ( $\triangleleft$  p) und der entsprechenden mitochondrialen Prozessierungsprodukte ( $\triangleleft$  m). Die Referenzwerte des verwendeten Größenstandards sind links in kDa angegeben.

Nach der Importkontrolle der verschiedenen mtRieske-Proteine wurden die für Transportversuche genutzten Mitochondrien mittels BN-PAGE und SDS-PAGE analysiert. Auf diese Weise kann die Interaktionsfähigkeit der importierten Substrate mit den detektierten Proteinkomplexen und die Gesamtmenge an prozessiertem Protein zueinander in Bezug gesetzt werden, was eventuell Hinweise über die Interaktionseffizienz der heterologen Rieske-Proteine mit der mitochondrialen Tat-Translokase aus *P. sativum* liefern könnte. Die Ergebnisse der SDS-PAGE ähneln den zuvor erhaltenen Ergebnissen der Importkontrolle. Alle Substrate werden mit der gleichen Effizienz wie zuvor in Abbildung E.39 beobachtet translatiert, importiert und prozessiert (siehe Abb. E.40 B). Nach erfolgter BN-PAGE können für St-, At-, Dr- und Mm-mtRieske radioaktiv markierte Proteinkomplexe detektiert werden, die auf eine Interaktion mit mtTat oder einen Einbau dieser Substrate in Komplex III bzw. die Superkomplexe hindeuten (siehe Abb. E.40 A). Die restlichen Substrate, also Sc-, Ce- und Xt-mtRieske, sowie Dr- und Mm-mtRieske zeigen zudem eine Interaktion mit einem Proteinkomplex von ca. 670 kDa.

Die jeweiligen quantifizierten Signale auf Höhe des Komplex III-Dimers und Superkomplex III<sub>2</sub>+I können nun mit den entsprechenden Mengen an prozessiertem Protein in Relation gesetzt werden. Wird die Interaktionseffizienz des mtRieske aus *S. tuberosum* (laborinterner Standard) als Referenz festgelegt,

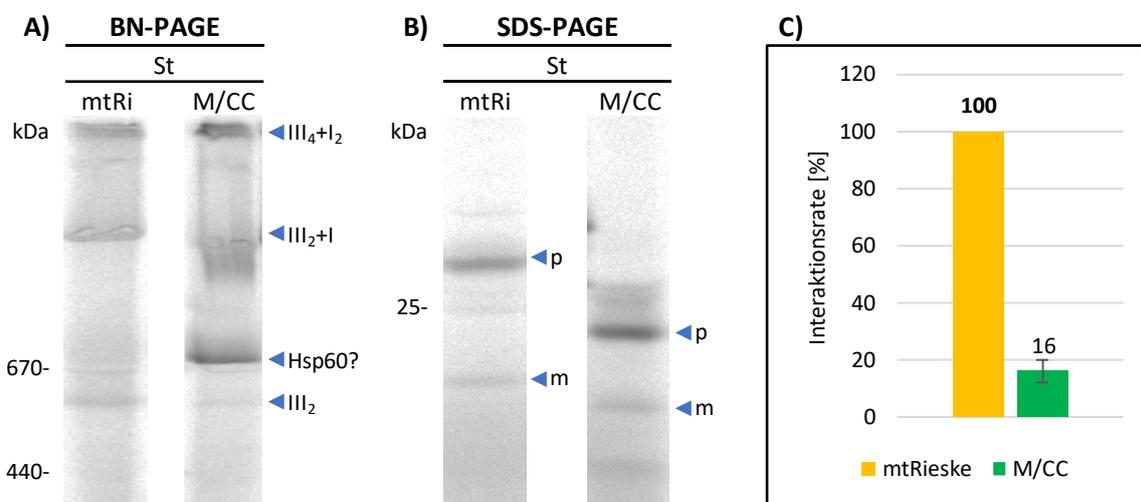
zeigen alle weiteren Substrate eine deutlich geringere Interaktion des reifen Proteins mit den untersuchten Proteinkomplexen (siehe Abb. E.40 C). Lediglich At-mtRieske, als einziges ebenfalls pflanzliches mtRieske-Protein in dieser Testreihe, erreicht knapp 40 % des Referenzwertes, wohingegen die nicht-pflanzlichen mtRieske-Proteine alle weniger als 10 %, meist weniger als 5 % der Interaktionseffizienz von St-mtRieske besitzen.



**Abb. E.40: Interaktionsrate zwischen mtRieske-Proteinen verschiedener Spezies und pflanzlichem Komplex III.**

Um die Interaktionsfähigkeit von mtRieske-Proteinen verschiedener Spezies mit Komplex III aus Pflanzen zu untersuchen, wurden isolierte Mitochondrien aus *Pisum sativum* zunächst mit radioaktiv markierten mtRieske-Vorläuferproteinen aus *Solanum tuberosum* (St), *Arabidopsis thaliana* (At), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Caenorhabditis elegans* (Ce), *Xenopus tropicalis* (Xt), *Danio rerio* (Dr) und *Mus musculus* (Mm) inkubiert. Nach erfolgtem Proteintransport wurden alle Ansätze zur Analyse mittels **A** 5-13,5 % BN-PA-Gradientengel (jeweils Mitochondrien  $\triangleq$  200  $\mu$ g Gesamtprotein eingesetzt, solubilisiert in 5 % Digitonin) und **B** 10-17,5 % SDS-PA-Gradientengel (jeweils Mitochondrien  $\triangleq$  50  $\mu$ g Gesamtprotein eingesetzt) in jeweils zwei Proben geteilt. Die getrockneten Gele dienten der autoradiographischen Detektion der radioaktiv markierten Proteine. Es konnten nach erfolgter BN-PAGE unter anderem der Komplex III-Dimer (◀ III<sub>2</sub>), Superkomplexe aus Komplex III und Komplex I (◀ III<sub>2</sub>+I bzw. ◀ III<sub>4</sub>+I<sub>2</sub>) und eventuell Hsp60 (◀ Hsp60?) erkannt werden. Gekennzeichnet sind außerdem die Banden auf Laufhöhe der jeweiligen mtRieske-Vorläuferproteine (◀ p) und der mitochondrialen Prozessierungsprodukte (◀ m). Die Referenzwerte des verwendeten Größenstandards sind jeweils links in kDa angegeben. **C** Zur Berechnung der relativen Interaktionsrate [%] der prozessierten Substrate mit Komplex III wurden die quantifizierten Signalintensitäten vom Komplex III-Dimer (◀ III<sub>2</sub>) und dem Superkomplex (◀ III<sub>2</sub>+I) einer jeweiligen mtRieske-Spezies summiert und anschließend der Anteil dieser Summe an der Signalintensität des dazugehörigen prozessierten Proteins (◀ m) berechnet. Grafisch dargestellt sind die relativen Interaktionsraten der mtRieske-Proteine unterschiedlicher Spezies mit pflanzlichem Komplex III, mit mtRieske aus *S. tuberosum* als Bezugsgröße (n = 2, inklusive Standardabweichung).

Das ebenfalls aus *S. tuberosum* stammende cpRieske kann in Form des rekombinanten Konstruktes M/CC in isolierte Mitochondrien importiert und dort prozessiert werden (siehe Abb. E.41 B). Nach Separation der Membrankomplexe mittels BN-PAGE können auch hier die Komplexe auf Höhe von Komplex III und den Superkomplexen erkannt werden (siehe Abb. E.41 A). Darüber hinaus wird ein weiterer Komplex auf Höhe von etwa 690 kDa detektiert, welcher bereits zuvor bei einem Import von M/MC in isolierte Mitochondrien beschrieben wurde (siehe Abb. E.35 B). Das cpRieske-basierte Konstrukt M/CC erreicht etwa 16 % des Referenzwertes von mtRieske und hat damit eine höhere Interaktionseffizienz als die mitochondrialen Rieske-Proteine nicht-pflanzlicher Organismen, aber immer noch eine deutlich geringere Effizienz als das mtRieske aus *S. tuberosum* und *A. thaliana* (siehe Abb. E.41 C).



**Abb. E.41: Interaktionsrate zwischen cpRieske und Komplex III.**

Um die Interaktionsfähigkeit des plastidären Rieske-proteins mit dem mitochondrialen Komplex III zu untersuchen, wurden isolierte Mitochondrien aus *Pisum sativum* zunächst mit dem radioaktiv markierten Konstrukt aus dem Importsignal von mtRieske aus *Solanum tuberosum* (St) und dem reifen Teil des plastidären Rieske-Proteins aus *S. tuberosum* (M/CC) inkubiert. Als Referenz diente ein gleicher Transportansatz mit dem mtRieske-Vorläuferprotein (mtRi) aus *S. tuberosum*. Nach erfolgtem Proteintransport wurden beide Ansätze zur Analyse mittels **A** 5-13,5 % BN-PA-Gradientengel (jeweils Mitochondrien  $\cong$  200  $\mu$ g Gesamtprotein eingesetzt, solubilisiert in 5 % Digitonin) und **B** 10-17,5 % SDS-PA-Gradientengel (jeweils Mitochondrien  $\cong$  50  $\mu$ g Gesamtprotein eingesetzt) in jeweils zwei Proben geteilt. Die getrockneten Gele dienen der autoradiographischen Detektion der radioaktiv markierten Proteine. Es konnten nach erfolgter BN-PAGE unter anderem der Komplex III-Dimer (◀ III<sub>2</sub>), Superkomplexe aus Komplex III und Komplex I (◀ III<sub>2</sub>+I bzw. ◀ III<sub>4</sub>+I<sub>2</sub>) und eventuell Hsp60 (◀ Hsp60?) erkannt werden. Gekennzeichnet sind außerdem die Banden auf Laufhöhe der jeweiligen mtRieske-Vorläuferproteine (◀ p) und der mitochondrialen Prozessierungsprodukte (◀ m). Die Referenzwerte des verwendeten Größenstandards sind jeweils links in kDa angegeben. Weiße Lücken in den Abbildungen verdeutlichen, dass dort verschiedene Bereiche des gleichen Gelbildes zusammengefügt wurden. **C** Zur Berechnung der relativen Interaktionsrate [%] der prozessierten Substrate von M/CC bzw. mtRieske mit Komplex III wurden die jeweilig quantifizierten Signalintensitäten vom Komplex III-Dimer (◀ III<sub>2</sub>) und dem Superkomplex (◀ III<sub>2</sub>+I) summiert und anschließend der Anteil dieser Summe an der Signalintensität des dazugehörigen prozessierten Proteins (◀ m) berechnet. Grafisch dargestellt ist die relative Interaktionsrate des prozessierten M/CC mit Komplex III, mit mtRieske aus *S. tuberosum* als Bezugsgröße (n = 2, inklusive Standardabweichung).

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen sehr deutlich, dass nicht-pflanzliche mtRieske-Proteine zwar mit hoher Effizienz in pflanzliche Mitochondrien aus Erbse importiert, nach erfolgter Prozessierung aber nicht in Komplex III eingebaut werden bzw. nicht mit einem pflanzlichen mtTat-Komplex interagieren können. Selbst das ebenfalls pflanzliche At-mtRieske, wie auch das chloroplastidäre Homolog St-cpRieske weisen eine deutlich schwächere Interaktionseffizienz als das Referenzprotein St-mtRieske auf.

## 4. Diskussion

### 4.1. Die mitochondriale Tat-Translokase in Pflanzen

Im Laufe der Etablierung endosymbiontischer Organellen aus ihren bakteriellen Vorläufern, sind etliche Umstrukturierungen sowohl in der Wirtszelle als auch in den entstehenden Organellen erforderlich gewesen. So mussten sich beispielsweise die verschiedenen Stoffwechselwege aneinander anpassen, Regulationsmechanismen entwickeln oder Membrantransporter für ein breites Spektrum von Biomolekülen etablieren (Archibald, 2015). Hierzu zählen nicht nur Metabolite und Ionen, sondern auch zytosolisch translatierte Organell-Proteine, welche in Folge von Gentransfer-Ereignissen im Wirtszellgenom codiert sind (Dudek *et al.*, 2013). Während sich die Proteinimportmaschinerien in den Hüllmembranen von Mitochondrien und Chloroplasten im Laufe der Evolution vermutlich zum Teil *de novo* entwickelt haben (Dolezal *et al.*, 2006, Day und Theg, 2018), waren für einen Proteintransport innerhalb der Organellen bereits einige bakterielle Exportmaschinerien vorhanden, welche für einen Proteintransport innerhalb der Organellen erhalten blieben.

Die mitochondrialen Vorläufer, Alphaproteobakterien (Gray, 1999, Eme *et al.*, 2017), besitzen drei Exportmaschinerien: Sec, YidC und Tat (Petrů *et al.*, 2018), von welchen in Eukaryoten jedoch nur YidC in Form des Homologes Oxa1 hochkonserviert ist (Szyrach *et al.*, 2003). Ein mitochondriales Sec-System konnte bisher nur in Jakobiden nachgewiesen werden (Burger *et al.*, 2013), und auch das mitochondriale Tat-System ging vermutlich während mehrerer unabhängiger Ereignisse verloren (Pett und Lavrov, 2013), weshalb dessen Untereinheiten innerhalb der Eukaryoten nur sehr unregelmäßig nachgewiesen werden können (Petrů *et al.*, 2018). Da der Transport gefalteter Proteine für die Funktion und Vitalität eukaryotischer Zellen jedoch zwingend erforderlich ist, konnte der Verlust des bereits vorhandenen mtTat-Systems nur mit der Etablierung einer alternativen Translokase einhergehen. Für Säugetiere und Pilze konnte gezeigt werden, dass die AAA-ATPase Bcs1 anstelle von Tat den Transport des gefalteten Rieske-Proteins in Mitochondrien übernimmt, und ein mitochondriales Tat-System im Laufe der Evolution funktional ersetzt hat (Wagener *et al.*, 2011). Allerdings beschränkt sich diese Feststellung wohl nur auf Opisthokonta (hierzu zählen mehrzellige Tiere, Pilze und einige nahverwandte, eukaryotische Einzeller), denn eine besonders bemerkenswerte Entdeckung war die Existenz einer funktionalen Tat-Translokase in den Mitochondrien höherer Pflanzen, welche demnach weiterhin auf ein bakterienähnliches Translokationssystem zurückgreifen (Carrie *et al.*, 2016, Schäfer *et al.*, 2020).

Doch weshalb haben pflanzliche Mitochondrien eine Tat-Translokase behalten, während ein solches System in den Mitochondrien der meisten Opisthokonta durch Bcs1 abgelöst wurde? Und inwieweit ähnelt die Tat-Translokase pflanzlicher Mitochondrien noch der aus Bakterien oder der aus Chloroplasten? Schließlich haben hauptsächlich die beachtlichen Unterschiede zwischen den TatC- und TatB-Untereinheiten der mitochondrialen und der thylakoidären bzw. bakteriellen Tat-Translokase erst zu dieser vergleichsweise späten Entdeckung geführt (Sünkel *et al.*, 1994, Unseld *et al.*, 1997, Bentolila *et al.*, 2013, Carrie *et al.*, 2016).

#### 4.1.1. Relevanz von mitochondrial lokalisiertem TatA

Die allermeisten Tat-Systeme, beispielsweise aus Bakterien und Thylakoiden, benötigen drei Untereinheiten zur Translokation gefalteter Substrate: TatA, TatB und TatC (Müller und Klösigen, 2005). In pflanzlichen Mitochondrien konnten anfangs jedoch nur mtTatC und mtTatB identifiziert werden und es wurde, aufgrund fehlender Hinweise auf ein mitochondriales TatA, erstmals ein TatBC-Komplex als funktionale Translokase postuliert (Carrie *et al.*, 2016). Etwas später konnte allerdings gezeigt werden, dass das kerncodierte TatA *dual targeting*-Eigenschaften besitzt, und in geringen Mengen auch in pflanzliche Mitochondrien importiert wird (Bennewitz *et al.*, 2020). Es scheint daher also durchaus möglich, dass TatA in Pflanzen auch an der mtTat-Translokation beteiligt sein könnte.

Mittels Immundetektion wurde jedoch eindeutig gezeigt, dass eine Tat-Translokation in Mitochondrien von *A. thaliana* auch ohne TatA-Beteiligung ablaufen kann (siehe Kap. 3.2.3.1), denn die Deletion von *TatA* hatte keinen Einfluss auf den Einbau von mtRieske in Komplex III. Importversuche mit isolierten Mitochondrien haben jedoch ergeben, dass eine TatA-Vorbeladung der mitochondrialen Matrix einen positiven Einfluss auf die Translokation von mtRieske hat (siehe Kap. 3.2.3.2). Zum intrinsischen TatA zusätzlich importiertes TatA ist für die Translokation also förderlich, auch wenn der Unterschied insgesamt nur gering ausfällt. Beide Ergebnisse deuten auf einen eher niedrigen TatA-Bedarf in Mitochondrien hin, was mehrere Gründe haben könnte.

Eine Theorie bezieht sich auf den im Vergleich zu *E. coli*-TatB deutlich längeren C-Terminus von mtTatB. Es wurde bereits vermutet, dass mtTatB eine bi-funktionale Rolle einnehmen und die Funktion von TatA übernehmen könnte (Carrie *et al.*, 2016). Einen deutlichen Hinweis hierauf gab es durch Schäfer *et al.* (2020), in deren Publikation anhand von mtTatB-Kürzungsmutanten gezeigt wurde, dass der C-Terminus essentiell für die mtRieske-Translokation und eine Deletion der letzten 64 Aminosäuren für die Pflanze daher letal ist. Ein derartiger Einfluss konnte in *E. coli* nicht beobachtet werden, da sogar ein um 70 Aminosäuren verkürzter C-Terminus von EcTatB weiterhin einen Proteintransport unterstützt (Lee *et al.*, 2002), was eine besondere Funktion des C-Terminus von pflanzlichem mtTatB

vermuten lässt. Auch für plastidäres TatB konnte unter experimentellen Bedingungen eine mögliche Bi-Funktionalität gezeigt werden. Wird das intrinsische TatA isolierter Thylakoide durch Antikörper blockiert und der Proteintransport auf diese Weise inhibiert, kann durch die Zugabe von heterolog synthetisiertem cpTatB der Transport rekonstituiert werden (Dissertation Zinecker, 2020). TatA aus *Bacillus subtilis* ist zudem in der Lage, sowohl eine *TatAE*- als auch eine *TatB*-Deletion in *E. coli* zu komplementieren (Barnett *et al.*, 2008), was ebenfalls für die Möglichkeit zur Entwicklung einer Bi-Funktionalität zwischen Vertretern der TatAB-Proteinfamilie, dazu zählen TatA, TatB und TatE (Palmer und Berks, 2012), sprechen könnte.

Eine weitere Möglichkeit wäre ein generell geringerer Bedarf einer Tat-Translokation in Mitochondrien, da in diesen wohl lediglich mtRieske in gefaltetem Zustand transportiert werden muss. Das Spektrum und damit auch die Gesamtmenge an transportierten Tat-Substraten fällt in Thylakoiden und Bakterien allerdings deutlich größer aus (Hou und Brüser, 2011, Palmer und Berks, 2012, New *et al.*, 2018), und somit vermutlich auch die erforderliche Menge an Tat-Komplexen bzw. -Untereinheiten. Allerdings scheint in Mitochondrien TatA im Vergleich zu mtTatB und mtTatC in besonders geringen Konzentrationen vorzuliegen, da es im Gegensatz zu chloroplastidär lokalisiertem TatA immunologisch bisher nicht nachweisbar war, und nur der Einsatz hochsensitiver Methoden zu einer Detektion von TatA in Mitochondrien geführt hat (Bennewitz *et al.*, 2020). Was das Mengenverhältnis von TatA:TatB:TatC in Thylakoiden und Bakterien betrifft, gibt es klare artspezifische und methodologische Unterschiede. TatA kann hierbei im Vergleich zu TatB in 10-fach geringerer Menge (Jakob *et al.*, 2009), etwa äquimolar (Jakob *et al.*, 2009, Mori *et al.*, 1999, Mori *et al.*, 2001) oder im 20- bis 25-fachen Überschuss vorliegen (Jack *et al.*, 2001, Sargent *et al.*, 2001, Berks *et al.*, 2003, Celedon und Cline, 2012). Während der eigentlichen Translokation scheinen im Tat-Komplex TatA, TatB und TatC jedoch im Verhältnis 1:1:1 repräsentiert zu sein, was zu der Hypothese einer coenzymatischen Funktion von TatA, beispielsweise durch Auslösen einer Konformationsänderung im TatBC-Komplex, geführt hat (Hauer *et al.*, 2013, Zinecker *et al.*, 2020). In einem solchen Szenario wären tatsächlich nur geringe Mengen TatA erforderlich, insbesondere zur alleinigen Translokation von mtRieske in pflanzlichen Mitochondrien.

Aus den hier vorgestellten Ergebnissen geht hervor, dass pflanzliche Mitochondrien für eine funktionale Tat-Translokase zwar nicht auf TatA angewiesen sind, aber zusätzliches TatA in der Matrix die Transporteffizienz positiv beeinflusst. Möglicherweise hat eine strukturelle Änderung im mitochondrialen TatB-Protein zu einem Funktionsgewinn geführt und mitochondrial lokalisiertes TatA weniger erforderlich gemacht. Dennoch wird TatA weiterhin in sehr geringen Mengen in pflanzliche Mitochondrien importiert und kann sich dort potentiell am Proteintransport beteiligen. Die Tat-Translokase pflanzlicher Mitochondrien ist damit das erste und bislang einzige identifizierte Tat-

System, welches auch ohne eine Beteiligung von TatA Substrate transportieren kann (Carrie *et al.*, 2016, Petrú *et al.*, 2018). Dies ist besonders insofern interessant, als dass TatA in den postulierten Tat-Translokationsmechanismen eine meist zentrale Rolle übernimmt (siehe Einleitung Kap. 1.2.1.3).

#### 4.1.2. Potentielle Assoziation von mtTat mit Komplex III

Der Einsatz spezifischer Antikörper gegen mtTatB ermöglichte die Immundetektion mehrerer Proteinkomplexe nach erfolgter BN-PAGE (siehe Kap. 3.2.4.1). Hierbei handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um TatBC-Rezeptorkomplexe ohne TatA, welches aufgrund einer vermutlich nur schwachen Interaktion während der Komplex-Präparation herausgelöst wird (Jakob *et al.*, 2009, Dissertation Reimers, 2020), und bislang noch nie in pflanzlichen Tat-Komplexen nachgewiesen werden konnte (z. B. Celedon und Cline, 2012, Cline und Mori, 2001, Jakob *et al.*, 2009). Bereits identifizierte TatBC-Komplexe bewegen sich in einer Größenordnung zwischen 350-600 kDa für *E. coli* bzw. 550-700 kDa für Chloroplasten (siehe Einleitung Kap. 1.2.2.2). Zu mitochondrialen TatBC-Komplexen gibt es bisher leider nur wenige und stark voneinander abweichende Referenzwerte: in Mitochondrien aus *A. thaliana* konnten Carrie *et al.* (2016) einen TatBC-Komplex auf Höhe von ca. 1.500 kDa identifizieren, während Senkler *et al.* (2017) durch Komplexom-Analysen mtTatB in einem Komplex mit ca. 500 kDa nachweisen konnten.

Interessanterweise wurden im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls mtTatB-beinhaltende Proteinkomplexe mit einem Gewicht von etwa 500 und 1.500 kDa detektiert, sowie unter anderem ein hochmolekularer Proteinkomplex mit deutlich über 2.000 kDa (siehe Abb. E.34). Mittels Immundetektion gegen Cytochrom  $c_1$  konnte bestätigt werden, dass es sich bei diesen Komplexen wahrscheinlich um Komplex III und zwei Superkomplexe (inklusive Komplex III) handeln könnte (siehe Abb. E.35) (Eubel *et al.*, 2003). Dass mtTatB zusammen mit Cytochrom  $c_1$  in gleich drei verschiedenen (Super)Komplexen detektiert werden kann, legt zunächst eine potentielle Assoziation der mtTat-Translokase mit Komplex III nahe. Auch die Proteintransportversuche mit radioaktiv markierten mtTat-Substraten deuten auf eine mögliche Assoziation hin. Da der mtTat-vermittelte Re-Export von mtRieske bzw. dem Konstrukt M/MPC nur langsam erfolgt (siehe Abb. E.29), sollte mtTat mit diesen abgesättigt und dementsprechend autoradiographisch detektierbar sein. Beim Transport von mtRieske, M/MPC, M/M16, M/M23 und M/MC sind immer zwei Proteinkomplexe radioaktiv detektierbar, jeweils auf Höhe von Komplex III und Superkomplex  $III_2+I$  (siehe Abb. E.35). Darüber hinaus interagieren die Substrate mit keinen weiteren Proteinkomplex, mit Ausnahme von M/MC. Der zusätzlich detektierte Komplex von ca. 690 kDa ist vermutlich auf eine Assoziation mit Hsp60 zurückzuführen (Dissertation Rödiger, 2010). Möglicherweise handelt es sich bei den in allen Ansätzen detektierten

Proteinkomplexen auf Höhe von Komplex III und dem Superkomplex um mtTat, welches mit den markierten Substraten interagiert. Die Interpretation dieser Proteintransportversuche und eine Identifizierung substratgebundener mtTat-Komplexe ist allerdings deutlich erschwert, da es sich bei mtRieske schließlich um eine Komplex III-Untereinheit handelt und diese daher auch nach erfolgter Translokation in Komplex III und den Superkomplexen detektiert werden sollte. Ob auch die artifiziellen Konstrukte in Komplex III und Superkomplexe eingebaut werden können, ist bislang nicht geklärt. Die Insertion der Rieske-Untereinheiten in den Komplex III-Präkomplex ist wahrscheinlich auch in Pflanzen der letzte Schritt der Komplex III-Biogenese (Zara *et al.*, 2009, Schäfer *et al.*, 2020) und der Rieske-C-Terminus ist für die Assemblierung und Superkomplex-Bildung vermutlich nicht erforderlich (Kapazoglou *et al.*, 2000, Cui *et al.*, 2014). Dennoch ist es eher unwahrscheinlich, dass derart verschiedene Konstrukte mit teilweise deutlich größeren C-Termini als mtRieske (bspw. M/M23 und M/M16) ohne Einschränkungen in Komplex III assembliert werden, was ebenfalls eher für die Bindung dieser Substrate an mtTat-Komplexe statt einer Insertion in Komplex III bzw. einen Superkomplex sprechen könnte.

Auch physiologisch erscheint eine Assoziation von mtTat an Komplex III durchaus sinnvoll: mtTat ist für die Translokation und Assemblierung von mtRieske in Komplex III verantwortlich. Vor dem Tat-vermittelten Transport muss mtRieske jedoch zunächst prozessiert werden, was wiederum durch die Komplex III-integrale MPP-Aktivität geschieht. Das mitochondriale Rieske-Protein wird also von Komplex III zu mtTat und wieder zu Komplex III geleitet, was durch eine räumliche Nähe oder sogar Assoziation dieser zwei Proteinkomplexe vermutlich effizienter ablaufen könnte. Auch für Bcs1, welches prinzipiell die gleiche Funktion ausübt wie mtTat, konnte mittels Co-Immünpräzipitation (Cruciat *et al.*, 1999) und 2D-PAGE (Zara *et al.*, 2009, Zara *et al.*, 2007) eine unter ATP-Verbrauch ablaufende Interaktion mit Komplex III-Komponenten nachgewiesen werden. Dass sich Proteine entsprechend ihrer Funktion positionieren (Vogel *et al.*, 2006) und zusammenarbeitende Komplexe (bspw. gleicher Stoffwechselwege) zusammenlagern können, wie auch in der Form respiratorischer Superkomplexe, ist bereits bekannt (Eubel *et al.*, 2004, Braun, 2020).

Bei einem vergleichbaren Proteintransport mit den aus *S. oleracea* isolierten Mitochondrien konnte ein weiterer Komplex mit einem Molekulargewicht von etwa 350 kDa detektiert werden, welcher sowohl radioaktiv markiertes Substrat gebunden hat als auch mtTatB enthält (siehe Abb. E.34). Tatsächlich zeigt dieser Komplex im Vergleich das stärkste Signal in der mtTatB-Immündetektion. Es könnte sich hierbei um einen reinen mtTatBC-Komplex handeln, der damit im Vergleich zu bakteriellen und plastidären TatBC-Komplexen wesentlich kleiner ausfallen würde. Allerdings kann zum Beispiel für plastidäre TatBC-Komplexe beobachtet werden, dass es während der Solubilisierung zur Dissoziation einzelner TatB-Untereinheiten und somit geringerer Molekulargewichte kommen kann. Der kleinste

noch cpTatB-beinhaltenen Komplex zeigte ebenfalls ein Molekulargewicht von etwa 350 kDa (Jakob *et al.*, 2009, Dissertation Reimers, 2020). Denkbar wäre daher auch in Mitochondrien die Detektion eines unvollständigen mtTat-Komplexes mit einem ähnlichen Molekulargewicht.

Um die hier nachgewiesenen Proteinkomplexe zweifelsfrei als mitochondriale Tat-Translokasen zu identifizieren und eine mögliche Assoziation mit Komplex III aufzuklären, wären weitere Analysen (z. B. mittels Massenspektrometrie) notwendig. Bisherige Untersuchungen an Komplex III und den mitochondrialen Superkomplexen ergaben jedoch keine Hinweise auf mitochondriale Tat-Untereinheiten (Meyer *et al.*, 2008, Klodmann und Braun, 2011, Klodmann *et al.*, 2010, Peters *et al.*, 2013).

#### **4.1.3. Translokation in Abhängigkeit von der PMK und einem KR-Motiv**

Aufgrund der besonderen Zusammensetzung der mitochondrialen Tat-Translokase in Pflanzen, die im Vergleich zum plastidären oder bakteriellen Tat-System auch ohne eine TatA-Untereinheit funktionsfähig ist (siehe Kap. 3.2.3.1) und eventuell an Komplex III assoziiert vorliegt (siehe Kap. 3.2.4), könnte es auch Unterschiede im generellen Translokationsprozess geben.

Die Translokationseffizienz der plastidären und bakteriellen Tat-Translokase hängt in aller Regel stark vom transportierten Substrat ab. Beispielsweise werden die 16kDa- und 23kDa-Untereinheiten (OEC16 bzw. OEC23) des wasserspaltenden Komplexes (*oxygen-evolving complex*) nach deren Import ins Stroma vergleichsweise zügig in die Thylakoide weitertransportiert (Clausmeyer *et al.*, 1993). Im Falle von OEC16 lässt sich dies anhand des stromalen Prozessierungsintermediates nachvollziehen, welches *in vitro* unter idealen Transportbedingungen nicht detektiert wird, was auf einen raschen Weitertransport nach der initialen Prozessierung im Stroma schließen lässt (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Rieske-Fe/S-Proteine pflanzlicher Organellen werden hingegen mit deutlich geringerer Effizienz über die Membran transportiert (Molik *et al.*, 2001), was sich im zeitlichen Verlauf gut beobachten lässt (siehe Kap. 3.2.2) und in einer zeitintensiven Assemblierung in Komplex III widerspiegelt (Carrie *et al.*, 2016). Die Rieske-Proteine in Thylakoiden und Mitochondrien durchlaufen im Stroma bzw. in der Matrix eine aufwendige Reifung, welche neben der initialen Prozessierung die Assemblierung eines [2Fe-2S]-Clusters und abschließend die Faltung des C-Terminus beinhaltet (Nuccio *et al.*, 1998, Lill und Mühlhoff, 2006, Mühlhoff *et al.*, 2011, Fernandez-Vizarra und Zeviani, 2018, Przybyla-Toscano *et al.*, 2018). Zudem, oder eventuell bedingt durch diesen vergleichsweise zeitintensiven Reifungsprozess (Dissertation Molik, 2005), besitzen die Rieske-Proteine in höheren Pflanzen ein hochkonserviertes KR-Motiv anstelle des üblichen RR-Motivs, welches in bakteriellen Rieske-Proteinen (darunter Cyanobakterien und Alphaproteobakterien) noch zu finden ist. Der Austausch einzelner oder

mehrerer Basen im RR-Motiv, selbst durch ebenfalls positiv geladene Lysin-Reste, hat einen gravierenden Effizienzverlust und teilweise eine komplette Inhibierung der Tat-Translokation zur Folge (Chaddock *et al.*, 1995, DeLisa *et al.*, 2002, Kreutzenbeck *et al.*, 2007). Doch wie entscheidend ist das KR-Motiv im speziellen Fall von mtRieske? Und kann durch eine Mutation des authentischen KR-Motivs hin zum „ursprünglichen“ RR-Motiv ein effizienterer Proteintransport erreicht werden?

Erstaunlicherweise hatten die in dieser Arbeit getesteten Mutationen im Erkennungsmotiv von mtRieske einen deutlich geringeren Einfluss, als es für andere Substrate und Organismen bisher beschrieben wurde. Die Interaktionsrate liegt bei einer Änderung von KR zu einem RR-, KK- oder AA-Motiv bei +/-10 % der ursprünglichen Rate. Sogar bei einer Mutation zu einem EE-Motiv läuft die Interaktion mit mtTat noch etwa halb so effizient ab (siehe Kap. 3.3.1). Ein ähnliches Bild zeigen die entsprechenden Erkennungsmotivmutanten von M/MPC mit Ausnahme von M/MPC-EE, welches immerhin auf etwa 80 % der Ausgangsrate kommt. Wird hingegen der Re-Export der M/MPC-Varianten mittels Cystein-Modifizierung untersucht, sinkt die Transportrate durch eine Mutation zu EE auf etwa 30 %, bei einer Mutation zu AA auf etwa 60 % und bei einem Austausch zu KK kommt es zu keiner Änderung im Re-Export. Die Re-Exportrate von M/MPC-EE und dessen ermittelte Interaktionsrate mit mtTat stehen scheinbar im Widerspruch zueinander. Allerdings sind Interaktion bzw. Komplexbindung und tatsächlicher Re-Export nicht miteinander gleichzusetzen, sodass M/MPC-EE tatsächlich effizienter an mtTat binden, jedoch weniger effizient transloziert werden könnte. Dies ist aufgrund der vermuteten Funktion des Tat-Motivs als Erkennungssignal und dessen Position am nicht translozierten N-Terminus jedoch eher unwahrscheinlich, zudem kam es im Falle von mtRieske durch die Mutation von KR zu EE zu einer deutlich verringerten Interaktionseffizienz. Der detektierte Re-Export und die ermittelte Interaktionsrate mit mtTat sind darüber hinaus nur schwer miteinander zu vergleichen, da sich die Interaktionsrate der Substrate mit mtTat aufgrund der potentiellen Assoziation von mtTat und Komplex III bzw. den Superkomplexen (dies wird in Kap. 4.1.2 weiter diskutiert) sowohl aus den an mtTat-gebundenen als auch den in Komplex III assemblierten Substraten zusammensetzen könnte.

Die Ergebnisse der Re-Exporteffizienz zeigen allerdings deutlich, dass eine Mutation von KR zu RR keinen positiven Einfluss auf die Transportrate von M/MPC hat, obwohl bei diesem Konstrukt keine ablaufende Cofaktor-Assemblierung die Transportgeschwindigkeit einschränken könnte. Auch mtRieske kann durch ein RR-Motiv nicht effizienter mit mtTat interagieren bzw. in Komplex III inseriert werden, was auch bereits am plastidären Rieske festgestellt werden konnte (Molik, 2000). Eine weitere bedeutende Feststellung ist, dass Mutationen im KR-Motiv von mtRieske keinen derart inhibierenden Effekt zeigen, wie es für den Großteil bakterieller und plastidärer Tat-Substrate der Fall ist. Carrie *et al.* (2016) konnten ebenfalls anhand von mtRieske-QQ zeigen, dass der Einbau dieser Mutante in Komplex III zwar deutlich beeinträchtigt ist, aber generell weiterhin abläuft. In *E. coli* ist hingegen

bereits eine Mutation von einem KR- zu einem KQ-Motiv letal, da der Transport mittels Tat mit diesem Motiv nicht ablaufen kann (Kreutzenbeck *et al.*, 2007). Wie schon von Petrů *et al.* (2018) postuliert, könnte das vermeintliche Tat-Motiv (KR) im pflanzlichen mtRieske weniger für die Translokation, als vielmehr für eine korrekte, ladungsbedingte Positionierung der TMD innerhalb der Membran oder im Komplex III erforderlich sein. Da die hier diskutierten Ergebnisse eine solche Hypothese unterstützen, könnte die Bezeichnung „Tat-Translokase“ im Falle pflanzlicher Mitochondrien demnach hinterfragt werden. Bevor der *twin arginine translocation pathway* (Tat) aufgrund des hochkonservierten Zwillingsarginin-Motivs umbenannt wurde, war dieser bei seiner Entdeckung zunächst als  $\Delta$ pH-abhängiger Transportweg beschrieben (Klöggen *et al.*, 1992, Müller und Klöggen, 2005). Eine solche Bezeichnung wäre im Falle pflanzlicher Mitochondrien vermutlich treffender, da durch den Einsatz geeigneter Inhibitoren eine Abhängigkeit vom transmembranen  $\Delta$ pH festgestellt werden konnte (siehe Kap. 3.2.1, Carrie *et al.*, 2016). Dies ist vermutlich auch unter den mitochondrialen Proteintransportern ein Alleinstellungsmerkmal, wohingegen das KR-Motiv anscheinend keine eindeutige Erkennungsfunktion mehr besitzt.

## **4.2. Gleiches Ziel, anderer Weg – Bcs1 in Opisthokonta**

Statt einer mtTat-Translokase verfügen die Mitochondrien aus Opisthokonta über ein Bcs1-System, welches den Membrantransport des gefalteten mtRieske-Proteins und dessen Assemblierung in Komplex III ausführt. Doch wie und weshalb hat Bcs1 die mitochondriale Tat-Translokase abgelöst, und wieso ist es gerade in Pflanzen nicht zu einer solchen Entwicklung gekommen?

### **4.2.1. Zur Herkunft von Bcs1**

Aufgrund ihrer Abstammung von den Alphaproteobakterien, besaßen die Mitochondrien erster Eukaryoten zunächst eine vollständig im mitochondrialen Genom codierte Tat-Translokase (Petrů *et al.*, 2018). Vermutlich nach der Abspaltung der Pflanzen hat sich innerhalb der Opisthokonta das Bcs1-System als Proteintransporter etablieren können, sodass es wahrscheinlich zu einer graduellen Abnahme der Relevanz einer mitochondrialen Tat-Translokase (Petrů *et al.*, 2018), und in mehreren unabhängigen Ereignissen zu einem Verlust der letzten noch mitochondrial codierten Untereinheit TatC kam (Pett und Lavrov, 2013, Carrie *et al.*, 2016). Tatsächlich lässt sich in den Mitochondrien der meisten Opisthokonta nur noch eines dieser beiden identifizieren: entweder ein vollständiges Bcs1-System, oder mtTat (Carrie *et al.*, 2016). Zwar kann auch in pflanzlichen Mitochondrien, welche

bewiesenermaßen ein funktionales mtTat-System besitzen, eine Bcs1-ähnliche AAA-ATPase (AtOM66) aufgrund von Sequenzhomologien zu Bcs1 aus *S. cerevisiae* und *Homo sapiens* identifiziert werden (Visapää *et al.*, 2002, Hinson *et al.*, 2007, Nobrega *et al.*, 1992), diese ist jedoch in der äußeren Hüllmembran lokalisiert, besitzt keine Bcs1-Domäne und ist auch nicht am Proteintransport beteiligt (Zhang *et al.*, 2014a). Die Sequenzübereinstimmungen zwischen Bcs1 und AtOM66 beschränken sich insbesondere auf die AAA-Domäne. Da allerdings die AAA-Domänen der meisten AAA-ATPasen lediglich Strukturhomologe sind und nur wenig bis gar keine Sequenzidentität aufweisen (Khan *et al.*, 2022), könnte AtOM66 möglicherweise der gleichen Klade von AAA-ATPasen wie Bcs1 angehören, oder sogar einem Bcs1-Vorläufer entsprechen. Hierzu müsste jedoch nach erfolgter Genduplikation und Ausbildung einer Bcs1-Domäne auch eine Umpositionierung in die innere Hüllmembran erfolgt sein. Tatsächlich scheint es innerhalb der Pflanzen zu mehreren solcher Genduplikationen gekommen zu sein, da in *A. thaliana* insgesamt 36 Paraloge des Bcs1-ähnlichen Proteins AtOM66 festgestellt wurden (Frickey und Lupas, 2004). In Tieren ist Bcs1 hingegen in nur einem und in Pilzen in zwei paralogenen Genen codiert. Sollte es sich bei AtOM66 also um einen potentiellen Vorläufer von Bcs1 handeln, kam es offenbar nur in den Opisthokonta nach erfolgter Genduplikation zur Etablierung eines Bcs1-Transportsystems, während die in Pflanzen stattgefundenen Duplikationen keinen derartigen Einfluss hatten.

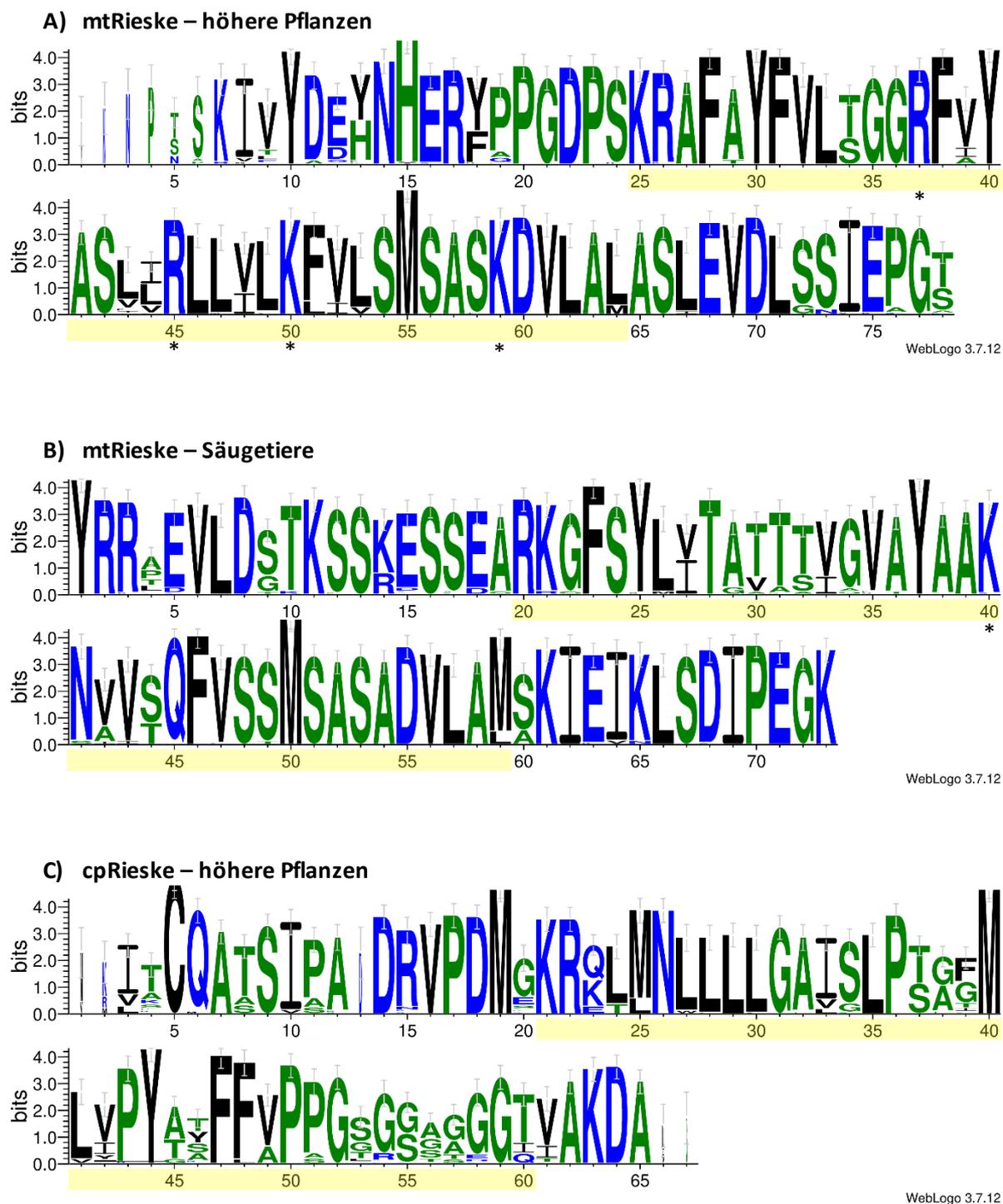
#### **4.2.2. Unterschiede in der SAD von mtRieske aus Pflanzen und Opisthokonta**

Da Änderungen im vermeintlichen Tat-Erkennungsmotiv von mtRieske einen deutlich geringeren Einfluss auf dessen Interaktions- und Transporteffizienz hatten, als es im Allgemeinen für Tat-Substrate der Fall ist (siehe Kap. 3.3.1), könnten eventuell andere Erkennungsmotive oder Proteinabschnitte eine Translokation über mtTat vermitteln. Aufgrund der hohen Konserviertheit von mtRieske-Proteinen höherer Pflanzen (mit Ausnahme des Importsignals), ist die Identifizierung einzelner interessanter Sequenzbereiche nicht ohne weiteres möglich (siehe Anhang Abb. A.5). Es könnte allerdings zu signifikanten Sequenzunterschieden zwischen mtRieske aus Pflanzen und Säugern (oder anderen Opisthokonta) kommen, welche möglicherweise Hinweise auf potentielle Erkennungsmuster der mittels mtTat bzw. Bcs1 transportierten mtRieske-Proteine liefern. Darüber hinaus lassen sich durch einen Vergleich der mtRieske-Sequenzen von Pflanzen und Säugern bzw. Opisthokonta eventuell Rückschlüsse auf die Evolution von Bcs1 ziehen.

Wie sich anhand einer phylogenetischen Analyse der Rieske-Proteine aus höheren Pflanzen und Säugetieren ergibt, können drei deutliche Gruppen voneinander abgegrenzt werden: die plastidären Rieske-Proteine sowie die näher zueinander verwandten mtRieske-Proteine aus Pflanzen und Säugern

(siehe Anhang Abb. A.6). Da also insgesamt ausreichende Unterschiede zwischen den Rieske-Proteinen dieser drei genannten Gruppen bestehen und diese jeweils eine hohe Konserviertheit innerhalb dieser Gruppen aufweisen, wurden anschließend Sequenzlogos der einzelnen Gruppen erstellt, um diese miteinander zu vergleichen. Hierbei wurde sich besonders auf die ersten 40 Aminosäuren ab dem KR-Motiv konzentriert, da dieser Bereich die komplette Signalankerdomäne (SAD) beinhaltet und bis kurz vor den gefalteten C-Terminus reicht. Im betrachteten Abschnitt sind die mtRieske-Proteine untereinander deutlich konservierter als die cpRieske-Proteine (siehe Abb. D.1). Bei einem direkten Vergleich der mtRieske-Sequenzlogos von Säugern und Pflanzen fallen insgesamt keine großen Übereinstimmungen auf, mit Ausnahme eines vergleichsweise konservierten Abschnitts im hinteren Teil des hervorgehobenen Bereichs (S-A-S-x-D-V-L-A). An der Position des KR-Motivs vom pflanzlichen mtRieske steht bei den Säugern ein hierzu invertiertes RK-Motiv, welches im Falle anderer Substrate anstelle des RR-Motivs keinen Tat-Transport vermitteln kann und somit vermutlich kein funktionales Tat-Motiv darstellt (Chaddock *et al.*, 1995). Was bei genauer Betrachtung der Sequenzlogos außerdem auffällt, sind die übermäßig vielen positiv geladenen Aminosäurereste in der SAD pflanzlicher mtRieske-Proteine. Dort befinden sich (zusätzlich zum initialen KR-Motiv) vier weitere positive Reste (je zwei Arginine und Lysine), wohingegen derselbe Sequenzbereich bei Säugetieren (und anderen Opisthokonta, siehe Anhang Abb. A.5) nur ein einziges Lysin enthält (jeweils mit \* markiert). Bei cpRieske kann keine konservierte Aminosäure mit positiver Ladung in diesem Bereich identifiziert werden.

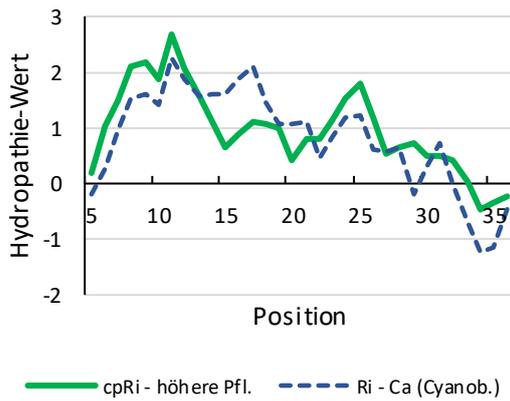
Vergleicht man allerdings die Hydrophobie der jeweiligen Gruppen in dem beschriebenen Sequenzbereich, ist das pflanzliche mtRieske dennoch wesentlich hydrophober als mtRieske aus Säugern und anderen Opisthokonta, was sich besonders mittig im betrachteten Sequenzabschnitt zeigt (siehe Abb. D.2 C). Auch cpRieske besitzt sehr hydrophobe Bereiche, allerdings vor allem zu Beginn des betrachteten Sequenzabschnitts (siehe Abb. D.2 A). Diese hydrophoben Bereiche in mtRieske und cpRieske sind insofern interessant, als dass für eine erfolgreiche Tat-Translokation die sogenannte H-Domäne, welche meist direkt auf das Tat-Erkennungsmotiv folgt und sich durch eine erhöhte Hydrophobizität auszeichnet, eine entscheidende Rolle spielt (Henry *et al.*, 1997) (siehe Einleitung Kap. 1.2.2.3). In *E. coli* war es sogar möglich, durch eine entsprechend hohe Hydrophobizität in der H-Domäne, komplett ohne Tat-Motiv den Transport gefalteter Substrate über das Tat-System zu vermitteln (Bageshwar *et al.*, 2009, Ulfig *et al.*, 2017). In den prokaryotischen Vorläufern der endosymbiontischen Organellen besitzen die Rieske-Proteine ebenfalls eine hydrophobe H-Domäne innerhalb der ersten 20 Aminosäuren nach dem Tat-Motiv (siehe Abb. D.2 A,B). Während das plastidäre cpRieske eine zum Rieske-Protein aus Cyanobakterien sehr ähnliche Verteilung der



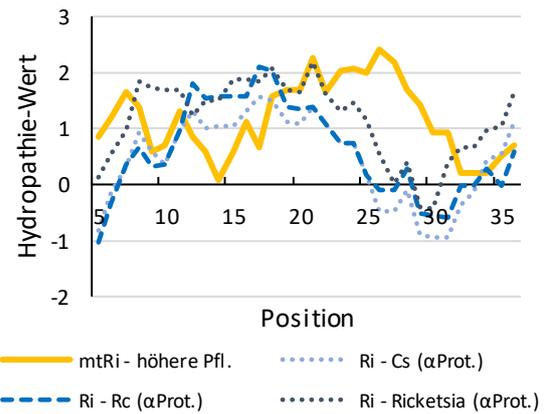
**Abb. D.1: Sequenzlogos der Signalankerdomänen von Rieske-Proteinen aus Pflanzen und Säugetieren.**

Sequenzlogos von 47 chloroplastidären und 47 mitochondrialen Rieske-Proteinen (cpRieske bzw. mtRieske) aus Pflanzen, sowie 49 mtRieske-Proteinen aus Säugetieren. Um insbesondere den Bereich um die Signalankerdomäne dieser Proteine zu betrachten (gelb hinterlegt), wurden die Sequenzen entsprechend gekürzt (mtRieske N-terminal um 90 und C-terminal um 110 Positionen gekürzt bzw. cpRieske N-terminal um 45 und C-terminal um 120 Positionen gekürzt). Positiv geladene Aminosäuren innerhalb des hinterlegten Bereichs sind markiert (\*). Genutzt wurde die Software „WebLogo“ v3.7.12 (Crooks *et al.*, 2004, Schneider und Stephens, 1990).

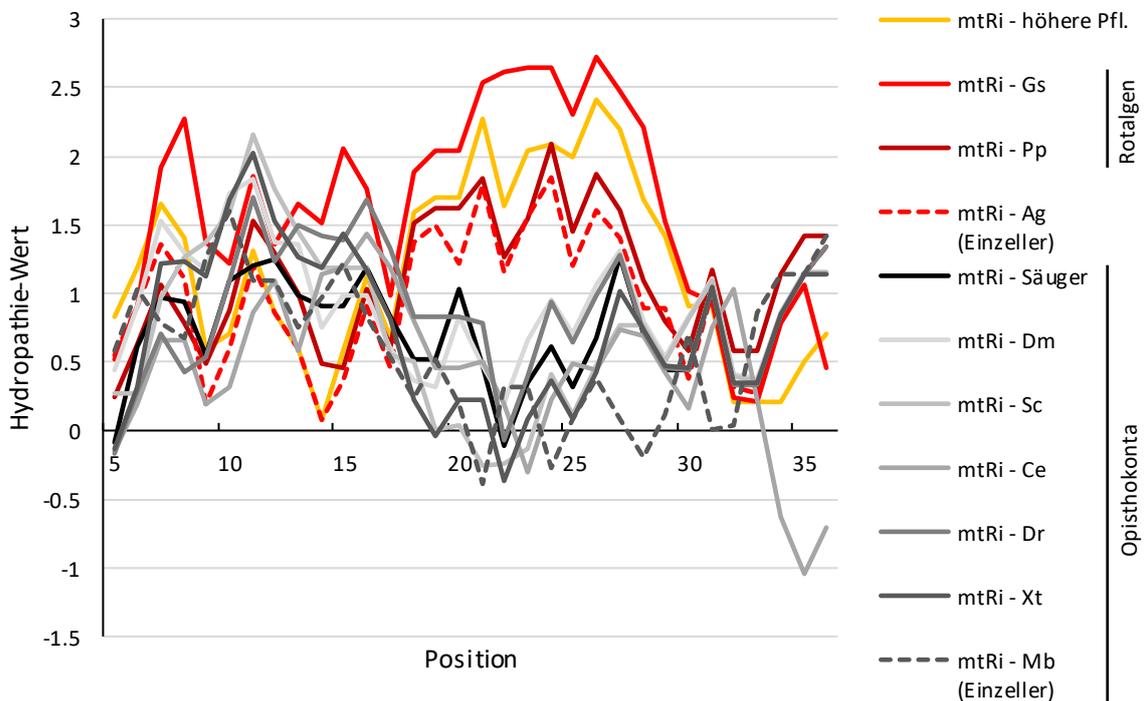
**A) cpRieske – höhere Pflanzen**



**B) mtRieske – höhere Pflanzen**



**C) mtRieske**



**Abb. D.2: Hydrophathie der Rieske-Signalankerdomänen verschiedener Organismen.**

Gezeigt sind die Hydrophathie-Plots der jeweils ersten 40 Aminosäuren ab dem potentiellen Tat-Motiv im Bereich der Signalankerdomäne verschiedener Rieske-Proteine (siehe gelb hinterlegter Bereich in Abb. D.2). Graphisch dargestellt ist der gleitende Durchschnitt der Hydrophathie nach Kyte und Doolittle (1982) mit einer Fensterbreite von 9. Verglichen werden: **A** cpRieske aus *Cyanobacterium aponinum* (Ca) mit der cpRieske-Konsensussequenz höherer Pflanzen (47 Sequenzen), **B** mtRieske aus den Alphaproteobakterien *Cereibacter sphaeroides* (Cs), *Rhodobacter capsulatus* (Rc) und *Ricketisia species* mit der mtRieske-Konsensussequenz höherer Pflanzen (47 Sequenzen) und **C** die mtRieske-Proteine der Rotalgen *Porphyridium purpureum* (Pp) und *Galdieria sulphuraria* (Gs), des einzelligen Jakobiden *Andalucia godoyi* (Ag), der Opisthokonta-Spezies *Drosophila melanogaster* (Dm), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Caenorhabditis elegans* (Ce), *Danio rerio* (Dr), *Xenopus tropicalis* (Xt) und *Monosiga brevicollis* (Mb) mit den Konsensussequenzen von mtRieske aus Säugern (49 Sequenzen) und höheren Pflanzen (47 Sequenzen).

Hydrophobie aufweist, kam es vermutlich während der Etablierung von Mitochondrien zu einer Verschiebung der H-Domäne im mitochondrialen mtRieske. Die Rieske-Proteine nehmen unter den bekannten Tat-Substraten aufgrund der SAD allerdings eine Sonderrolle ein. Denn hier fungiert die H-Domäne nicht nur als Transportsignal, sondern ist auch Teil der Transmembrandomäne (TMD) des reifen Proteins. Es könnte daher sein, dass sich der Schwerpunkt der H-Domäne von mtRieske innerhalb der TMD lediglich verschoben hat, und der im Vergleich zu cpRieske nun etwas weiter abwärts gelegene hydrophobe Bereich im pflanzlichen mtRieske weiterhin eine wichtige Rolle in der Tat-Translokation spielt und somit als mtTat-spezifische H-Domäne fungiert (siehe Abb. D.2 B, C). Der frühe Eukaryot *Andalucia godoyi* aus der Ordnung Jakobida, welche über ein funktionales mtTatAC-System verfügen (Jacob *et al.*, 2004, Petrů *et al.*, 2018), zeigt bereits den umpositionierten hydrophoben Bereich in der Rieske-SAD, welcher auch bei Vertretern der Rotalgen und, wie bereits beschrieben, bei höheren Pflanzen auftritt (siehe Abb. D.2 C). Den Gegensatz hierzu bilden die Opisthokonta, welche fast ausschließlich über ein Bcs1-System verfügen. Alle aus dieser Gruppe untersuchten mtRieske-Proteine weisen eine außergewöhnlich geringe Hydrophobizität im Bereich der SAD auf. Auch mtRieske des Choanoflagellaten *Monosiga brevicollis*, einem der nächsten Verwandten mehrzelliger Tiere, besitzt eine vergleichbar niedrige Hydrophobizität. Interessanterweise codiert das Genom von *M. brevicollis* noch für die Proteine mtTatC und mtTatB sowie ein Bcs1-ähnliches Protein (Burger *et al.*, 2003). Diesem fehlt jedoch die zur Transportfunktion erforderliche Bcs1-Domäne, sodass in diesem Choanoflagellaten die mtRieske-Untereinheit vermutlich noch über ein mitochondriales Tat-System transportiert wird (Carrie *et al.*, 2016). Diese Hypothese und die reduzierte Hydrophobizität im mtRieske-Membrananker von *M. brevicollis* deuten darauf hin, dass sich wahrscheinlich zuerst die Hydrophobizität in der SAD verringert hat und erst danach Bcs1 als Translokase etablieren konnte.

Demnach scheint der Transport von mtRieske mittels Bcs1 auf die geringere Hydrophobizität in der SAD angewiesen zu sein. Dies könnte beispielsweise auf einen voneinander abweichenden Transport- oder Assemblierungsmechanismus zwischen mtTat und Bcs1 hindeuten, welche im Falle von mtRieske aus Opisthokonta offenbar auch mit einer nur gering hydrophoben SAD zu einer korrekten Assemblierung in den Präkomplex führt. Auf der anderen Seite könnten die zusätzlich vorhandenen positiven Ladungen und die hohe Hydrophobizität in der SAD pflanzlicher mtRieske-Proteine für eine Translokation mittels mtTat erforderlich sein. Trotz der unterschiedlichen Hydrophobizität der mtRieske-SAD ist die Position von mtRieske innerhalb von Komplex III aus Pflanzen, Säugern und Hefe nahezu identisch, sodass die mtRieske-SAD die innere Hüllmembran innerhalb des Komplexes durchspannt und auch Komplex III keine strukturellen Unterschiede aufweist (Solmaz und Hunte, 2008, Guo *et al.*, 2017, Maldonado *et al.*, 2021). Ob die festgestellten Merkmale in der SAD von mtRieske aus

Pflanzen tatsächlich für eine mtTat-Translokation wichtig sind, wurde durch *in vitro*-Transportversuche mit pflanzlichen Mitochondrien und heterologen mtRieske-Proteinen überprüft (siehe Kap. 3.3.2).

#### **4.2.3. Kaum mtTat-Transport mit mtRieske-Proteinen aus Opisthokonta**

Im vorangehenden Kapitel konnten zwei eindeutige Unterschiede im Bereich der SAD von mtRieske aus Pflanzen und Opisthokonta aufgezeigt werden. Doch spiegeln sich diese Unterschiede auch in einer verringerten Assemblierungsrate nicht-pflanzlicher mtRieske-Proteine in pflanzlichen Mitochondrien wider, oder kann mtTat auch mit Bcs1-Substraten interagieren und diese transportieren?

Generell sind pflanzliche mtRieske-Proteine anscheinend artübergreifend mit mtTat kompatibel, wie sich an der vergleichsweise effizienten Interaktion von mtRieske aus *S. tuberosum* und *A. thaliana* mit mtTat aus *P. sativum* erkennen lässt. Interessanterweise interagiert das mitochondriale Rieske aus *A. thaliana* jedoch deutlich weniger effizient (ca. 40 %) als mtRieske aus *S. tuberosum* mit mtTat aus *P. sativum*. Um fundierte Aussagen zu dieser Beobachtung machen zu können, müssten deutlich mehr pflanzliche mtRieske-Proteine mit den Mitochondrien verschiedener Pflanzenspezies getestet werden. Es könnte allerdings sein, dass mitochondriale Tat-Translokasen in Pflanzen aufgrund des kleinen Substratspektrums, welches vermutlich nur mtRieske umfasst, eine hohe Spezialisierung auf das jeweils arteigene mtRieske-Protein durchlaufen. Die Kombination aus einem Transporter mit nur einem Substrat könnte eine Koevolution unterstützen und so zu artspezifischen Erkennungsmustern des pflanzlichen mtTat-Systems beitragen. Auf pflanzliche mtTat-Substrate ist der Selektionsdruck zudem eher niedrig, da Transportsysteme mit ähnlichen Erkennungsmotiven, wie beispielsweise ein Sec-System, in Mitochondrien höherer Pflanzen bisher nicht nachgewiesen wurden.

Tatsächlich zeigen die durchgeführten Proteintransportversuche mit mtRieske verschiedener Opisthokonta-Spezies sehr deutlich, dass diese nach einem Import in pflanzliche Mitochondrien nicht effizient über das mtTat-System re-exportiert werden können (siehe Kap. 3.3.2). Dies kann natürlich die Folge einer verringerten Interaktion mit mtTat aufgrund der zuvor festgestellten Unterschiede zu pflanzlichen mtRieske-Proteinen sein (siehe Kap. 4.2.2). Allerdings fällt bei Betrachtung der Ergebnisse auf, dass die mtRieske-Proteine in großer Menge vermutlich an Hsp60 binden (siehe Abb. E.40 A) (Dissertation Rödiger, 2010, Dissertation Kungel, 2020). Dieses Chaperon ist ein Homolog des plastidären Cpn60, welches in Chloroplasten das cpRieske bindet und für dessen korrekte Faltung zuständig ist (Madueño *et al.*, 1993). Es kann also davon ausgegangen werden, dass Hsp60 in ähnlicher Weise an der Faltung von mtRieske beteiligt ist; ein Prozess, der noch vor der Translokation mittels mtTat, und nach bzw. während der Assemblierung des Fe/S-Clusters erfolgen muss. Die geringe ermittelte Interaktionsrate mit mtTat könnte daher auch zunächst der sekundäre Effekt einer nicht

ablaufenden Reifung der an Hsp60 assoziierten Rieske-Proteine sein. Grundsätzlich besitzen pflanzliche und nicht-pflanzliche Mitochondrien die gleichen Komponenten zur Biogenese und Assemblierung von Fe/S-Clustern, die *iron-sulfur cluster*-Maschinerie (ISC) (Balk und Pilon, 2011, Couturier *et al.*, 2013), sodass die Cluster-Insertion und Faltung eventuell ohne große Einschränkungen möglich sind.

Eine ähnliche Hsp60-Assoziation zeigt sich auch für das plastidäre Rieske-Protein (siehe Abb. E.41 A). Es ist bereits bekannt, dass cpRieske nach dessen Import ins Stroma an das plastidäre Hsp60-Homolog Cpn60 bindet (Madueño *et al.*, 1993, Molik *et al.*, 2001). Für die Assemblierung des Fe/S-Clusters in Plastiden ist die aus Cyanobakterien stammende *sulfur mobilization*-Maschinerie (SUF) zuständig (Couturier *et al.*, 2013). Die in Mitochondrien lokalisierte ISC-Maschinerie ist vermutlich innerhalb der Proteobakterien aus diesem SUF-System hervorgegangen, woraufhin das für SUF codierende Operon eventuell verloren gegangen ist (Tokumoto *et al.*, 2004). Möglicherweise ist ISC in pflanzlichen Mitochondrien daher ebenfalls dazu in der Lage, das plastidäre Rieske-Protein mit einem Fe/S-Cluster zu versehen.

Bei korrekter Cofaktor-Insertion und Faltung der Rieske-Proteine aus Opisthokonta und Plastiden könnte also eine Interaktion mit dem pflanzlichen mtTat, wie oben erläutert, aufgrund der Unterschiede in der SAD inhibiert sein, sodass die Proteine an Hsp60 assembliert bleiben. Um den Einfluss der Hydrophobizität und der positiven Ladungen in der SAD von mtRieske genauer zu untersuchen, könnten Konstrukte aus SAD und C-Terminus von pflanzlichen und aus Opisthokonta stammenden mtRieske-Proteinen in verschiedenen Kombinationen erstellt und getestet werden. Auch das schrittweise Ersetzen der mtRieske-SAD aus Opisthokonta mit einer aus pflanzlichem mtRieske stammenden SAD oder die gezielte Deletion bzw. Insertion positiver Reste könnte bei dieser Fragestellung hilfreich sein. In zukünftigen Untersuchungen wäre außerdem zu klären, ob pflanzliche Rieske-Proteine mit Bcs1-Systemen interagieren können. Hierzu könnten ähnliche *in vitro*-Transportversuche mit isolierten Mitochondrien aus Säugergewebe oder Hefezellen durchgeführt werden. Tatsächlich scheint die mtRieske-SAD ihre Erkennungsfunktion in Opisthokonta verloren zu haben, da im Gegensatz zur mtTat-Translokase das Bcs1-System neu importierte mtRieske-Proteine anhand des gefalteten C-Terminus erkennt (Wagener *et al.*, 2011). Allerdings besitzt hier die SAD neben der Assemblierung und Verankerung in Komplex III durch Bcs1 eine weitere essentielle Funktion im Auslösen einer für den Transport erforderlichen Konformationsänderung (Wagener *et al.*, 2011). Es wäre daher denkbar, dass pflanzliche mtRieske-Proteine zwar durch Bcs1 erkannt, aufgrund der erhöhten Hydrophobizität in der SAD jedoch nicht transportiert bzw. in Komplex III assembliert werden können.

#### 4.2.4. Weshalb konnte Bcs1 die mitochondriale Tat-Translokase ersetzen?

Wie bereits in Kapitel 4.2.2 beschrieben, könnte eine Verringerung der Hydrophobizität in der SAD des mitochondrialen Rieske-Proteins die Etablierung von Bcs1 als Proteintransporter ermöglicht haben. Bcs1 könnte infolge einer Genduplikation und weiterer Anpassungen aus einer bereits vorhandenen AAA-ATPase, beispielsweise AtOM66, hervorgegangen sein und die Fähigkeit zum Transport gefalteter Proteine entwickelt haben. Weshalb aber konnte Bcs1 das bereits etablierte mtTat-System in den Mitochondrien von Opisthokonta verdrängen und dort zu einem Verlust von mtTat führen?

Offensichtlich muss Bcs1 gegenüber mtTat im Laufe der Evolution selektiv bevorzugt worden sein. Eine gesteigerte Transporteffizienz scheint Bcs1 im Vergleich zu mtTat jedoch nicht aufzuweisen, da auch in Säugern die Assemblierung von frisch importiertem mtRieske ebenfalls sehr langsam abläuft (Bottani *et al.*, 2017). Ein wesentlicher Unterschied zwischen Bcs1 und der mtTat-Translokase (bzw. Tat-Translokasen im Allgemeinen) ist deren Aufbau und Transportmechanismus. Während Tat-Komplexe, je nach betrachtetem Organismus, aus den unterschiedlichsten Kombinationen und eventuell auch Stöchiometrien von TatA, TatE, TatB und TatC bestehen können (Müller und Klösgen, 2005, Petrů *et al.*, 2018, Frain *et al.*, 2019a, Jakob *et al.*, 2009), sind alle bisher bekannten Bcs1-Komplexe Homoheptamere (Kater *et al.*, 2020, Tang *et al.*, 2020, Xia, 2021). Bcs1 könnte also in der Expression, aber auch Assemblierung weniger komplex ausfallen als Tat, was für Bcs1 ein evolutionärer Vorteil sein könnte. Der Transportmechanismus scheint für Bcs1 vergleichsweise gut nachvollzogen zu sein (siehe Einleitung Kap. 1.2.3.1), während für eine Tat-Translokation bislang keine der postulierten Mechanismen zweifelsfrei belegt werden konnte (siehe Einleitung Kap. 1.2.2.4). Es ist jedoch bewiesen, dass eine Translokation mittels Tat-System von einem stabilen, transmembranen Protonengradienten angetrieben wird. Wie das transportierte Substrat die Membran durchquert, ohne diesen Gradienten dabei zu beeinträchtigen, ist bislang allerdings nicht geklärt. Im Gegensatz hierzu ist Bcs1 auf die Hydrolyse von ATP angewiesen, um die zur Translokation erforderliche Konformationsänderung herbeizuführen und mtRieske aus dem Komplex zu entlassen. Die veränderte Konformation führt während der Translokation vermutlich zu einem Protonen-undurchlässigen Verschluss des Komplexes, sodass der  $\Delta pH$  wohl erhalten bleibt. Die unterschiedlichen Anforderungen in Bezug auf die Energetisierung sowie ein potentiell geringerer Einfluss auf den mitochondrialen  $\Delta pH$  könnte Bcs1 gegenüber mtTat also bevorzugen. Ein weiterer und wesentlicher Unterschied ist, dass Bcs1 immer kerncodiert und mtTatC immer mitochondrial codiert ist (Carrie *et al.*, 2016). Eine zentrale Expressionskontrolle durch den Zellkern, was häufig als einer der treibenden Faktoren des Gentransfers genannt wird (Kelly, 2021), ist also nur im Falle von Bcs1 möglich. Ein ausschlaggebender Grund könnte die hohe Hydrophobizität von TatC sein (Johnston und Williams, 2016, Petrů *et al.*, 2018), welches nach seiner Synthese im Zytosol aggregiert (Claros *et al.*, 1995) oder mit hoher

Wahrscheinlichkeit von SRP erkannt und in das endoplasmatische Reticulum (ER) transportiert werden würde (Björkholm *et al.*, 2017). Doch auch das plastidäre *TatC*-Gen wurde, trotz dessen ähnlich hoher Hydrophobizität, häufig ins Kerngenom umgelagert. Unterschiede zwischen cpTatC und mtTatC, insbesondere innerhalb der ersten TMD, scheinen eine Erkennung von cpTatC durch SRP, und damit eine Fehlsortierung ins ER, wesentlich unwahrscheinlicher zu machen (Petrů *et al.*, 2018). Ein ebenfalls einschränkender Faktor könnte sein, dass kerncodiertes mtTatC (im Gegensatz zu cpTatC) eine Hüllmembran mit Membranpotential komplett durchqueren müsste. Doch besonders die komplexe Editierung der mtTatC-mRNA in der mitochondrialen Matrix von Pflanzen (Bentolila *et al.*, 2013) kann im Kern oder Zytosol nicht stattfinden, sodass eine Synthese von funktionalen mtTatC-Proteinen bei einer Kerncodierung nicht möglich ist. Insgesamt ist jedoch zu bedenken, dass der Verlust von mitochondrial codiertem mtTatC in Opisthokonta unabhängig von einem Gentransfer verlief (Petrů *et al.*, 2018) und vielmehr eine Folge der Etablierung von Bcs1 darstellt.

Da in Opisthokonta vermutlich zunächst Bcs1 etabliert wurde und erst anschließend mtTat verloren ging, stellt sich also weniger die Frage, weshalb pflanzliche Mitochondrien weiterhin eine mtTat-Translokase besitzen. Denn dies lässt sich wohl am einfachsten damit erklären, dass sich in Pflanzen bisher kein Bcs1-System etablieren konnte. Weshalb genau es im Laufe der Evolution nicht zu einer solchen Entwicklung kam, lässt sich zu diesem Zeitpunkt nicht eindeutig sagen. Wie in Kapitel 4.2.2 ausgeführt, könnten jedoch die Unterschiede in der mtRieske-SAD von Opisthokonta und Pflanzen einen entscheidenden Einfluss darauf genommen haben, ob sich ein Bcs1-System für den Transport von mtRieske entwickeln konnte, oder ob das bereits vorhandene mtTat-System bestehen bleiben musste. Um zu beantworten, weshalb sich die Hydrophobizität der mtRieske-SAD in Opisthokonta derartig verringern konnte bzw. musste, oder weshalb umgekehrt die Hydrophobizität der mtRieske-SAD in Pflanzen unverändert blieb, sind weitere Experimente und Erkenntnisse erforderlich. Auch die Bedeutung der verhältnismäßig vielen positiven Reste, welche lediglich in der mtRieske-SAD von Pflanzen hochkonserviert sind, sollte in Zukunft weiter untersucht werden.

## 5. Literaturverzeichnis

- Alami, M., Lüke, I., Deitermann, S., Eisner, G., Koch, H. G., Brunner, J. & Müller, M. 2003. Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in *Escherichia coli*. *Molecular Cell*, 12, 937-946, 10.1016/S1097-2765(03)00398-8.
- Alder, N. N. & Theg, S. M. 2003. Energetics of protein transport across biological membranes: A study of the thylakoid delta pH-dependent/cpTat pathway. *Cell*, 112, 231-242, 10.1016/S0092-8674(03)00032-1.
- Aldridge, C., Spence, E., Kirkilionis, M. A., Frigerio, L. & Robinson, C. 2008. Tat-dependent targeting of Rieske iron-sulphur proteins to both the plasma and thylakoid membranes in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Molecular Microbiology*, 70, 140-150, 10.1111/j.1365-2958.2008.06401.x.
- Aldridge, C., Storm, A., Cline, K. & Dabney-Smith, C. 2012. The chloroplast twin arginine transport (Tat) component, Tha4, undergoes conformational changes leading to Tat protein transport. *The Journal of Biological Chemistry*, 287, 34752-34763, 10.1074/jbc.M112.385666.
- Andersson, B., Sundby, C., Åkerlund, H. E. & Albertsson, P. A. 1985. Inside-out thylakoid vesicles - an important tool for the characterization of the photosynthetic membrane. *Physiologia Plantarum*, 65, 322-330, 10.1111/j.1399-3054.1985.tb02403.x.
- Annweiler, A., Hipskind, R. A. & Wirth, T. 1991. A strategy for efficient in vitro translation of cDNAs using the rabbit beta-globin leader sequence. *Nucleic Acids Research*, 19, 10.1093/nar/19.13.3750.
- Archibald, J. M. 2015. Endosymbiosis and eukaryotic cell evolution. *Current Biology*, 25, R911-R921, 10.1016/j.cub.2015.07.055.
- Arnon, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24, 1-15, 10.1104/pp.24.1.1.
- Bachmann, J., Bauer, B., Zwicker, K., Ludwig, B. & Anderka, O. 2006. The Rieske protein from *Paracoccus denitrificans* is inserted into the cytoplasmic membrane by the twin-arginine translocase. *The FEBS Journal*, 273, 4817-4830, 10.1111/j.1742-4658.2006.05480.x.
- Backhaus, R., Zehe, C., Wegehingel, S., Kehlenbach, A., Schwappach, B. & Nickel, W. 2004. Unconventional protein secretion: Membrane translocation of FGF-2 does not require protein unfolding. *Journal of Cell Science*, 117, 1727-1736, 10.1242/jcs.01027.
- Bageshwar, U. K. & Musser, S. M. 2007. Two electrical potential-dependent steps are required for transport by the *Escherichia coli* Tat machinery. *The Journal of Cell Biology*, 179, 87-99, 10.1083/jcb.200702082.
- Bageshwar, U. K., Whitaker, N., Liang, F. C. & Musser, S. M. 2009. Interconvertibility of lipid- and translocon-bound forms of the bacterial Tat precursor pre-Sufl. *Molecular Microbiology*, 74, 209-226, 10.1111/j.1365-2958.2009.06862.x.
- Baglieri, J., Beck, D., Vasisht, N., Smith, C. J. & Robinson, C. 2012. Structure of TatA paralog, TatE, suggests a structurally homogeneous form of Tat protein translocase that transports folded proteins of differing diameter. *The Journal of Biological Chemistry*, 287, 7335-7344, 10.1074/jbc.M111.326355.
- Balk, J. & Pilon, M. 2011. Ancient and essential: The assembly of iron-sulfur clusters in plants. *Trends in Plant Science*, 16, 218-226, 10.1016/j.tplants.2010.12.006.

- Baniulis, D., Yamashita, E., Whitelegge, J. P., Zatsman, A. I., Hendrich, M. P., Hasan, S. S., Ryan, C. M. & Cramer, W. A. 2009. Structure-function, stability, and chemical modification of the cyanobacterial cytochrome  $b_6f$  complex from *Nostoc* sp PCC 7120. *The Journal of Biological Chemistry*, 284, 9861-9869, 10.1074/jbc.M809196200.
- Barber, J. 1982. Influence of surface charges on thylakoid structure and function. *Annual Review of Plant Physiology*, 33, 261–295, 10.1146/annurev.pp.33.060182.001401.
- Barnett, J. P., Eijlander, R. T., Kuipers, O. P. & Robinson, C. 2008. A minimal Tat system from a gram-positive organism: A bifunctional TatA subunit participates in discrete TatAC and TatA complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 2534-2542, 10.1074/jbc.M708134200.
- Barnett, J. P., Robinson, C., Scanlan, D. J. & Blindauer, C. A. 2011. The Tat protein export pathway and its role in cyanobacterial metalloprotein biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 325, 1-9, 10.1111/j.1574-6968.2011.02391.x.
- Barrientos, A., Fontanesi, F. & Díaz, F. 2009. Evaluation of the mitochondrial respiratory chain and oxidative phosphorylation system using polarography and spectrophotometric enzyme assays. *Current protocols in Human Genetics*, Kapitel 19, Einheit 19.3, 10.1002/0471142905.hg1903s63.
- Baudisch, B., Langner, U., Garz, I. & Klösgen, R. B. 2014. The exception proves the rule? Dual targeting of nuclear-encoded proteins into endosymbiotic organelles. *New Phytologist*, 201, 80-90, 10.1111/nph.12482.
- Beck, M. & Hurt, E. 2017. The nuclear pore complex: Understanding its function through structural insight. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18, 73-89, 10.1038/nrm.2016.147.
- Bennewitz, B., Sharma, M., Tannert, F. & Klösgen, R. B. 2020. Dual targeting of TatA points to a chloroplast-like Tat pathway in plant mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Cell Research*, 1867, 10.1016/j.bbamcr.2020.118816.
- Bentolila, S., Oh, J., Hanson, M. R. & Bukowski, R. 2013. Comprehensive high-resolution analysis of the role of an Arabidopsis gene family in RNA editing. *PLoS Genetics*, 9, 10.1371/journal.pgen.1003584.
- Berghöfer, J. 1999. Charakterisierung von Komponenten der plastidären Proteintransportmaschinerie. *Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München*.
- Berks, B. C., Palmer, T. & Sargent, F. 2003. The Tat protein translocation pathway and its role in microbial physiology. *Advances in Microbial Physiology*, 47, 187-254, 10.1016/s0065-2911(03)47004-5.
- Berks, B. C., Palmer, T. & Sargent, F. 2005. Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway. *Current Opinion in Microbiology*, 8, 174-181, 10.1016/j.mib.2005.02.010.
- Berks, B. C., Sargent, F., de Leeuw, E., Hinsley, A. P., Stanley, N. R., Jack, R. L., Buchanan, G. & Palmer, T. 2000. A novel protein transport system involved in the biogenesis of bacterial electron transfer chains. *Biochimica et Biophysica Acta: Bioenergetics*, 1459, 325-330, 10.1016/S0005-2728(00)00168-7.
- Bernardes, N. E. & Chook, Y. M. 2020. Nuclear import of histones. *Biochemical Society Transactions*, 48, 2753-2767, 10.1042/Bst20200572.
- Berry, E. A., de Bari, H. & Huang, L. S. 2013. Unanswered questions about the structure of cytochrome  $bc_1$  complexes. *Biochimica et Biophysica Acta: Bioenergetics*, 1827, 1258-1277, 10.1016/j.bbabi.2013.04.006.
- Björkholm, P., Ernst, A. M., Hagström, E. & Andersson, S. G. E. 2017. Why mitochondria need a genome revisited. *FEBS Letters*, 591, 65-75, 10.1002/1873-3468.12510.

- Bock, R. & Timmis, J. N. 2008. Reconstructing evolution: Gene transfer from plastids to the nucleus. *BioEssays*, 30, 556–566, 10.1002/bies.20761.
- Bogdanov, M., Zhang, W., Xie, J. & Dowhan, W. 2005. Transmembrane protein topology mapping by the substituted cysteine accessibility method (SCAM(TM)): Application to lipid-specific membrane protein topogenesis. *Methods*, 36, 148-171, 10.1016/j.ymeth.2004.11.002.
- Bogsch, E., Brink, S. & Robinson, C. 1997. Pathway specificity for a delta pH-dependent precursor thylakoid lumen protein is governed by a 'Sec-avoidance' motif in the transfer peptide and a 'Sec-incompatible' mature protein. *The EMBO Journal*, 16, 3851-3859, 10.1093/emboj/16.13.3851.
- Bolhuis, A., Mathers, J. E., Thomas, J. D., Barrett, C. M. L. & Robinson, C. 2001. TatB and TatC form a functional and structural unit of the twin-arginine translocase from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 20213-20219, 10.1074/jbc.M100682200.
- Bond, S. R. & Naus, C. C. 2012. RF-Cloning.org: An online tool for the design of restriction-free cloning projects. *Nucleic Acids Research*, 40, W209-W213, 10.1093/nar/gks396.
- Bonnefoy, N., Fiumera, H. L., Dujardin, G. & Fox, T. D. 2009. Roles of Oxa1-related inner-membrane translocases in assembly of respiratory chain complexes. *Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Cell Research*, 1793, 60-70, 10.1016/j.bbamcr.2008.05.004.
- Bottani, E., Cerutti, R., Harbour, M. E., Ravaglia, S., Dogan, S. A., Giordano, C., Fearnley, I. M., D'Amati, G., Viscomi, C., Fernandez-Vizarra, E. & Zeviani, M. 2017. TTC19 plays a husbandry role on UQCRC1 turnover in the biogenesis of mitochondrial respiratory complex III. *Molecular Cell*, 67, 96-105, 10.1016/j.molcel.2017.06.001.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254, 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Brandt, U., Yu, L., Yu, C. A. & Trumpower, B. L. 1993. The Mitochondrial targeting presequence of the Rieske iron-sulfur protein is processed in a single step after insertion into the cytochrome bc<sub>1</sub> complex in mammals and retained as a subunit in the complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 8387-8390, 10.1016/S0021-9258(18)52883-0.
- Braun, H. P. 2020. The oxidative phosphorylation system of the mitochondria in plants. *Mitochondrion*, 53, 66-75, 10.1016/j.mito.2020.04.007.
- Braun, H. P., Emmermann, M., Kruff, V., Bödicker, M. & Schmitz, U. K. 1995. The general mitochondrial processing peptidase from wheat is integrated into the cytochrome bc<sub>1</sub> complex of the respiratory chain. *Planta*, 195, 396–402, 10.1007/BF00202597.
- Braun, H. P., Emmermann, M., Kruff, V. & Schmitz, U. K. 1992. The general mitochondrial processing peptidase from potato is an integral part of cytochrome c reductase of the respiratory chain. *The EMBO Journal*, 11, 3219-3227, 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05399.x.
- Braun, N. A., Davis, A. W. & Theg, S. M. 2007. The chloroplast Tat pathway utilizes the transmembrane electric potential as an energy source. *Biophysical Journal*, 93, 1993–1998, 10.1529/biophysj.106.098731.
- Brischigliaro, M., Frigo, E., Corrà, S., de Pittà, C., Szabò, I., Zeviani, M. & Costa, R. 2021. Modelling of BCS1L-related human mitochondrial disease in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Molecular Medicine*, 99, 1471-1485, 10.1007/s00109-021-02110-1.
- Broadley, S. A., Demlow, C. M. & Fox, T. D. 2001. Peripheral mitochondrial inner membrane protein, Mss2p, required for export of the mitochondrially coded Cox2p C tail in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 21, 7663-7672, 10.1128/Mcb.21.22.7663-7672.2001.

- Brüser, T. & Sanders, C. 2003. An alternative model of the twin arginine translocation system. *Microbiological Research*, 158, 7–17, 10.1078/0944-5013-00176.
- Burger, G., Forget, L., Zhu, Y., Gray, M. W. & Lang, B. F. 2003. Unique mitochondrial genome architecture in unicellular relatives of animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 892-897, 10.1073/pnas.0336115100.
- Burger, G., Gray, M. W., Forget, L. & Lang, B. F. 2013. Strikingly bacteria-like and gene-rich mitochondrial genomes throughout jakobid protists. *Genome Biology and Evolution*, 5, 418–438, 10.1093/gbe/evt008.
- Cao, E., Chen, Y., Cui, Z. & Foster, P. R. 2003. Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions. *Biotechnology and Bioengineering*, 82, 684–690, 10.1002/bit.10612.
- Capaldi, R. A., Aggeler, R., Turina, P. & Wilkens, S. 1994. Coupling between catalytic sites and the proton channel in  $F_1F_0$ -type ATPases. *Trends in Biochemical Sciences*, 19, 284-289, 10.1016/0968-0004(94)90006-X.
- Carrie, C., Giraud, E., Duncan, O., Xu, L., Wang, Y., Huang, S., Clifton, R., Murcha, M., Filipovska, A., Rackham, O., Vrielink, A. & Whelan, J. 2010. Conserved and novel functions for *Arabidopsis thaliana* MIA40 in assembly of proteins in mitochondria and peroxisomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 36138-36148, 10.1074/jbc.m110.121202.
- Carrie, C., Kühn, K., Murcha, M. W., Duncan, O., Small, I. D., O'Toole, N. & Whelan, J. 2009. Approaches to defining dual-targeted proteins in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 57, 1128-1139, 10.1111/j.1365-313X.2008.03745.x.
- Carrie, C., Weißenberger, S. & Soll, J. 2016. Plant mitochondria contain the protein translocase subunits TatB and TatC. *Journal of Cell Science*, 129, 3935–3947, 10.1242/jcs.190975.
- Celedon, J. M. & Cline, K. 2012. Stoichiometry for binding and transport by the twin arginine translocation system. *The Journal of Cell Biology*, 197, 523-534, 10.1083/jcb.201201096.
- Chaddock, A. M., Mant, A., Karnaucho, I., Brink, S., Herrmann, R. G., Klösgen, R. B. & Robinson, C. 1995. A new type of signal peptide: Central role of a twin-arginine motif in transfer signals for the delta pH-dependent thylakoidal protein translocase. *The EMBO Journal*, 14, 2715-2722, 10.1002/j.1460-2075.1995.tb07272.x.
- Chan, C. S., Zlomislic, M. R., Tieleman, D. P. & Turner, R. J. 2007. The TatA subunit of *Escherichia coli* twin-arginine translocase has an N-in topology. *Biochemistry*, 46, 7396-7404, 10.1021/bi7005288.
- Chanal, A., Santini, C. L. & Wu, L. F. 1998. Potential receptor function of three homologous components, TatA, TatB and TatE, of the twin-arginine signal sequence-dependent metalloenzyme translocation pathway in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 30, 674-676, 10.1046/j.1365-2958.1998.01095.x.
- Clark, S. A. & Theg, S. M. 1997. A folded protein can be transported across the chloroplast envelope and thylakoid membranes. *Molecular Biology of the Cell*, 8, 923–934, 10.1091/mbc.8.5.923.
- Claros, M. G., Perea, J., Shu, Y. M., Samatey, F. A., Popot, J. L. & Jacq, C. 1995. Limitations to *in vivo* Import of hydrophobic proteins into yeast mitochondria. The case of a cytoplasmically synthesized apocytochrome b. *European Journal of Biochemistry*, 228, 762-771, 10.1111/j.1432-1033.1995.0762m.x.
- Clausmeyer, S., Klösgen, R. B. & Herrmann, R. G. 1993. Protein Import into Chloroplasts. The hydrophilic luminal proteins exhibit unexpected import and sorting specificities in spite of structurally conserved transit peptides. *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 13869-13876, 10.1016/S0021-9258(19)85183-9.

- Cline, K., Ettinger, W. F. & Theg, S. M. 1992. Protein-specific energy requirements for protein transport across or into thylakoid membranes. Two luminal proteins are transported in the absence of ATP. *The Journal of Biological Chemistry*, 267, 2688-2696, 10.1016/S0021-9258(18)45935-2.
- Cline, K. & Mori, H. 2001. Thylakoid delta pH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport. *The Journal of Cell Biology*, 154, 719-729, 10.1083/jcb.200105149.
- Cohen, M. J., Chirico, W. J. & Lipke, P. N. 2020. Through the back door: Unconventional protein secretion. *Cell Surface*, 6, 10.1016/j.tcs.2020.100045.
- Couturier, J., Touraine, B., Briat, J. F., Gaymard, F. & Rouhier, N. 2013. The iron-sulfur cluster assembly machineries in plants: Current knowledge and open questions. *Frontiers in Plant Science*, 4, 10.3389/fpls.2013.00259.
- Cramer, W. A., Hasan, S. S. & Yamashita, E. 2011. The Q cycle of cytochrome bc complexes: A structure perspective. *Biochimica et Biophysica Acta: Bioenergetics*, 1807, 788-802, 10.1016/j.bbabi.2011.02.006.
- Cristóbal, S., de Gier, J. W., Nielsen, H. & von Heijne, G. 1999. Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, 18, 2982-2990, 10.1093/emboj/18.11.2982.
- Crofts, A. R. 2004. The cytochrome bc<sub>1</sub> complex: Function in the context of structure. *Annual Review of Physiology*, 66, 689-733, 10.1146/annurev.physiol.66.032102.150251.
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M. & Brenner, S. E. 2004. WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Research*, 14, 1188-1190, 10.1101/gr.849004.
- Cruciat, C. M., Hell, K., Fölsch, H., Neupert, W. & Stuart, R. A. 1999. Bcs1p, an AAA-family member, is a chaperone for the assembly of the cytochrome bc<sub>1</sub> complex. *The EMBO Journal*, 18, 5226-5233, 10.1093/emboj/18.19.5226.
- Cui, T. Z., Conte, A., Fox, J. L., Zara, V. & Winge, D. R. 2014. Modulation of the respiratory supercomplexes in yeast: Enhanced formation of cytochrome oxidase increases the stability and abundance of respiratory supercomplexes. *The Journal of Biological Chemistry*, 289, 6133-6141, 10.1074/jbc.M113.523688.
- Cui, T. Z., Smith, P. M., Fox, J. L., Khalimonchuk, O. & Winge, D. R. 2012. Late-stage maturation of the Rieske Fe/S protein: Mzm1 stabilizes Rip1 but does not facilitate its translocation by the AAA ATPase Bcs1. *Molecular and Cellular Biology*, 32, 4400-4409, 10.1128/mcb.00441-12.
- D'Souza, M. P. & Lindsay, J. G. 1981. Isolation of a sealed homogeneous population of inner membrane fragments with inverted orientation from rat liver mitochondria using specific lectin immunoprecipitation. *Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes*, 640, 463-472, 10.1016/0005-2736(81)90471-5.
- Dabney-Smith, C., Mori, H. & Cline, K. 2003. Requirement of a Tha4-conserved transmembrane glutamate in thylakoid Tat translocase assembly revealed by biochemical complementation. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 43027-43033, 10.1074/jbc.M307923200.
- Davies, K. M., Strauss, M., Daum, B., Kief, J. H., Osiewacz, H. D., Rycovska, A., Zickermann, V. & Kühlbrandt, W. 2011. Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 14121-14126, 10.1073/pnas.1103621108.
- Day, P. M. & Theg, S. M. 2018. Evolution of protein transport to the chloroplast envelope membranes. *Photosynthesis Research*, 138, 315-326, 10.1007/s11120-018-0540-x.

- de Buck, E., Vranckx, L., Meyen, E., Maes, L., Vandersmissen, L., Anné, J. & Lannertyn, E. 2007. The twin-arginine translocation pathway is necessary for correct membrane insertion of the Rieske Fe/S protein in *Legionella pneumophila*. *FEBS Letters*, 581, 259-264, 10.1016/j.febslet.2006.12.022.
- de Leeuw, E., Porcelli, I., Sargent, F., Palmer, T. & Berks, B. C. 2001. Membrane interactions and self-association of the TatA and TatB components of the twin-arginine translocation pathway. *FEBS Letters*, 506, 143-148, 10.1016/S0014-5793(01)02904-0.
- DeLisa, M. P., Samuelson, P., Palmer, T. & Georgiou, G. 2002. Genetic analysis of the twin arginine translocator secretion pathway in bacteria. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 29825-29831, 10.1074/jbc.M201956200.
- Deng, K., Shenoy, S. K., Tso, S. C., Yu, L. & Yu, C. A. 2001. Reconstitution of mitochondrial processing peptidase from the core proteins (subunits I and II) of bovine heart mitochondrial cytochrome bc<sub>1</sub> complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 6499-6505, 10.1074/jbc.M007128200.
- Denoncin, K., Nicolaes, V., Cho, S. H., Leverrier, P. & Collet, J. F. 2013. Protein disulfide bond formation in the periplasm: Determination of the *in vivo* redox state of cysteine residues. *Methods in Molecular Biology*, 966, 325-336, 10.1007/978-1-62703-245-2\_20.
- Dittmar, J., Schlesier, R. & Klösigen, R. B. 2014. Tat transport of a Sec passenger leads to both completely translocated as well as membrane-arrested passenger proteins. *Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Cell Research*, 1843, 446-453, 10.1016/j.bbamcr.2013.11.025.
- Dolezal, P., Likic, V., Tachezy, J. & Lithgow, T. 2006. Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. *Science*, 313, 314-318, 10.1126/science.1127895.
- Douce, R., Mannella, C. A. & Bonner, W. D. 1973. The external NADH dehydrogenases of intact plant mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta: Bioenergetics*, 292, 105-116, 10.1016/0005-2728(73)90255-7.
- Dudek, J., Rehling, P. & van der Laan, M. 2013. Mitochondrial protein import: Common principles and physiological networks. *Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Cell Research*, 1833, 274-285, 10.1016/j.bbamcr.2012.05.028.
- Eme, L., Spang, A., Lombard, J., Stairs, C. W. & Ettema, T. J. G. 2017. Archaea and the origin of eukaryotes. *Nature Reviews Microbiology*, 15, 711-723, 10.1038/nrmicro.2017.133.
- Emmermann, M., Clericus, M., Braun, H. P., Mozo, T., Heins, L., Kruff, V. & Schmitz, U. K. 1994. Molecular features, processing and import of the Rieske iron-sulfur protein from potato mitochondria. *Plant Molecular Biology*, 25, 271-281, 10.1007/bf00023243.
- Eriksson, A. C., Sjöling, S. & Glaser, E. 1994. The ubiquinol cytochrome c oxidoreductase complex of spinach leaf mitochondria is involved in both respiration and protein processing. *Biochimica et Biophysica Acta: Bioenergetics*, 1186, 221-231, 10.1016/0005-2728(94)90181-3.
- Esaki, M., Shimizu, H., Ono, T., Yamamoto, H., Kanamori, T., Nishikawa, S. & Endo, T. 2004. Mitochondrial protein import: Requirement of presequence elements and TOM components for precursor binding to the TOM complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 45701-45707, 10.1074/jbc.M404591200.
- Eubel, H., Heinemeyer, J. & Braun, H. P. 2004. Identification and characterization of respirasomes in potato mitochondria. *Plant Physiology*, 134, 1450-1459, 10.1104/pp.103.038018.
- Eubel, H., Jansch, L. & Braun, H. P. 2003. New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant Physiology*, 133, 274-286, 10.1104/pp.103.024620.

- Falcone, R. D., Correa, N. M., Biasutti, M. A. & Silber, J. J. 2002. Acid–base and aggregation processes of Acridine Orange base in *n*-heptane/AOT/water reverse micelles. *Langmuir*, 18, 2039–2047, 10.1021/la011411b.
- Fan, E. 2008. Analysis of the dynamic property of Tat translocase and the fate of Tat signal peptides. *Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- Fernandez-Vizarra, E., Bugiani, M., Goffrini, P., Carrara, F., Farina, L., Procopio, E., Donati, A., Uziel, G., Ferrero, I. & Zeviani, M. 2007. Impaired complex III assembly associated with *BCS1L* gene mutations in isolated mitochondrial encephalopathy. *Human Molecular Genetics*, 16, 1241-1252, 10.1093/hmg/ddm072.
- Fernandez-Vizarra, E. & Zeviani, M. 2018. Mitochondrial complex III Rieske Fe-S protein processing and assembly. *Cell Cycle*, 17, 681-687, 10.1080/15384101.2017.1417707.
- Finazzi, G., Chasen, C., Wollman, F. A. & de Vitry, C. 2003. Thylakoid targeting of Tat passenger proteins shows no delta pH dependence *in vivo*. *The EMBO Journal*, 22, 807-815, 10.1093/emboj/cdg081.
- Fincher, V., Dabney-Smith, C. & Cline, K. 2003. Functional assembly of thylakoid delta pH-dependent/Tat protein transport pathway components *in vitro*. *European Journal of Biochemistry*, 270, 4930-4941, 10.1046/j.1432-1033.2003.03894.x.
- Fox, T. D. 2012. Mitochondrial protein synthesis, import, and assembly. *Genetics*, 192, 1203-1234, 10.1534/genetics.112.141267.
- Frain, K. M., Gangl, D., Jones, A., Zedler, J. A. Z. & Robinson, C. 2016. Protein translocation and thylakoid biogenesis in cyanobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta: Bioenergetics*, 1857, 266-273, 10.1016/j.bbabi.2015.08.010.
- Frain, K. M., Robinson, C. & van Dijl, J. M. 2019a. Transport of folded proteins by the Tat system. *The Protein Journal*, 38, 377-388, 10.1007/s10930-019-09859-y.
- Frain, K. M., van Dijl, J. M. & Robinson, C. 2019b. The twin-arginine pathway for protein secretion. *EcoSal Plus*, 8, 10.1128/ecosalplus.ESP-0040-2018.
- Freibert, S. A., Weiler, B. D., Bill, E., Pierik, A. J., Mühlhoff, U. & Lill, R. 2018. Biochemical reconstitution and spectroscopic analysis of iron-sulfur proteins. *Methods in Enzymology*, 599, 197-226, 10.1016/bs.mie.2017.11.034.
- Frickey, T. & Lupas, A. N. 2004. Phylogenetic analysis of AAA proteins. *Journal of Structural Biology*, 146, 2-10, 10.1016/j.jsb.2003.11.020.
- Frielingsdorf, S., Jakob, M. & Klösigen, R. B. 2008. A stromal pool of TatA promotes Tat-dependent protein transport across the thylakoid membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 33838-33845, 10.1074/jbc.M806334200.
- Frielingsdorf, S. & Klösigen, R. B. 2007. Prerequisites for terminal processing of thylakoidal Tat substrates. *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 24455-24462, 10.1074/jbc.M702630200.
- Fröbel, J., Rose, P., Lausberg, F., Blümmel, A. S., Freudl, R. & Müller, M. 2012a. Transmembrane insertion of twin-arginine signal peptides is driven by TatC and regulated by TatB. *Nature Communications*, 3, 10.1038/ncomms2308.
- Fröbel, J., Rose, P. & Müller, M. 2012b. Twin-arginine-dependent translocation of folded proteins. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367, 2246-2246, 10.1098/rstb.2012.0227.
- Gallagher, S., Winston, S. E., Fuller, S. A. & Hurrell, J. G. 2008. Immunoblotting and immunodetection. *Current Protocols in Molecular Biology*, Kapitel 10, Einheit 10.8, 10.1002/0471142727.mb1008s83.

- Geise, H., Heidrich, E. S., Nikolin, C. S., Mehner-Breitfeld, D. & Brüser, T. 2019. A potential late stage intermediate of twin-arginine dependent protein translocation in *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 10.3389/fmicb.2019.01482.
- Ghifari, A. S., Gill-Hille, M. & Murcha, M. W. 2018. Plant mitochondrial protein import: The ins and outs. *The Biochemical Journal*, 475, 2191–2208, 10.1042/bcj20170521.
- Glaser, E. & Dessi, P. 1999. Integration of the mitochondrial-processing peptidase into the cytochrome bc<sub>1</sub> complex in plants. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 31, 259–274, 10.1023/a:1005475930477.
- Glöckner, G., Rosenthal, A. & Valentin, K. 2000. The structure and gene repertoire of an ancient red algal plastid genome. *Journal of Molecular Evolution*, 51, 382–390, 10.1007/s002390010101.
- Glover, J. R., Andrews, D. W. & Rachubinski, R. A. 1994. *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal thiolase is imported as a dimer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 10541–10545, 10.1073/pnas.91.22.10541.
- Gnandt, E., Schimpf, J., Harter, C., Hoerer, J. & Friedrich, T. 2017. Reduction of the off-pathway iron-sulphur cluster N1a of *Escherichia coli* respiratory complex I restrains NAD(+) dissociation. *Scientific Reports*, 7, 10.1038/s41598-017-09345-4.
- Godinot, C. & Gautheron, D. C. 1979. Separation of right-side-out and inside-out submitochondrial particles by affinity chromatography on sepharose-cytochrome c. *Methods in Enzymology*. Elsevier.
- Gohlke, U., Pullan, L., McDevitt, C. A., Porcelli, I., de Leeuw, E., Palmer, T., Saibil, H. R. & Berks, B. C. 2005. The TatA component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 10482–10486, 10.1073/pnas.0503558102.
- Graham, L. A., Brandt, U. & Trumpower, B. L. 1994. Protease maturation of the Rieske iron-sulfur protein after its insertion into the mitochondrial cytochrome bc<sub>1</sub> complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Society Transactions*, 22, 188–191, 10.1042/bst0220188.
- Graubner, W., Schierhorn, A. & Brüser, T. 2007. DnaK plays a pivotal role in Tat targeting of CueO and functions beside SlyD as a general Tat signal binding chaperone. *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 7116–7124, 10.1074/jbc.M608235200.
- Gray, M. W. 1999. Mitochondrial evolution. *Science*, 283, 1476–1481, 10.1126/science.283.5407.1476.
- Guo, R. Y., Zong, S., Wu, M., Gu, J. K. & Yang, M. J. 2017. Architecture of human mitochondrial respiratory megacomplex I<sub>2</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>2</sub>. *Cell*, 170, 1247–1257, 10.1016/j.cell.2017.07.050.
- Halbig, D., Hou, B., Freudl, R., Sprenger, G. A. & Klösgen, R. B. 1999. Bacterial proteins carrying twin-R signal peptides are specifically targeted by the delta pH-dependent transport machinery of the thylakoid membrane system. *FEBS Letters*, 447, 95–98, 10.1016/s0014-5793(99)00269-0.
- Hartl, F. U., Schmidt, B., Wachter, E., Weiss, H. & Neupert, W. 1986. Transport into mitochondria and intramitochondrial sorting of the Fe/S protein of ubiquinol-cytochrome c reductase. *Cell*, 47, 939–951, 10.1016/0092-8674(86)90809-3.
- Hatefi, Y. & Hanstein, W. G. 1970. Lipid oxidation in biological membranes: I. lipid oxidation in submitochondrial particles and microsomes induced by chaotropic agents. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 138, 73–86, 10.1016/0003-9861(70)90286-9.
- Hatzixanthis, K., Palmer, T. & Sargent, F. 2003. A subset of bacterial inner membrane proteins integrated by the twin-arginine translocase. *Molecular Microbiology*, 49, 1377–1390, 10.1046/j.1365-2958.2003.03642.x.

- Hauer, R. S., Freudl, R., Dittmar, J., Jakob, M. & Klösgen, R. B. 2017. How to achieve Tat transport with alien TatA. *Scientific Reports*, 7, 10.1038/s41598-017-08818-w.
- Hauer, R. S., Schlesier, R., Heilmann, K., Dittmar, J., Jakob, M. & Klösgen, R. B. 2013. Enough is enough: TatA demand during Tat-dependent protein transport. *Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Cell Research*, 1833, 957-965, 10.1016/j.bbamcr.2013.01.030.
- Haward, S. R., Napier, J. A. & Gray, J. C. 1997. Chloroplast SecA functions as a membrane-associated component of the Sec-like protein translocase of pea chloroplasts. *European Journal of Biochemistry*, 248, 724-730, 10.1111/j.1432-1033.1997.00724.x.
- He, J., Rössner, N., Hoang, M. T. T., Alejandro, S. & Peiter, E. 2021. Transport, functions, and interaction of calcium and manganese in plant organellar compartments. *Plant Physiology*, 187, 1940-1972, 10.1093/plphys/kiab122.
- Heazlewood, J. L., Whelan, J. & Millar, A. H. 2003. The products of the mitochondrial *orf25* and *orfB* genes are F<sub>0</sub> components in the plant F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase. *FEBS Letters*, 540, 201-205, 10.1016/s0014-5793(03)00264-3.
- Heidorn-Czarna, M., Maziak, A. & Janska, H. 2022. Protein processing in plant mitochondria compared to yeast and mammals. *Frontiers in Plant Science*, 13, 10.3389/fpls.2022.824080.
- Hell, K., Neupert, W. & Stuart, R. A. 2001. Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *The EMBO Journal*, 20, 1281-1288, 10.1093/emboj/20.6.1281.
- Henry, R., Carrigan, M., McCaffery, M., Ma, X. Y. & Cline, K. 1997. Targeting determinants and proposed evolutionary basis for the Sec and the delta pH protein transport systems in chloroplast thylakoid membranes. *The Journal of Cell Biology*, 136, 823-832, 10.1083/jcb.136.4.823.
- Herrmann, J. M., Bonnefoy, N., Neupert, W. & Szyrach, G. 2003. Protein insertion into the inner membrane of mitochondria. *IUBMB Life*, 20, 219-225, 10.1080/1521654031000123349.
- Hillis, W. E. & Ishikura, N. 1968. The chromatographic and spectral properties of stilbene derivatives. *Journal of Chromatography A*, 32, 323-336, 10.1016/s0021-9673(01)80498-2.
- Hinsley, A. P., Stanley, N. R., Palmer, T. & Berks, B. C. 2001. A naturally occurring bacterial Tat signal peptide lacking one of the 'invariant' arginine residues of the consensus targeting motif. *FEBS Letters*, 497, 45-49, 10.1016/s0014-5793(01)02428-0.
- Hinson, J. T., Fantin, V. R., Schönberger, J., Breivik, N., Siem, G., McDonough, B., Sharma, P., Keogh, I., Godinho, R., Santos, F., Esparza, A., Nicolau, Y., Selvaag, E., Cohen, B. H., Hoppel, C. L., Tranebjaerg, L., Eavey, R. D., Seidman, J. G. & Seidman, C. E. 2007. Missense mutations in the *BCS1L* gene as a cause of the Björnstad syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 356, 809-819, 10.1056/NEJMoa055262.
- Hoffman, N. E. & Franklin, A. E. 1994. Evidence for a stromal GTP requirement for the integration of a chlorophyll a/b-binding polypeptide into thylakoid membranes. *Plant physiology*, 105, 295-304, 10.1104/pp.105.1.295.
- Hofmeister, F. 1888. Zur Lehre von der Wirkung der Salze. *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 24, 247-260, 10.1007/bf01918191.
- Hou, B. & Brüser, T. 2011. The Tat-dependent protein translocation pathway. *Biomolecular Concepts*, 2, 507-523, 10.1515/BMC.2011.040.
- Hou, B., Frielingsdorf, S. & Klösgen, R. B. 2006. Unassisted membrane insertion as the initial step in delta pH/Tat-dependent protein transport. *Journal of Molecular Biology*, 355, 957-967, 10.1016/j.jmb.2005.11.029.

- Hou, B., Heidrich, E. S., Mehner-Breitfeld, D. & Brüser, T. 2018. The TatA component of the twin-arginine translocation system locally weakens the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* upon protein substrate binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 293, 7592-7605, 10.1074/jbc.RA118.002205.
- Hou, J., Ding, J. L., Peng, Y. J., Feng, M. G. & Ying, S. H. 2023. Genome-wide identification of BCS1 domain-containing proteins reveals the mitochondrial bcs1 essential for growth, stress response, and virulence of the filamentous entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiological Research*, 267, 10.1016/j.micres.2022.127262.
- Huang, Q. & Palmer, T. 2017. Signal peptide hydrophobicity modulates interaction with the twin-arginine translocase. *mBio*, 8, 10.1128/mBio.00909-17.
- Iwata, S., Lee, J. W., Okada, K., Lee, J. K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T. A., Ramaswamy, S. & Jap, B. K. 1998. Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc<sub>1</sub> complex. *Science*, 281, 64-71, 10.1126/science.281.5373.64.
- Iwata, S., Saynovits, M., Link, T. A. & Michel, H. 1996. Structure of a water soluble fragment of the 'Rieske' iron-sulfur protein of the bovine heart mitochondrial cytochrome bc<sub>1</sub> complex determined by MAD phasing at 1.5 angstrom resolution. *Structure*, 4, 567-579, 10.1016/S0969-2126(96)00062-7.
- Jack, R. L., Sargent, F., Berks, B. C., Sawers, G. & Palmer, T. 2001. Constitutive expression of *Escherichia coli* tat genes indicates an important role for the twin-arginine translocase during aerobic and anaerobic growth. *Journal of Bacteriology*, 183, 1801-1804, 10.1128/JB.183.5.1801-1804.2001.
- Jacob, Y., Seif, E., Paquet, P. O. & Lang, B. F. 2004. Loss of the mRNA-like region in mitochondrial tmRNAs of jakobids. *RNA*, 10, 605-614, 10.1261/rna.5227904.
- Jagow, G. & Klingenberg, M. 1970. Pathways of hydrogen in mitochondria of *Saccharomyces carlsbergensis*. *European Journal of Biochemistry*, 12, 583-592, 10.1111/j.1432-1033.1970.tb00890.x.
- Jakob, M., Kaiser, S., Gutensohn, M., Hanner, P. & Klösigen, R. B. 2009. Tat subunit stoichiometry in *Arabidopsis thaliana* challenges the proposed function of TatA as the translocation pore. *Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Cell Research*, 1793, 388-394, 10.1016/j.bbamcr.2008.09.006.
- Jaru-Ampornpan, P., Nguyen, T. X. & Shan, S. O. 2009. A distinct mechanism to achieve efficient signal recognition particle (SRP)-SRP Receptor interaction by the chloroplast SRP Pathway. *Molecular Biology of the Cell*, 20, 3965-3973, 10.1091/mbc.E08-10-0989.
- Johnston, I. G. & Williams, B. P. 2016. Evolutionary inference across eukaryotes identifies specific pressures favoring mitochondrial gene retention. *Cell Systems*, 2, 101-111, 10.1016/j.cels.2016.01.013.
- Jones, D. T., Taylor, W. R. & Thornton, J. M. 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences*, 8, 275-282, 10.1093/bioinformatics/8.3.275.
- Kapazoglou, A., Mould, R. M. & Gray, J. C. 2000. Assembly of the Rieske iron-sulphur protein into the cytochrome bf complex in thylakoid membranes of isolated pea chloroplasts. *European Journal of Biochemistry*, 267, 352-360, 10.1046/j.1432-1327.2000.01006.x.
- Karlsson, A. J., Lim, H. K., Xu, H. S., Rocco, M. A., Bratkowski, M. A., Ke, A. L. & DeLisa, M. P. 2012. Engineering antibody fitness and function using membrane-anchored display of correctly folded proteins. *Journal of Molecular Biology*, 416, 94-107, 10.1016/j.jmb.2011.12.021.

- Karnauchov, I., Cai, D., Schmidt, I., Herrmann, R. G. & Klösgen, R. B. 1994. The thylakoid translocation of subunit 3 of photosystem I, the *psaF* gene product, depends on a bipartite transit peptide and proceeds along an azide-sensitive pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 32871-32878, 10.1016/S0021-9258(20)30072-7.
- Karnauchov, I., Herrmann, R. G. & Klösgen, R. B. 1997. Transmembrane topology of the Rieske Fe/S protein of the cytochrome *b<sub>6</sub>/f* complex from spinach chloroplasts. *FEBS Letters*, 408, 206-210, 10.1016/s0014-5793(97)00427-4.
- Kater, L., Wagener, N., Berninghausen, O., Becker, T., Neupert, W. & Beckmann, R. 2020. Structure of the Bcs1 AAA-ATPase suggests an airlock-like translocation mechanism for folded proteins. *Nature Structural & Molecular Biology*, 27, 142–149, 10.1038/s41594-019-0364-1.
- Kay, C. J., Ericson, I., Gardeström, P., Palmer, J. M. & Møller, I. M. 1985. Generation and purification of submitochondrial particles of different polarities from plant mitochondria. *FEBS letters*, 193, 169–174, 10.1016/0014-5793(85)80144-7.
- Kelly, S. 2021. The economics of organellar gene loss and endosymbiotic gene transfer. *Genome Biology*, 22, 10.1186/s13059-021-02567-w.
- Kermorgant, M., Bonnefoy, N. & Dujardin, G. 1997. Oxa1p, which is required for cytochrome c oxidase and ATP synthase complex formation, is embedded in the mitochondrial inner membrane. *Current Genetics*, 31, 302-307, 10.1007/s002940050209.
- Kerth, A., Brehmer, T., Meister, A., Hanner, P., Jakob, M., Klösgen, R. B. & Blume, A. 2012. Interaction of a Tat substrate and a Tat signal peptide with thylakoid lipids at the air-water interface. *Chembiochem*, 13, 231-239, 10.1002/cbic.201100458.
- Khan, Y. A., White, K. I. & Brunger, A. T. 2022. The AAA plus superfamily: A review of the structural and mechanistic principles of these molecular machines. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 57, 156-187, 10.1080/10409238.2021.1979460.
- Kim, P. K. & Hettema, E. H. 2015. Multiple pathways for protein transport to peroxisomes. *Journal of Molecular Biology*, 427, 1176-1190, 10.1016/j.jmb.2015.02.005.
- Kispal, G., Csere, P., Guiard, B. & Lill, R. 1997. The ABC transporter Atm1p is required for mitochondrial iron homeostasis. *FEBS Letters*, 418, 346–350, 10.1016/s0014-5793(97)01414-2.
- Kispal, G., Csere, P., Prohl, C. & Lill, R. 1999. The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *The EMBO Journal*, 18, 3981–3989, 10.1093/emboj/18.14.3981.
- Klodmann, J. & Braun, H. P. 2011. Proteomic approach to characterize mitochondrial complex I from plants. *Phytochemistry*, 72, 1071-1080, 10.1016/j.phytochem.2010.11.012.
- Klodmann, J., Sunderhaus, S., Nimtz, M., Jänsch, L. & Braun, H. P. 2010. Internal Architecture of Mitochondrial Complex I from *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 22, 797-810, 10.1105/tpc.109.073726.
- Klösgen, R. B., Brock, I. W., Herrmann, R. G. & Robinson, C. 1992. Proton gradient-driven import of the 16 kDa oxygen-evolving complex protein as the full precursor protein by isolated thylakoids. *Plant Molecular Biology*, 18, 1031–1034, 10.1007/bf00019226.
- Kmiec, B., Teixeira, P. F. & Glaser, E. 2014. Shredding the signal: Targeting peptide degradation in mitochondria and chloroplasts. *Trends in Plant Science*, 19, 771-778, 10.1016/j.tplants.2014.09.004.
- Koch, S., Fritsch, M. J., Buchanan, G. & Palmer, T. 2012. *Escherichia coli* TatA and TatB proteins have N-out, C-in topology in intact cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 287, 14420-14431, 10.1074/jbc.M112.354555.

- Korotkov, K. V. & Sandkvist, M. 2019. Architecture, function, and substrates of the type II secretion system. *EcoSal Plus*, 8, 10.1128/ecosalplus.ESP-0034-2018.
- Kreutzenbeck, P., Kröger, C., Lausberg, F., Blaudeck, N., Sprenger, G. A. & Freudl, R. 2007. *Escherichia coli* twin arginine (Tat) mutant translocases possessing relaxed signal peptide recognition specificities. *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 7903-7911, 10.1074/jbc.M610126200.
- Kungel, J. 2020. Transport- und Assemblierungsverhalten der Rieske Fe/S-Proteine in Chloroplasten und Mitochondrien. *Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- Kyte, J. & Doolittle, R. F. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157, 105-132, 10.1016/0022-2836(82)90515-0.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685, 10.1038/227680a0.
- Laidler, V., Chaddock, A. M., Knott, T. G., Walker, D. & Robinson, C. 1995. A SecY homolog in *Arabidopsis thaliana*. Sequence of a full-length cDNA clone and import of the precursor protein into chloroplasts. *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 17664-17667, 10.1074/jbc.270.30.17664.
- Lauber, F., Deme, J. C., Lea, S. M. & Berks, B. 2018. Type 9 secretion system structures reveal a new protein transport mechanism. *Nature*, 564, 77-82, 10.1038/s41586-018-0693-y.
- Leake, M. C., Greene, N. P., Godun, R. M., Granjon, T., Buchanan, G., Chen, S., Berry, R. M., Palmer, T. & Berks, B. C. 2008. Variable stoichiometry of the TatA component of the twin-arginine protein transport system observed by *in vivo* single-molecule imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 15376-15381, 10.1073/pnas.0806338105.
- Lee, P. A., Buchanan, G., Stanley, N. R., Berks, B. C. & Palmer, T. 2002. Truncation analysis of TatA and TatB defines the minimal functional units required for protein translocation. *Journal of Bacteriology*, 184, 5871-5879, 10.1128/Jb.184.21.5871-5879.2002.
- Lee, P. A., Tullman-Ercek, D. & Georgiou, G. 2006. The bacterial twin-arginine translocation pathway. *Annual Review of Microbiology*, 60, 373-395, 10.1146/annurev.micro.60.080805.142212.
- Léon, S., Goodman, J. M. & Subramani, S. 2006. Uniqueness of the mechanism of protein import into the peroxisome matrix: Transport of folded, co-factor-bound and oligomeric proteins by shuttling receptors. *Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Cell Research*, 1763, 1552-1564, 10.1016/j.bbamcr.2006.08.037.
- Lill, R. & Mühlenhoff, U. 2006. Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: Components and mechanisms. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22, 457-486, 10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104538.
- Lüke, I., Handford, J. I., Palmer, T. & Sargent, F. 2009. Proteolytic processing of *Escherichia coli* twin-arginine signal peptides by LepB. *Archives of Microbiology*, 191, 919-925, 10.1007/s00203-009-0516-5.
- Macri, F., Dell'Antone, P. & Vianello, A. 1982. ATP-dependent and ionophore-induced proton translocation in pea stem microsomal vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes*, 689, 89-96, 10.1016/0005-2736(82)90192-4.
- Madueño, F., Bradshaw, S. A. & Gray, J. C. 1994. The thylakoid-targeting domain of the chloroplast Rieske iron-sulfur protein is located in the N-terminal hydrophobic region of the mature protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 17458-17463, 10.1016/S0021-9258(17)32462-6.

- Madueño, F., Napier, J. A. & Gray, J. C. 1993. Newly imported Rieske iron-sulfur protein associates with both Cpn60 and Hsp70 in the chloroplast stroma. *The Plant Cell*, 5, 1865–1876, 10.1105/tpc.5.12.1865.
- Maillard, J., Spronk, C. A. E. M., Buchanan, G., Lyall, V., Richardson, D. J., Palmer, T., Vuister, G. W. & Sargent, F. 2007. Structural diversity in twin-arginine signal peptide-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 15641–15646, 10.1073/pnas.0703967104.
- Maio, N., Kim, K. S., Singh, A. & Rouault, T. A. 2017. A single adaptable cochaperone-scaffold complex delivers nascent iron-sulfur clusters to mammalian respiratory chain complexes I-III. *Cell Metabolism*, 25, 945–953, 10.1016/j.cmet.2017.03.010.
- Maio, N., Singh, A., Uhrigshardt, H., Saxena, N., Tong, W. H. & Rouault, T. A. 2014. Cochaperone binding to LYR motifs confers specificity of iron sulfur cluster delivery. *Cell Metabolism*, 19, 445–457, 10.1016/j.cmet.2014.01.015.
- Maldonado, M., Guo, F. & Letts, J. A. 2021. Atomic structures of respiratory complex III<sub>2</sub>, complex IV, and supercomplex III<sub>2</sub>-IV from vascular plants. *eLife*, 10, 10.7554/eLife.62047.
- Marques, J. P., Schattat, M. H., Hause, G., Dudeck, I. & Klösgen, R. B. 2004. *In vivo* transport of folded EGFP by the delta pH/TAT-dependent pathway in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 55, 1697–1706, 10.1093/jxb/erh191.
- Martin, W. & Herrmann, R. G. 1998. Gene transfer from organelles to the nucleus: How much, what happens, and why? *Plant Physiology*, 118, 9–17, 10.1104/pp.118.1.9.
- McDevitt, C. A., Buchanan, G., Sargent, F., Palmer, T. & Berks, B. C. 2006. Subunit composition and *in vivo* substrate-binding characteristics of *Escherichia coli* Tat protein complexes expressed at native levels. *The FEBS Journal*, 273, 5656–5668, 10.1111/j.1742-4658.2006.05554.x.
- Meyer, E. H., Taylor, N. L. & Millar, A. H. 2008. Resolving and identifying protein components of plant mitochondrial respiratory complexes using three dimensions of gel electrophoresis. *Journal of Proteome Research*, 7, 786–794, 10.1021/pr700595p.
- Meyer, E. H., Tomaz, T., Carroll, A. J., Estavillo, G., Delannoy, E., Tanz, S. K., Small, I. D., Pogson, B. J. & Millar, A. H. 2009. Remodeled respiration in *ndufs4* with low phosphorylation efficiency suppresses Arabidopsis germination and growth and alters control of metabolism at night. *Plant Physiology*, 151, 2187–2187, 10.1104/pp.109.900310.
- Michl, D., Karnauchoy, I., Berghofer, J., Herrmann, R. G. & Klösgen, R. B. 1999. Phylogenetic transfer of organelle genes to the nucleus can lead to new mechanisms of protein integration into membranes. *The Plant Journal*, 17, 31–40, 10.1046/j.1365-313x.1999.00348.x.
- Michl, D., Robinson, C., Shackleton, J. B., Herrmann, R. G. & Klösgen, R. B. 1994. Targeting of proteins to the thylakoids by bipartite presequences: CFoll is imported by a novel, third pathway. *The EMBO Journal*, 13, 1310–1317, 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06383.x.
- Molik, S. 2000. Thylakoidtransport und Assemblierung des plastidären Rieske Fe/S-Proteins. . *Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- Molik, S. 2005. Das plastidäre Rieske Fe/S-Protein: Analyse des Transport- und Assemblierungsprozesses. *Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- Molik, S., Karnauchoy, I., Weidlich, C., Herrmann, R. G. & Klösgen, R. B. 2001. The Rieske Fe/S protein of the cytochrome b<sub>6</sub>/f complex in chloroplasts: Missing link in the evolution of protein transport pathways in chloroplasts? *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 42761–42766, 10.1074/jbc.M106690200.

- Møller, I. M., Bergman, A., Gardeström, P., Ericson, I. & Palmer, J. M. 1981. Characterization and purification of inside-out sub-mitochondrial particles obtained from plant-mitochondria. *FEBS Letters*, 126, 13-17, 10.1016/0014-5793(81)81021-6.
- Møller, I. M., Lidén, A. C., Ericson, I. & Gardeström, P. 1987. Isolation of submitochondrial particles with different polarities. *Methods in Enzymology*, 148, 442-453, 10.1016/0076-6879(87)48043-9.
- Møller, I. M. & Palmer, J. M. 1982. Direct evidence for the presence of a rotenone-resistant NADH dehydrogenase on the inner surface of the inner membrane of plant-mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 54, 267-274, 10.1111/j.1399-3054.1982.tb00258.x.
- Mori, H. & Cline, K. 2002. A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid delta pH/Tat translocase. *The Journal of Cell Biology*, 157, 205–210, 10.1083/jcb.200202048.
- Mori, H., Summer, E. J. & Cline, K. 2001. Chloroplast TatC plays a direct role in thylakoid (delta)pH-dependent protein transport. *FEBS Letters*, 501, 65-68, 10.1016/s0014-5793(01)02626-6.
- Mori, H., Summer, E. J., Ma, X. & Cline, K. 1999. Component specificity for the thylakoidal Sec and delta pH-dependent protein transport pathways. *The Journal of Cell Biology*, 146, 45-56, 10.1083/jcb.146.1.45.
- Motohashi, R., Nagata, N., Ito, T., Takahashi, S., Hobo, T., Yoshida, S. & Shinozaki, K. 2001. An essential role of a TatC homologue of a delta pH- dependent protein transporter in thylakoid membrane formation during chloroplast development in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 10499–10504, 10.1073/pnas.181304598.
- Mould, R. M. & Robinson, C. 1991. A proton gradient is required for the transport of two luminal oxygen-evolving proteins across the thylakoid membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, 266, 12189-12193, 10.1016/S0021-9258(18)98879-4.
- Mühlenhoff, U., Richter, N., Pines, O., Pierik, A. J. & Lill, R. 2011. Specialized function of yeast Isa1 and Isa2 proteins in the maturation of mitochondrial [4Fe-4S] proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 41205-41216, 10.1074/jbc.M111.296152.
- Müller, M. & Klösgen, R. B. 2005. The Tat pathway in bacteria and chloroplasts (review). *Molecular Membrane Biology*, 22, 113-121, 10.1080/09687860500041809.
- Nakai, M., Goto, A., Nohara, T., Sugita, D. & Endo, T. 1994. Identification of the SecA protein homolog in pea chloroplasts and its possible involvement in thylakoidal protein transport. *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 31338-31341, 10.1016/S0021-9258(18)31698-3.
- Neuhoff, V., Stamm, R. & Eibl, H. 1985. Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis*, 6, 427-448, 10.1002/elps.1150060905.
- New, C. P., Ma, Q. & Dabney-Smith, C. 2018. Routing of thylakoid lumen proteins by the chloroplast twin arginine transport pathway. *Photosynthesis Research*, 138, 289-301, 10.1007/s11120-018-0567-z.
- Nobrega, F. G., Nobrega, M. P. & Tzagoloff, A. 1992. Bcs1, a novel gene required for the expression of functional Rieske iron-sulfur protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 11, 3821-3829, 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05474.x.
- Nuccio, M. L., Russell, B. L., Nolte, K. D., Rathinasabapathi, B., Gage, D. A. & Hanson, A. D. 1998. The endogenous choline supply limits glycine betaine synthesis in transgenic tobacco expressing choline monooxygenase. *The Plant Journal*, 16, 487-496, 10.1046/j.1365-313x.1998.00316.x.

- Nuñez, P. A., Soria, M. & Farber, M. D. 2012. The twin-arginine translocation pathway in alpha-Proteobacteria is functionally preserved irrespective of genomic and regulatory divergence. *PLoS One*, 7, 10.1371/journal.pone.0033605.
- Ott, M. & Herrmann, J. M. 2010. Co-translational membrane insertion of mitochondrially encoded proteins. *Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Cell Research*, 1803, 767-775, 10.1016/j.bbamcr.2009.11.010.
- Ouyang, M., Li, X., Zhang, J., Feng, P., Pu, H., Kong, L., Bai, Z., Rong, L., Xu, X., Chi, W., Wang, Q., Chen, F., Lu, C., Shen, J. & Zhang, L. 2020. Liquid-liquid phase transition drives intra-chloroplast cargo sorting. *Cell*, 180, 1144-1159, 10.1016/j.cell.2020.02.045.
- Palmer, T. & Berks, B. C. 2012. The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nature Reviews Microbiology*, 10, 483-496, 10.1038/nrmicro2814.
- Palmgren, M. G., Askerlund, P., Fredrikson, K., Widell, S., Sommarin, M. & Larsson, C. 1990. Sealed inside-out and right-side-out plasma membrane vesicles: Optimal conditions for formation and separation. *Plant Physiology*, 92, 871-880, 10.1104/pp.92.4.871.
- Pei, D. H. & Dalbey, R. E. 2022. Membrane translocation of folded proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 298, 10.1016/j.jbc.2022.102107.
- Peltier, J. B., Friso, G., Kalume, D. E., Roepstorff, P., Nilsson, F., Adamska, I. & van Wijk, K. J. 2000. Proteomics of the chloroplast: Systematic identification and targeting analysis of lumenal and peripheral thylakoid proteins. *The Plant Cell*, 12, 319-341, 10.1105/tpc.12.3.319.
- Pérez-Rodríguez, R., Fisher, A. C., Perlmutter, J. D., Hicks, M. G., Chanal, A., Santini, C. L., Wu, L. F., Palmer, T. & DeLisa, M. P. 2007. An essential role for the DnaK molecular chaperone in stabilizing over-expressed substrate proteins of the bacterial twin-arginine translocation pathway. *Journal of Molecular Biology*, 367, 715-730, 10.1016/j.jmb.2007.01.027.
- Perkins, G., Renken, C., Martone, M. E., Young, S. J., Ellisman, M. & Frey, T. 1997. Electron tomography of neuronal mitochondria: Three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. *Journal of Structural Biology*, 119, 260-272, 10.1006/jsbi.1997.3885.
- Perry, S. E. & Keegstra, K. 1994. Envelope membrane proteins that interact with chloroplastic precursor proteins. *The Plant Cell*, 6, 93-105, 10.1105/tpc.6.1.93.
- Peters, K., Belt, K. & Braun, H. P. 2013. 3D gel map of Arabidopsis complex I. *Frontiers in Plant Science*, 4, 10.3389/fpls.2013.00153.
- Petit, P. X., Edman, K. A., Gardeström, P. & Ericson, I. 1987. Some properties of mitochondria, mitoplasts and submitochondrial particles of different polarities from plant tissues. *Biochimica et Biophysica Acta: Bioenergetics*, 890, 377-386, 10.1016/0005-2728(87)90166-6.
- Petit, P. X., Gardeström, P., Rasmusson, A. G. & Møller, I. M. 1991. Properties of submitochondrial particles from plant mitochondria: generation, surface characteristics and NAD(P)H oxidation. *Plant Science*, 78, 177-183, 10.1016/0168-9452(91)90196-f.
- Petrů, M., Wideman, J., Moore, K., Alcock, F., Palmer, T. & Doležal, P. 2018. Evolution of mitochondrial TAT translocases illustrates the loss of bacterial protein transport machines in mitochondria. *BMC Biology*, 16, 10.1186/s12915-018-0607-3.
- Petruzzella, V., Tiranti, V., Fernandez, P., Ianna, P., Carrozzo, R. & Zeviani, M. 1998. Identification and characterization of human cDNAs specific to BCS1, PET112, SCO1, COX15, and COX11, five genes involved in the formation and function of the mitochondrial respiratory chain. *Genomics*, 54, 494-504, 10.1006/geno.1998.5580.
- Pett, W. & Lavrov, D. V. 2013. The twin-arginine subunit C in *Oscarella*: Origin, evolution, and potential functional significance. *Integrative and Comparative Biology*, 53, 495-502, 10.1093/icb/ict079.

- Pettersson, P., Ye, W., Jakob, M., Tannert, F., Klösigen, R. B. & Maler, L. 2018. Structure and dynamics of plant TatA in micelles and lipid bilayers studied by solution NMR. *The FEBS Journal*, 285, 1886-1906, 10.1111/febs.14452.
- Pohlschröder, M., Giménez, M. I. & Jarrell, K. F. 2005. Protein transport in Archaea: Sec and twin arginine translocation pathways. *Current Opinion in Microbiology*, 8, 713-719, 10.1016/j.mib.2005.10.006.
- Przybyla-Toscano, J., Roland, M., Gaymard, F., Couturier, J. & Rouhier, N. 2018. Roles and maturation of iron-sulfur proteins in plastids. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 23, 567-567, 10.1007/s00775-018-1570-8.
- Punginelli, C., Maldonado, B., Grahl, S., Jack, R., Alami, M., Schröder, J., Berks, B. C. & Palmer, T. 2007. Cysteine scanning mutagenesis and topological mapping of the *Escherichia coli* twin-arginine translocase TatC component. *Journal of Bacteriology*, 189, 5482-5494, 10.1128/Jb.00647-07.
- Rao, R. S. P., Salvato, F., Thal, B., Eubel, H., Thelen, J. J. & Møller, I. M. 2017. The proteome of higher plant mitochondria. *Mitochondrion*, 33, 22-37, 10.1016/j.mito.2016.07.002.
- Rasmusson, A. G., Soole, K. L. & Elthon, T. E. 2004. Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 23-39, 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141720.
- Reimers, M. 2020. Charakterisierung thylakoidärer TatBC-Rezeptorkomplexe. *Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- Richter, S. & Lamppa, G. K. 1998. A chloroplast processing enzyme functions as the general stromal processing peptidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 7463-7468, 10.1073/pnas.95.13.7463.
- Riedel, A., Rutherford, A. W., Hauska, G., Müller, A. & Nitschke, W. 1991. Chloroplast Rieske Center. EPR study on its spectral characteristics, relaxation and orientation properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 266, 17838-17844, 10.1016/S0021-9258(18)55204-2.
- Rieske, J. S., MacLennan, D. H. & Coleman, R. 1964. Isolation and properties of an iron-protein from the (reduced coenzyme Q)-cytochrome C reductase complex of the respiratory chain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 15, 338-344, 10.1016/0006-291x(64)90171-8.
- Robinson, C., Cai, D., Hulford, A., Brock, I. W., Michl, D., Hazell, L., Schmidt, I., Herrmann, R. G. & Klösigen, R. B. 1994. The presequence of a chimeric construct dictates which of two mechanisms are utilized for translocation across the thylakoid membrane: evidence for the existence of two distinct translocation systems. *The EMBO Journal*, 13, 279-285, 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06260.x.
- Robinson, C., Woolhead, C. & Edwards, W. 2000. Transport of proteins into and across the thylakoid membrane. *Journal of Experimental Botany*, 51, 369-374, 10.1093/jexbot/51.suppl\_1.369.
- Rochaix, J. D. 2022. Chloroplast protein import machinery and quality control. *The FEBS Journal*, 289, 6908-6918, 10.1111/febs.16464.
- Rödiger, A. 2010. Untersuchungen zur Organellspezifität des Proteintransports in eukaryotischen Pflanzenzellen am Beispiel von Cytochrom c<sub>1</sub>. *Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- Rödiger, A., Baudisch, B. & Klösigen, R. B. 2010. Simultaneous isolation of intact mitochondria and chloroplasts from a single pulping of plant tissue. *Journal of Plant Physiology*, 167, 620-624, 10.1016/j.jplph.2009.11.013.

- Rodriguez, F., Rouse, S. L., Tait, C. E., Harmer, J., De Riso, A., Timmel, C. R., Sansom, M. S. P., Berks, B. & Schnell, J. R. 2013. Structural model for the protein-translocating element of the twin-arginine transport system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, E1092-E1101, 10.1073/pnas.1219486110.
- Roffey, R. A. & Theg, S. M. 1996. Analysis of the import of carboxyl-terminal truncations of the 23-Kilodalton subunit of the oxygen-evolving complex suggests that its structure is an important determinant for thylakoid transport. *Plant Physiology*, 111, 1329-1338, 10.1104/pp.111.4.1329.
- Rollauer, S. E., Tarry, M. J., Graham, J. E., Jääskeläinen, M., Jäger, F., Johnson, S., Krehenbrink, M., Liu, S. M., Lukey, M. J., Marcoux, J., McDowell, M. A., Rodriguez, F., Roversi, P., Stansfeld, P. J., Robinson, C. V., Sansom, M. S. P., Palmer, T., Högbom, M., Berks, B. C. & Lea, S. M. 2012. Structure of the TatC core of the twin-arginine protein transport system. *Nature*, 492, 210–214, 10.1038/nature11683.
- Rose, R. W., Brüser, T., Kissinger, J. C. & Pohlschroder, M. 2002. Adaptation of protein secretion to extremely high-salt conditions by extensive use of the twin-arginine translocation pathway. *Molecular Microbiology*, 45, 943-950, 10.1046/j.1365-2958.2002.03090.x.
- Salter, A. H., Newman, B. J., Napier, J. A. & Gray, J. C. 1992. Import of the precursor of the chloroplast Rieske iron-sulphur protein by pea chloroplasts. *Plant Molecular Biology*, 20, 569–574, 10.1007/bf00040617.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- San Miguel, M., Marrington, R., Rodger, P. M., Rodger, A. & Robinson, C. 2003. An *Escherichia coli* twin-arginine signal peptide switches between helical and unstructured conformations depending on the hydrophobicity of the environment. *European Journal of Biochemistry*, 270, 3345-3352, 10.1046/j.1432-1033.2003.03710.x.
- Sánchez, E., Lobo, T., Fox, J. L., Zeviani, M., Winge, D. R. & Fernandez-Vizarra, E. 2013. LYRM7/MZM1L is a UQCRC1 chaperone involved in the last steps of mitochondrial Complex III assembly in human cells. *Biochimica et Biophysica Acta: Bioenergetics*, 1827, 285-293, 10.1016/j.bbabi.2012.11.003.
- Sargent, F., Gohlke, U., de Leeuw, E., Stanley, N. R., Palmer, T., Saibil, H. R. & Berks, B. C. 2001. Purified components of the *Escherichia coli* Tat protein transport system form a double-layered ring structure. *European Journal of Biochemistry*, 268, 3361-3367, 10.1046/j.1432-1327.2001.02263.x.
- Sargent, F., Stanley, N. R., Berks, B. C. & Palmer, T. 1999. Sec-independent protein translocation in *Escherichia coli*. A distinct and pivotal role for the TatB protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 36073-36082, 10.1074/jbc.274.51.36073.
- Sauer, R. T., Bolon, D. N., Burton, B. M., Burton, R. E., Flynn, J. M., Grant, R. A., Hersch, G. L., Joshi, S. A., Kenniston, J. A., Levchenko, I., Neher, S. B., Oakes, E. S. C., Siddiqui, S. M., Wah, D. A. & Baker, T. A. 2004. Sculpting the proteome with AAA+ proteases and disassembly machines. *Cell*, 119, 9-18, 10.1016/j.cell.2004.09.020.
- Sayed, M., Krishnamurthy, B. & Pal, H. 2016. Unraveling multiple binding modes of acridine orange to DNA using a multispectroscopic approach. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 18, 24642-24653, 10.1039/c6cp03716j.
- Schäfer, K., Künzler, P., Klingl, A., Eubel, H. & Carrie, C. 2020. The plant mitochondrial TAT pathway is essential for complex III biogenesis. *Current Biology*, 10.1016/j.cub.2020.01.001.

- Schagger, H., Cramer, W. A. & von Jagow, G. 1994. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 217, 220–230, 10.1006/abio.1994.1112.
- Schatz, G. & Dobberstein, B. 1996. Common principles of protein translocation across membranes. *Science*, 271, 1519–1526, 10.1126/science.271.5255.1519.
- Schenk, H. E. A., Herrmann, R. G., Jeon, K. W., Müller, N. E. & Schwemmler, W. (eds.) 1997. *Eukaryotism and symbiosis: Intertaxonic combination versus symbiotic adaptation*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Schleiff, E. & Klösgen, R. B. 2001. Without a little help from 'my' friends: Direct insertion of proteins into chloroplast membranes? *Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Cell Research*, 1541, 22–33, 10.1016/s0167-4889(01)00152-5.
- Schlesier, R. 2015. Zum Tat-abhängigen Proteintransport an der Thylakoidmembran: Membraninteraktion, Rezeptorbindung und Translokation des chimären 16/23 Proteins. *Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- Schlesier, R. & Klösgen, R. B. 2015. C-terminal truncation of a Tat passenger protein affects its membrane translocation by interfering with receptor binding. *Biological Chemistry*, 396, 349–357, 10.1515/hsz-2014-0249.
- Schmidt, C. L. & Shaw, L. 2001. A comprehensive phylogenetic analysis of Rieske and Rieske-type iron-sulfur proteins. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 33, 9–26, 10.1023/A:1005616505962.
- Schneider, T. D. & Stephens, R. M. 1990. Sequence logos: A new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Research*, 18, 6097–6100, 10.1093/nar/18.20.6097.
- Schubert, T., Lenz, O., Krause, E., Volkmer, R. & Friedrich, B. 2007. Chaperones specific for the membrane-bound [NiFe]-hydrogenase interact with the Tat signal peptide of the small subunit precursor in *Ralstonia eutropha* H16. *Molecular Microbiology*, 66, 453–467, 10.1111/j.1365-2958.2007.05933.x.
- Schünemann, D. 2007. Mechanisms of protein import into thylakoids of chloroplasts. *Biological Chemistry*, 388, 907–915, 10.1515/Bc.2007.111.
- Schünemann, D., Amin, P., Hartmann, E. & Hoffman, N. E. 1999. Chloroplast SecY is complexed to SecE and involved in the translocation of the 33-kDa but not the 23-kDa subunit of the oxygen-evolving complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 12177–12182, 10.1074/jbc.274.17.12177.
- Senkler, J., Senkler, M., Eubel, H., Hildebrandt, T., Lengwenus, C., Schertl, P., Schwarzländer, M., Wagner, S., Wittig, I. & Braun, H. P. 2017. The mitochondrial complexome of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 89, 1079–1092, 10.1111/tpj.13448.
- Settles, A. M., Yonetani, A., Baron, A., Bush, D. R., Cline, K. & Martienssen, R. 1997. Sec-independent protein translocation by the maize Hcf106 protein. *Science*, 278, 1467–1470, 10.1126/science.278.5342.1467.
- Sharma, M. 2019. Determining targeting specificity of nuclear encoded organelle proteins. *Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- Sharma, M., Kretschmer, C., Lampe, C., Stuttmann, J. & Klösgen, R. B. 2019. Targeting specificity of nuclear-encoded organelle proteins with a self-assembling split-fluorescent protein toolkit. *Journal of Cell Science*, 132, 10.1242/jcs.230839.

- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W. Z., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D. & Higgins, D. G. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7, 10.1038/msb.2011.75.
- Smet, J., de Paepe, B., Seneca, S., Lissens, W., Kotarsky, H., de Meirleir, L., Fellman, V. & van Coster, R. 2011. Complex III staining in blue native polyacrylamide gels. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 34, 741-747, 10.1007/s10545-011-9315-7.
- Solmaz, S. R. N. & Hunte, C. 2008. Structure of complex III with bound cytochrome c in reduced state and definition of a minimal core interface for electron transfer. *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 17542-17549, 10.1074/jbc.M710126200.
- Spang, A., Saw, J. H., Jørgensen, S. L., Zaremba-Niedzwiedzka, K., Martijn, J., Lind, A. E., van Eijk, R., Schleper, C., Guy, L. & Ettema, T. J. G. 2015. Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature*, 521, 173–179, 10.1038/nature14447.
- Spurr, A. R. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research*, 26, 31-43, 10.1016/S0022-5320(69)90033-1.
- Stanley, N. R., Palmer, T. & Berks, B. C. 2000. The twin arginine consensus motif of Tat signal peptides is involved in Sec-independent protein targeting in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 11591-11596, 10.1074/jbc.275.16.11591.
- Summer, E. J., Mori, H., Settles, A. M. & Cline, K. 2000. The thylakoid delta pH-dependent pathway machinery facilitates RR-independent N-tail protein integration. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 23483-23490, 10.1074/jbc.M004137200.
- Sünkel, S., Brennicke, A. & Knoop, V. 1994. RNA editing of a conserved reading frame in plant mitochondria increases its similarity to two overlapping reading frames in *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics*, 242, 65-72, 10.1007/BF00277349.
- Szyrach, G., Ott, M., Bonnefoy, N., Neupert, W. & Herrmann, J. M. 2003. Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. *The EMBO Journal*, 22, 6448-6457, 10.1093/emboj/cdg623.
- Tamura, K., Stecher, G. & Kumar, S. 2021. MEGA11 molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38, 3022-3027, 10.1093/molbev/msab120.
- Tang, W. K., Borgnia, M. J., Hsu, A. L. L., Esser, L., Fox, T., de Val, N. & Xia, D. 2020. Structures of AAA protein translocase Bcs1 suggest translocation mechanism of a folded protein. *Nature Structural & Molecular Biology*, 27, 202–209, 10.1038/s41594-020-0373-0.
- Tarry, M., Arends, S. J. R., Roversi, P., Piette, E., Sargent, F., Berks, B. C., Weiss, D. S. & Lea, S. M. 2009. The *Escherichia coli* cell division protein and model Tat substrate SufI (FtsP) localizes to the septal ring and has a multicopper oxidase-like structure. *Journal of Molecular Biology*, 386, 504–519, 10.1016/j.jmb.2008.12.043.
- Teter, S. A. & Klionsky, D. J. 1999. How to get a folded protein across a membrane. *Trends in Cell Biology*, 9, 428-431, 10.1016/S0962-8924(99)01652-9.
- Teter, S. A. & Theg, S. M. 1998. Energy-transducing thylakoid membranes remain highly impermeable to ions during protein translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 1590-1594, 10.1073/pnas.95.4.1590.
- Tokumoto, U., Kitamura, S., Fukuyama, K. & Takahashi, Y. 2004. Interchangeability and distinct properties of bacterial Fe-S cluster assembly systems: Functional replacement of the isc and suf operons in *Escherichia coli* with the nifSU-like operon from *Helicobacter pylori*. *Journal of Biochemistry*, 136, 199-209, 10.1093/jb/mvh104.

- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 4350–4354, 10.1073/pnas.76.9.4350.
- Trumpower, B. L. 1990. The protonmotive Q-Cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome  $bc_1$  complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 265, 11409–11412, 10.1016/S0021-9258(19)38410-8.
- Trumpower, B. L. & Gennis, R. B. 1994. Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: the enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton translocation. *Annual Review of Biochemistry*, 63, 675–716, 10.1146/annurev.bi.63.070194.003331.
- Truscott, K. N., Lowth, B. R., Strack, P. R. & Dougan, D. A. 2010. Diverse functions of mitochondrial AAA plus proteins: Protein activation, disaggregation, and degradation. *Biochemistry and Cell Biology*, 88, 97–108, 10.1139/O09-167.
- Ueda, M. & Kadowaki, K. I. 2012. Gene content and gene transfer from mitochondria to the nucleus during evolution. *Advances in Botanical Research*, 63, 21–40, 10.1016/B978-0-12-394279-1.00002-8.
- Ulfig, A., Fröbel, J., Lausberg, F., Blümmel, A. S., Heide, A. K., Müller, M. & Freudl, R. 2017. The h-region of twin-arginine signal peptides supports productive binding of bacterial Tat precursor proteins to the TatBC receptor complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 292, 10865–10882, 10.1074/jbc.M117.788950.
- Unsold, M., Marienfeld, J. R., Brandt, P. & Brennicke, A. 1997. The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nature Genetics*, 15, 57–61, 10.1038/ng0197-57.
- Valer, L., Rossetto, D., Parkkila, T., Sebastianelli, L., Guella, G., Hendricks, A. L., Cowan, J. A., Sang, L. Z. & Mansy, S. S. 2022. Histidine ligated iron-sulfur peptides. *ChemBiochem*, 23, 10.1002/cbic.202200202.
- van den Ent, F. & Löwe, J. 2006. RF cloning: A restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 67, 67–74, 10.1016/j.jbbm.2005.12.008.
- Visapää, I., Fellman, V., Vesa, J., Dasvarma, A., Hutton, J. L., Kumar, V., Payne, G. S., Makarow, M., Van Coster, R., Taylor, R. W., Turnbull, D. M., Suomalainen, A. & Peltonen, L. 2002. GRACILE syndrome, a lethal metabolic disorder with iron overload, is caused by a point mutation in *BGS1L*. *American Journal of Human Genetics*, 71, 863–876, 10.1086/342773.
- Vogel, F., Bornhövd, C., Neupert, W. & Reichert, A. S. 2006. Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *The Journal of Cell Biology*, 175, 237–247, 10.1083/jcb.200605138.
- von Heijne, G. 1985. Signal sequences. The limits of variation. *Journal of Molecular Biology*, 184, 99–105, 10.1016/0022-2836(85)90046-4.
- von Heijne, G. 1990. The signal peptide. *Journal of Membrane Biology*, 115, 195–201, 10.1007/Bf01868635.
- von Heijne, G., Steppuhn, J. & Herrmann, R. G. 1989. Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *European Journal of Biochemistry*, 180, 535–545, 10.1111/j.1432-1033.1989.tb14679.x.
- Waclawek, M. 2016. Spinat als alternatives Modellsystem zur Analyse des Tat-abhängigen Membrantransports von Proteinen. *Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.

- Wagener, N., Ackermann, M., Funes, S. & Neupert, W. 2011. A pathway of protein translocation in mitochondria mediated by the AAA-ATPase Bcs1. *Molecular Cell*, 44, 191–202, 10.1016/j.molcel.2011.07.036.
- Wagener, N. & Neupert, W. 2012. Bcs1, a AAA protein of the mitochondria with a role in the biogenesis of the respiratory chain. *Journal of Structural Biology*, 179, 121–125, 10.1016/j.jsb.2012.04.019.
- Wakiuchi, N., Tanimoto, H., Harada, H., Oji, Y. & Shiga, H. 1988. Characterization of proton pumping and ATPase activities in microsomal fractions from barley roots. *Soil Science and Plant Nutrition*, 34, 507–518, 10.1080/00380768.1988.10416467.
- Walker, M. B., Roy, L. M., Coleman, E., Völker, R. & Barkan, A. 1999. The maize *tha4* gene functions in Sec-independent protein transport in chloroplasts and is related to *hcf106*, *tatA*, and *tatB*. *The Journal of Cell Biology*, 147, 267–276, 10.1083/jcb.147.2.267.
- Wang, X. J. & Lavrov, D. V. 2007. Mitochondrial genome of the homoscleromorph *Oscarella carmela* (Porifera, Demospongiae) reveals unexpected complexity in the common ancestor of sponges and other animals. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 363–373, 10.1093/molbev/msl167.
- Wang, Z. & Wu, M. 2015. An integrated phylogenomic approach toward pinpointing the origin of mitochondria. *Scientific Reports*, 5, 10.1038/srep07949.
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., de Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R. & Schwede, T. 2018. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46, W296–W303, 10.1093/nar/gky427.
- Weber-Lotfi, F., Koulintchenko, M. V., Ibrahim, N., Hammann, P., Mileschina, D. V., Konstantinov, Y. M. & Dietrich, A. 2015. Nucleic acid import into mitochondria: New insights into the translocation pathways. *Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Cell Research*, 1853, 3165–3181, 10.1016/j.bbamcr.2015.09.011.
- Weiner, J. H., Bilous, P. T., Shaw, G. M., Lubitz, S. P., Frost, L., Thomas, G. H., Cole, J. A. & Turner, R. J. 1998. A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins. *Cell*, 93, 93–101, 10.1016/S0092-8674(00)81149-6.
- Wollman, F. A. 2016. An antimicrobial origin of transit peptides accounts for early endosymbiotic events. *Traffic*, 17, 1322–1328, 10.1111/tra.12446.
- Wu, L. F., Ize, B., Chanal, A., Quentin, Y. & Fichant, G. 2000. Bacterial twin-arginine signal peptide-dependent protein translocation pathway: Evolution and mechanism. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2, 179–189.
- Wurm, C. A. & Jakobs, S. 2006. Differential protein distributions define two sub-compartments of the mitochondrial inner membrane in yeast. *FEBS Letters*, 580, 5628–5634, 10.1016/j.febslet.2006.09.012.
- Xia, D. 2021. Structural snapshots of the cellular folded protein translocation machinery Bcs1. *The FEBS Journal*, 288, 2870–2883, 10.1111/febs.15576.
- Yen, M. R., Tseng, Y. H., Nguyen, E. H., Wu, L. F. & Saier, M. H. 2002. Sequence and phylogenetic analyses of the twin-arginine targeting (Tat) protein export system. *Archives of Microbiology*, 177, 441–450, 10.1007/s00203-002-0408-4.
- Zara, V., Conte, L. & Trumpower, B. L. 2007. Identification and characterization of cytochrome *bc*<sub>1</sub> subcomplexes in mitochondria from yeast with single and double deletions of genes encoding cytochrome *bc*<sub>1</sub> subunits. *The FEBS Journal*, 274, 4526–4539, 10.1111/j.1742-4658.2007.05982.x.

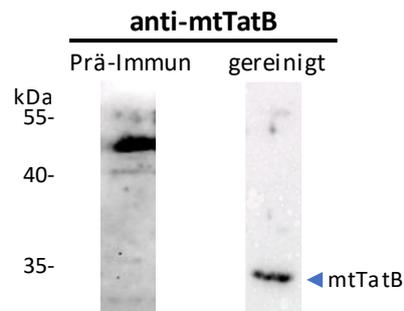
- Zara, V., Conte, L. & Trumppower, B. L. 2009. Evidence that the assembly of the yeast cytochrome  $bc_1$  complex involves the formation of a large core structure in the inner mitochondrial membrane. *The FEBS Journal*, 276, 1900-1914, 10.1111/j.1742-4658.2009.06916.x.
- Zara, V., de Blasi, G. & Ferramosca, A. 2022. Assembly of the multi-subunit cytochrome  $bc_1$  complex in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 10.3390/ijms231810537.
- Zhang, B. T., van Aken, O., Thatcher, L., de Clercq, I., Duncan, O., Law, S. R., Murcha, M. W., van der Merwe, M., Seifi, H. S., Carrie, C., Cazzonelli, C., Radomiljac, J., Höfte, M., Singh, K. B., van Breusegem, F. & Whelan, J. 2014a. The mitochondrial outer membrane AAA ATPase AtOM66 affects cell death and pathogen resistance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 80, 709-727, 10.1111/tpj.12665.
- Zhang, Y., Hu, Y. F., Li, H. W. & Jin, C. W. 2014b. Structural basis for TatA oligomerization: An NMR study of *Escherichia coli* TatA dimeric structure. *PLoS One*, 9, 10.1371/journal.pone.0103157.
- Zhang, Y., Wang, L., Hu, Y. F. & Jin, C. W. 2014c. Solution structure of the TatB component of the twin-arginine translocation system. *Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes*, 1838, 1881-1888, 10.1016/j.bbamem.2014.03.015.
- Zhang, Y. J., Tian, H. F. & Wen, J. F. 2009. The evolution of YidC/Oxa/Alb3 family in the three domains of life: A phylogenomic analysis. *BMC Evolutionary Biology*, 9, 10.1186/1471-2148-9-137.
- Ziehe, D., Dunschede, B. & Schünemann, D. 2018. Molecular mechanism of SRP-dependent light-harvesting protein transport to the thylakoid membrane in plants. *Photosynthesis Research*, 138, 303-313, 10.1007/s11120-018-0544-6.
- Zinecker, S. 2020. Funktionelle Charakterisierung der TatB-Untereinheit der thylakoidären Tat-Translokase. *Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- Zinecker, S., Jakob, M. & Klösgen, R. B. 2020. Functional reconstitution of TatB into the thylakoidal Tat translocase. *Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Cell Research*, 1867, 10.1016/j.bbamcr.2019.118606.

## Publikationen

### **Manuskript in Arbeit:**

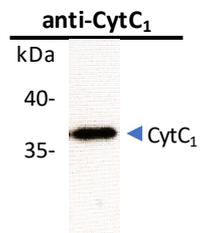
Ehmke L, Hause G, Klösgen RB, Bennewitz B (2023): Preparation of physiologically active inside-out vesicles from plant inner mitochondrial membranes.





**Abb. A.3: Immundetektion von mtTatB in isolierten Mitochondrien aus *S. oleracea*.**

Die Proteine isolierter Mitochondrien ( $\cong 50 \mu\text{g}$  Gesamtprotein) aus *Spinacia oleracea* wurden denaturiert und anschließend in einem 10-17,5 %igen SDS-PA-Gradientengel separiert. Nach erfolgtem Proteintransfer auf PVDF-Membranen erfolgte die Immundetektion von mtTatB (◀ mtTatB), welche über eine HRP-vermittelte ECL-Reaktion visualisiert wurde. Neben dem affinitätsgereinigten Antiserum (gereinigt) wurde als Kontrolle auch das Prä-Immuneserum getestet. Die Referenzwerte des verwendeten Größenstandards sind links in kDa angegeben.



**Abb. A.4: Immundetektion von Cytochrom *c*<sub>1</sub> in isolierten Mitochondrien aus *P. sativum*.**

Die Proteine isolierter Mitochondrien ( $\cong 50 \mu\text{g}$  Gesamtprotein) aus *Pisum sativum* wurden denaturiert und anschließend in einem 10-17,5 %igen SDS-PA-Gradientengel separiert. Nach erfolgtem Proteintransfer auf eine PVDF-Membran erfolgte die Immundetektion von Cytochrom *c*<sub>1</sub> (◀ CytC<sub>1</sub>), welche über eine HRP-vermittelte ECL-Reaktion visualisiert wurde. Die Referenzwerte des verwendeten Größenstandards sind links in kDa angegeben.

...

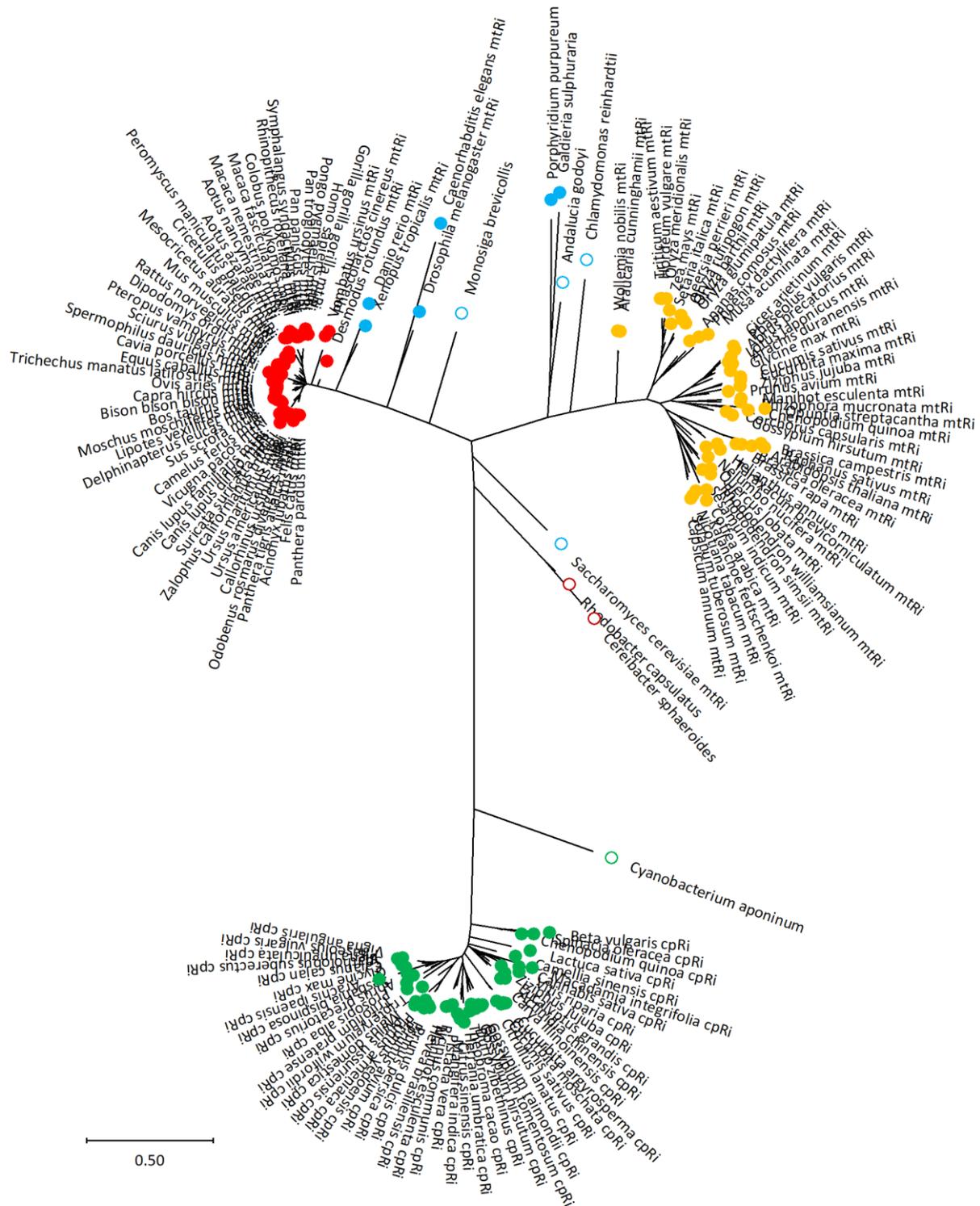
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NDADKGRSYA-YFMVGAMGLLSAGAKSTVETFISSMTATADVLAMAKVEVNLAAIPLGK	105
<i>Caenorhabditis elegans</i>	DTEDQRRALPTALYYGAGGVLSLWAGKEVVQTLVSYKAMAADQORALASIEINMADIPEGK	164
<i>Drosophila melanogaster</i>	DTAEERKAFS-YLMVGAGAVGGAYAAKGLVNTFIGSMSASAEDVLAMAKIEIKLSDIPEGK	119
<i>Danio rerio</i>	ESGDARRAFS-YLMTGSTLVVGVYTAKTVVTTQFVSSMSASADVLALSKIEIKLADIPEGK	162
<i>Xenopus tropicalis</i>	TSSDSRKSFY-YLVTGVTAVATAYAAKNAVTQFVTSMSASADVLAMSKIEIKLSDIPEGK	162
<i>Mus musculus</i>	ESSEARRKCFY-YLVTATTTVGVAYAAKNVVSQFVSSMSASADVLAMSKIEIKLSDIPEGK	163
<i>Homo sapiens</i>	ESSEARRKCFY-YLVTGVTTVGVAYAAKNAVTQFVSSMSASADVLALAKIEIKLSDIPEGK	163
<b><i>Solanum tuberosum</i></b>	PGDPSKRFA-YFVLTGGRFVYASLLRLLILKFFVLSMSASKDVLALASLEVDLSSIEPGS	154
<b><i>Arabidopsis thaliana</i></b>	PGDPSKRFA-YFVLSGGRFVYASVLRLLVLKLVMSMSASKDVLALASLEVDLGSIEPGT	161
<b><i>Rhodobacter capsulatus</i></b>	DNAGTRRDFL-YHATAATGVVV---TGAAVWPLINQMNASADVKAMSSIFVDVSAVEVGT	61
<b><i>Cereibacter sphaeroides</i></b>	DHAGTRRDFL-YYATAGAGAVA---TGAAVWPLINQMNPASADVQALASIFVDVSSVEPGV	61
	: : : *::: :. : *	

...

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	VKDPQWLIMLGICTHLGCVPIGE-AGDFGGWFPCPHGSHYDISGRIRKGPAPLNLEIPAY	205
<i>Caenorhabditis elegans</i>	VQKDEWSVVIGVCTHLGCVPIAD-AGDYGYYCPCPHGSHYDASGRIRKGPAPLNLVHPAY	264
<i>Drosophila melanogaster</i>	VIKPEWLVVIGVCTHLGCVPIAN-AGDWGGYYCPCPHGSHYDASGRIRKGPAPLNLEVPTH	219
<i>Danio rerio</i>	VVNPSWVIVIGVCTHLGCVPIAN-AGEFGGYYCPCPHGSHYDASGRIRKGPAPLNLEVPHY	262
<i>Xenopus tropicalis</i>	VKKPEWVILIGVCTHLGCVPIAN-AGEFGGYYCPCPHGSHYDASGRIRKGPAPLNLEVPEY	262
<i>Mus musculus</i>	VKKPEWVILIGVCTHLGCVPIAN-AGDFGGYYCPCPHGSHYDASGRIRKGPAPLNLEVPAY	263
<i>Homo sapiens</i>	VKKPEWVILIGVCTHLGCVPIAN-AGDFGGYYCPCPHGSHYDASGRIRKGPAPLNLEVPTY	263
<b><i>Solanum tuberosum</i></b>	VKNPEWLVVVGVCTHLGCIPLPN-AGDFGGWFPCPHGSHYDISGRIRKGPAPYNLEVPTY	254
<b><i>Arabidopsis thaliana</i></b>	VKNPEWLVVVGVCTHLGCIPLPN-AGDYGWFPCPHGSHYDISGRIRKGPAPYNLEVPTY	261
<b><i>Rhodobacter capsulatus</i></b>	TNTGEWLVMVGCTHLGCVPMGDKSGDFGGWFPCPHGSHYDASGRIRKGPAPRNLDIPVA	180
<b><i>Cereibacter sphaeroides</i></b>	DEAGEWLVMVGCTHLGCVPIGGVSGDFGGWFPCPHGSHYDASGRIRKGPAPENLPIPLA	176
	. * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	

**Abb. A.5: Multiples Sequenzalignment der mtRieske-Proteine verschiedener Organismen.**

Die Aminosäuresequenzen mitochondrialer Rieske-Proteine aus Pflanzen (fettgedruckt) und verschiedenen Opisthokonta-Spezies wurden mithilfe der Software „Clustal Omega“ nach Sievers *et al.* (2011) verglichen. Dargestellt sind zwei Sequenzbereiche von jeweils etwa 60 Aminosäuren, wobei der erste Bereich die Proteinsequenz ab dem potentiellen Tat-Motiv beinhaltet (hervorgehoben sind die Aminosäuren Arginin **R**, Lysin **K** und Phenylalanin **F**). Der zweite Sequenzbereich umfasst die hochkonservierte Bindestelle des [2Fe-2S]-Clusters inklusive markiertem **C-x-H-x<sub>15-17</sub>-C-x-x-H**-Motiv. Identische Aminosäuren sind mit \* markiert, ähnliche Aminosäuren mit : und . abgestuft.



**Abb. A.6: Verwandtschaftsanalyse der Rieske-Proteine mittels *maximum likelihood*-Methode.**

Die Verwandtschaft verschiedener Rieske-Proteine wurde mittels *maximum likelihood*-Methode und JTT-Matrixmodell nach Jones *et al.* (1992) anhand ihrer Sequenz analysiert und der phylogenetische Baum mit der höchsten logarithmierten Likelihood (-18715.08) dargestellt. Der Baum ist maßstabsgetreu gezeichnet wobei die Zweiglänge die Anzahl der Substitutionen pro Position wiedergibt. Insgesamt umfasst diese Analyse 150 Aminosäuresequenzen: Rieske-Proteine aus Cyanobakterien (○) und Alphaproteobakterien (○), Chloroplastidäres Rieske (cpRi) höherer Pflanzen (●), sowie mitochondriales Rieske (mtRi) aus Pflanzen (●), Säugern (●) und weiterer mehrzelliger (●) und einzelliger (○) Eukaryoten. Die Analysen wurden in der Software „MEGA11“ durchgeführt (Tamura *et al.*, 2021).

Tab. A.1: Nukleotidsequenzen rekombinanter TatA- und mtRieske-Konstrukte.

**M/M23 – mtRi-Importsignal, mtRi-Signalanker, reifes OEC23****M23 – (ATG) mtRi-Signalanker, reifes OEC23**

**ATGCTTCGAGTAGCAGGTAGAAGGCTTTCTTCTTCAGCCGCTAGATCTTCATCTACCTTCCTTACAAGAAGCTCTT**  
**TTTACCAGTTACCAGATGATTCGTCTCCGGCAAGATCTCCTTCTCCGTCACCTCACCTCTTCGTTTCTCGATCAAATC**  
**AGAGGTTTC (ATG) TCATCTAATTCCGGTTCTCCGCACATCAGTTGGGTTTAGTCTCAGATCTTCCAGCCACAG**  
TGGCTGCTATTAAGAAATCCAGTTCAAAAATGTATATGATGACTCCAACCATGAGCGTTATCCACCTGGTGATC  
CTAGCAAACGAGCTTTTGCTTACTTTGTCTTGACAGGAGGCAGGTTGCTCTATGCCTCATTGCTTCGCCTCC TGA  
TTCTCAAGTTTGTCTGAGCATGTCTGCTAGTAAAGATGTCTTGCACCTGCCGCATATGGAGAAGCTGCTAATG  
TATTCGGGAAGCCAAAGAAAAACACCGAATTCATGCCCTACAACGGAGATGGATTCAGTTGTTGGTACCCTTCAA  
AATGGAACCCAAGCAAAGAGAAAGAGTTCCCTGGTCAAGTTTGGAGTACGAGGACAACTTTGATGCCACCAGCA  
ATTTATCTGTCTGCTCAACCCACTGACAAGAAATCCATCACAGACTTCGGTTCCCTGGAAGATTTCCTCTCC  
AAGTGGATTACTTGTGGTAAACAAGCCTACTTTGAAAAGACTGATTTCTGAGGGTGGTTTCGATTCGGGTGTTG  
TTGCAAGTGCAAACGTCTTGAAGCAGCACCCAGTAGTTGATGGAAAGCAATACACAGCATTACTGTGCTAA  
CAAGAACAGCAGATGGTGATGAGGGTGGAAAAACCAAGTAAATGCAGCGACTGTCAGGACGGTAAGCTTTACA  
TCTGCAAGGCTCAAGCTGAGACAAGAGATGGTTCAAGGGTGCTAAGAAGTTTGTCGAGAGTGCTACCAGTTCTT  
TCAGTGTGCT

**M/M16 – mtRi-Importsignal, mtRi-Signalanker, reifes OEC16****M16 – (ATG) mtRi-Signalanker, reifes OEC16**

**ATGCTTCGAGTAGCAGGTAGAAGGCTTTCTTCTTCAGCCGCTAGATCTTCATCTACCTTCCTTACAAGAAGCTCTT**  
**TTTACCAGTTACCAGATGATTCGTCTCCGGCAAGATCTCCTTCTCCGTCACCTCACCTCTTCGTTTCTCGATCAAATC**  
**AGAGGTTTC (ATG) TCATCTAATTCCGGTTCTCCGCACATCAGTTGGGTTTAGTCTCAGATCTTCCAGCCACAG**  
TGGCTGCTATTAAGAAATCCAGTTCAAAAATGTATATGATGACTCCAACCATGAGCGTTATCCACCTGGTGATC  
CTAGCAAACGAGCTTTTGCTTACTTTGTCTTGACAGGAGGCAGGTTGCTCTATGCCTCATTGCTTCGCCTCC TGA  
TTCTCAAGTTTGTCTGAGCATGTCTGCTAGTAAAGATGTCTTGCACCTGCCGACGCCAGGCCATCGTTGTTG  
GCCCACCACCACCTATCCGGTGGTCTTCCCGGAACAGAAAACCTCGGACCAAGCAAGAGACGGTACCCTTGCCTT  
ACACCAAGGACAGGTTCTACCTTCAACCTCTGCCCTCTACTGAGGCAGCCAAAAGCAAAAATATCCGCCTCTG  
AAATCCTCAACGTGAAGCAATTCATCAGCAGGAAGGCA TGCCATCTCTACAGAATGACTTACGCTTTAGGGCAT  
CATACCTTCGTTATGACCTCAAGACTGTCTCTGCTAAGCCTAAGGATGAGAAGAAATCACTCCAAGAATCA  
CTAGCAAGCTCTCAGCATATCGACAAATTGACCATGCTGCAAAGATAAAGAGCCCTACCAGGCAGAGAAAT  
ACTACGGTCAGACTGTATCCAACATCAATGAAGTTCTTCCAAGCTCGGT

**M/MPC – mtRi-Importsignal, mtRi-Signalanker, reifes Plastocyanin****MPC – (ATG) mtRi-Signalanker, reifes Plastocyanin**

**ATGCTTCGAGTAGCAGGTAGAAGGCTTTCTTCTTCAGCCGCTAGATCTTCATCTACCTTCCTTACAAGAAGCTCTT**  
**TTTACCAGTTACCAGATGATTCGTCTCCGGCAAGATCTCCTTCTCCGTCACCTCACCTCTTCGTTTCTCGATCAAATC**  
**AGAGGTTTC (ATG) TCATCTAATTCCGGTTCTCCGCACATCAGTTGGGTTTAGTCTCAGATCTTCCAGCCACAG**  
TGGCTGCTATTAAGAAATCCAGTTCAAAAATGTATATGATGACTCCAACCATGAGCGTTATCCACCTGGTGATC  
CTAGCAAACGAGCTTTTGCTTACTTTGTCTTGACAGGAGGCAGGTTGCTCTATGCCTCATTGCTTCGCCTCC TGA  
TTCTCAAGTTTGTCTGAGCATGTCTGCTAGTAAAGATGTCTTGCACCTGCCGTAGAGGTGTTGCTCGGAGGGG  
GTGACGGATCATTTGGCATTCCTTCCAGGAGACTT CAGCGTAGCCTCGGCCGAGGAGATCGTATTTCAAGAACAATG  
CCGGATTC CCCACAAAGTAGTGTGACGAGGACGAGATTCCTTCGGTGTGACGCCGCGAAGATTTCGATGT  
CCGAGGAGGATTTGCTGAATGCACCAGGGGAAACTTACAAAGTTACCTTACTGAGAAAGGAAC TTACAAGTTCT  
ACTGCTCACCCACCAGGGTGTGTTGTTGGTGGGAAAAGTAACTGTCAAC

**GrpE/TatA – GrpE-Importsignal, reifes TatA**

ATGTTGGTGTCTAGGGTTTATCAAGAGTTTC TC GCAGCGCAGGCTTACGCTCGTCTTTC TCCTCCGTGTTACT  
CCGAAGAGGAATCAGATTCCGATTGT TGCAAGCCGATTTCAC TGCAATGCCTTC TTCGGTCTAGGCCTGCCTGAG  
CTTGTTGTATTGCGGGAGTCGCTGCTCTTGT TTTCCGGTCCCAAGAAAATTGCCCGAAGTCGGTCGCAGCATCGGC  
 CAAACTGTCAAAGCTTCCAACAGGCAGCAAAGGAAATTGAGACCGAGCTAAAAAGGAACCAAATCCTACAGAA  
 GAAATCTCTGTTGCGAGTGAGCAAGAGAAGCAAGACATTAAGGTTTCCAGCACAAAGGATAATGTAATG

**ATPS/TatA – ATPS-Importsignal, reifes TatA**

ATGGCGAGTCGGCGAATCTTATCATCGCTTCTCCGTTCCTTCGAGTAGATCTACTTCTAAATCCTCCTTGATC  
GGGAGCCGAAACCCGAGGCTTTTATCCCCGGTCCCGCGCATGGAGCCGCTCCATGTGGGACTCCTTGCCCGA  
GTCGCGGAGTAT TGCAATGCCTTC TTCGGTCTAGGCCTGCCTGAGCTTGTGTTAT TGCGGGAGTCGCTGCTCTT  
 GTTTTCGGTCCCAAGAAAATTGCCCGAAGTCGGTCGCAGCATCGGCCAAACTGTCAAAGCTTCCAACAGGCAGCA  
 AAGGAAATTTGAGACCGAGCTAAAAAGGAACCAAATCCTACAGAAGAAATCTCTGTGCGAGTGAGCAAGAGAAG  
 CAAGACATTAAGGTTTCCAGCACAAAGGATAATGTAATG

**mtRi/TatA – mtRieske-Importsignal, reifes TatA**

ATGCTTCGAGTAGCAGGTAGAAGGCTTTCTCTTCAGCCGCTAGATCTTCATCTACCTTCTTTACAAGAAGCTCT  
TTCACCGTTACCGATGATTCGCTCTCCGGCAAGATCTCCTTCTCCGTCACCTCACCTCTTCGTTTC TCGATCAAATC  
AGAGGTTTCTGCAATGCCCTTCTTCGGTCTAGGCGTGCTGAGCTTGTTGTATTGCGGGAGTCGCTGCTCTTGT  
 TTCGGTCCCAAGAAATTGCCCGAAGTCGGTCGCAGCATCGGCCAAACTGTCAAAGCTTCCAACAGGCAGCAAAG  
 GAATTTGAGACCGAGCTAAAAAGGAACCAAATCCTACAGAAGAAAATCTCTGTTGCGAGTGAGCAAGAGAAGCAA  
 GACATTAAGGTTTCCAGCACAAAGGATAATGTAATG

**mtRieske (*S. tuberosum*) – Importsignal, Signalanker und hydrophile Domäne von mtRieske**

Sequenz ID: X79332.1

ATGCTTCGAGTAGCAGGTAGAAGGCTTTCTCTTCAGCCGCTAGATCTTCATCTACCTTCTTTACAAGAAGCTCT  
TTCACCGTTACCGATGATTCGCTCTCCGGCAAGATCTCCTTCTCCGTCACCTCACCTCTTCGTTTC TCGATCAAATC  
AGAGGTTTCTCATCTAATTCGGTTC TC CCGCACATCAGTTGGGTTTAGTCTCAGATCTTCAGCCACAGTGGCT  
GCTATTAAGAATCCAGTTCAAAAT TGATAATGATGACTCCAACCATGAGCGTTATCCACCTGGTGATCCTAGC  
AAACGAGCTTTTGTACTTTGTCTTGACAGGAGGCAGGTCGCTATGCCTCATTGCTTCGCCCTCCTGATTCTC  
AAGTTTGTTCGAGCATGCTGCTAGTAAAGATGTCCTTGCACTTGCT TCCTTGAGGTGGATCTTCCAGCATT  
 GAACCAGGGTCAACAGTTACTGTCAAGTGGCGTGAAAAGCCTGTTTCATCAGACGCCGAAC TGACGATGACATC  
 AAATTGCCAAACAGTGTTGATCTCGGCACCCTTCGTGACCCGCAACAAGATGCTGAGAGGGTTAAAAATCCAGAA  
 TGCTTGTGGTTGTGGGGTATGTACTCATTTAGGGTGCAATCCTTACCAAATGCTGGTGATTTTGGTGGTTGG  
 TTTTGCCCATGCCATGGCTCCCATACGACATCTCTGGTAGGATTCGCAAAGGACCCGCACCGTATAATCTGGAG  
 GTGCCTACCTATAGTTCTTGGAAAGAGAACAAGTTACTTATTGGTTGA

## Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater **Prof. Dr. Ralf Bernd „Rabe“ Klösgen** für die herzliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe bedanken. Schon seit der Bachelorarbeit fühle ich mich als fester (und wertgeschätzter) Bestandteil dieser Gruppe, was insbesondere seiner offenen, zwanglosen und jederzeit hilfs- und diskussionsbereiten Art zu verdanken ist. Vielen Dank für die herausragende Betreuung und die vielen Möglichkeiten, mich menschlich und fachlich weiterzuentwickeln.

Neben Rabe als meinem Erstgutachter möchte ich mich auch oftmals bei **Prof. Dr. Kristina Kühn** und **Prof. Dr. Roland Lill** für das Verfassen des Zweit- bzw. Drittgutachtens bedanken. Bei der Gelegenheit auch vielen Dank an die gesamte AG Kühn (insbesondere Etienne) für die freundliche und hilfsbereite Art und den wertvollen Wissens- und Materialaustausch. Danke an Prof. Lill, dass er mich für einige Tage in Marburg aufgenommen hat und dazu bereit war, mir mit meinen Fe/S-Cluster-Problemen weiterzuhelfen.

Bei den Mitgliedern meines „Thesis Committees“, **Prof. Dr. Bettina Hause** und **Prof. Dr. Edgar Peiter**, möchte ich mich ebenfalls für unsere regelmäßigen Treffen bedanken. Ich hatte das Gefühl, in dieser Runde sehr gut aufgehoben und mit Problemen oder Fragen nicht alleine zu sein.

Spezieller Dank gilt auch **Dr. Gerd Hause** und **Simone Fraas** für die Unterstützung bei der Anfertigung elektronenmikroskopischer Aufnahmen und die gute Zusammenarbeit.

**Dr. Bationa Bennewitz** war für mich seit Tag 1 die Ansprechpartnerin in der AG Klösgen und hat mich mit viel Witz und immer auf Augenhöhe seit Beginn der Bachelorarbeit unterstützt und durch den Laboralltag geleitet. Mit ihr im Team zu arbeiten hat wirklich viel Spaß bereitet und das freundliche Arbeiten miteinander ist sicher ein ausschlaggebender Grund für mich gewesen, auch die Masterarbeit in der AG Klösgen zu verfassen. Achso... und die Dissertation. Never change a running system! Auch **Dr. Mario Jakob** habe ich zu danken, da er mir mit allerlei Fragen zur Proteinbiochemie weiterhelfen konnte und nicht zuletzt für die Kreation von MCCB (der interessierte Leser möge einen Blick auf Kapitel 3.1.2.3 werfen).

Vielen Dank natürlich auch an **Birgit Kretschmann**, ohne deren Erfahrung im Labor nur wenig laufen würde. Bei Fragen oder auf einen schnellen Lacher konnte man immer bei ihr vorbeischaun und, je nachdem, die Arbeit vertiefen oder für einen kurzen Moment ausblenden. Bei **Ulrike Godzenski**, die mich insbesondere zu Beginn meines Studiums im Labor begleitet hat, möchte ich mich ebenfalls für die Hilfe und Unterstützung bedanken.

Während meiner Promotionszeit durfte ich einen Haufen netter und hilfsbereiter **Kollegen** kennenlernen, woraus sich auch gute Freundschaften und viele schöne wie unvergessliche Momente ergeben haben. Danke an meine „Vorgänger“, **Matthias, Sarah, Jana** und **René**, von welchen ich viel gelernt und abgeschaut habe und auf deren Hilfe ich mich auch nach ihrer Promotion noch verlassen konnte. Hier dann auch gleich ein dickes Dankeschön an Sarah und René für das Korrekturlesen meiner Arbeit und an Matthias für die Hilfe bei der Bioinformatik. Und danke an meine „Nachfolger“, **Ming, Ditya, Franzisca** und **Nico**, für das schöne Forschen und die gemeinsame Zeit. Weiterhin viel Glück und Erfolg!

Einen großen Teil meiner Promotionszeit habe ich zusammen mit meinen vielen und großartigen Kollegen im **Graduiertenkolleg** verbracht und ich bin wirklich froh, dass ich Teil dieser Gruppe sein durfte. Über die vielen Seminare mit anregenden und hilfreichen Diskussionen sowie all die anderen Treffen und Aktivitäten ist unsere bunte Gruppe aus Betreuern und Studenten wirklich eng zusammengewachsen und es hat viel Spaß gemacht, mit euch zu arbeiten und von euch zu lernen.

Doch was wäre all dies ohne die richtigen **Freunde** an meiner Seite. In diesem Sinne möchte ich mich bei all meinen lieben Freunden bedanken, die mich im Studium begleitet haben und (bitte bitte) darüber hinaus begleiten werden, egal wo es uns alle hin verschlagen wird. Die Zeit in Halle bleibt in jedem Fall unvergesslich!

Zum krönenden Abschluss möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, vorneweg bei meinen geliebten **Eltern**, auf die ich mich zu jeder Tages-, Nacht- und Jahreszeit verlassen kann. Auch ihr wart mir mit dem Lesen meiner Arbeit und der Korrektur kleiner Fehlerchen eine große Hilfe. Ohne meine (allerbeste) Frau **Sina** hätte ich all das allerdings nicht auf die gleiche Weise vollbringen können. Ich bin dir unendlich dankbar für die tägliche Unterstützung (zusammen mit Katze **OREO®**), und dass du mir den nötigen Antrieb und die Rückendeckung gegeben hast, meine Forschung und diese Arbeit zu vollenden. Ich möchte dir eine ebenso große Hilfe sein und freue mich darauf, nun die nächsten Herausforderungen zusammen mit dir zu meistern.

# Lebenslauf

## PERSÖNLICHE DATEN

Name: Leander Ehmke  
 Geburtsdatum / -ort: 20.02.1994 / Eutin  
 Staatsangehörigkeit: deutsch

## BERUFLICHE ERFAHRUNG & AUSBILDUNG

- 09/2019 – 02/2023**      **Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Promotion (Dr. rer. nat.)**  
 in der AG Prof. Klösgen, Institut für Botanik (Abt. Pflanzenphysiologie)  
 der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
 im Rahmen der internationalen Graduiertenschule RTG 2498  
 „*Communication and Dynamics of Plant Cell Compartments*“  
 Titel der Dissertation: „Charakterisierung der mitochondrialen Tat-  
 Translokase höherer Pflanzen“
- 06/2019 – 08/2019**      **Industriepraktikum**  
 bei Nomad Bioscience GmbH, Standort Halle (Saale), R&D
- 06/2018 – 08/2018**      **Forschungspraktikum**  
 in der AG Prof. Scheel, Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie  
 (Institutsbereich Stress und Entwicklungsbiologie), Halle (Saale)
- 01/2018 – 03/2018**      **Wissenschaftliche Hilfskraft**  
 am Institut für Botanik (Abt. Pflanzenphysiologie) der Martin-Luther-  
 Universität Halle-Wittenberg
- 10/2017 – 08/2019**      **Master of Science (Biologie)**  
 in der AG Prof. Klösgen, Institut für Botanik (Abt. Pflanzenphysiologie)  
 der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
 Titel der Abschlussarbeit: „Zur Isolierung und Charakterisierung  
 importkompetenter invertierter Vesikel zur Untersuchung eines  
 mitochondrialen Tat-Systems in höheren Pflanzen“
- 10/2014 – 09/2017**      **Bachelor of Science (Biologie)**  
 in der AG Prof. Klösgen, Institut für Botanik (Abt. Pflanzenphysiologie)  
 der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
 Titel der Abschlussarbeit: „Steigerung der Importkompetenz isolierter  
 pflanzlicher Mitochondrien durch Modifikation des Importpuffers“
- 05/2013**      **Allgemeine Hochschulreife**  
 am Carl-Maria-von-Weber Gymnasium Eutin

## Eidesstattliche Erklärung

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

Leander Ehmke

Halle (Saale),